

André Roberto Bussmann



Efeitos do alopurinol na proteção renal por meio da dosagem plasmática e urinária de biomarcadores e histologia: estudo em modelo experimental de lesão de isquemia e reperfusão em ratos sob anestesia inalatória

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

Orientadora

Professora Titular Norma Sueli Pinheiro Módolo

Botucatu - SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TEC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Bussmann, André Roberto.

Efeitos do alopurinol na proteção renal por meio da dosagem plasmática e urinária de biomarcadores e histologia : estudo em modelo experimental de lesão de isquemia e reperfusão em ratos sob anestesia inalatória / André Roberto Bussmann. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Norma Sueli Pinheiro Módolo

Capes: 40102130

1. Rins - Doenças. 2. Insuficiência renal aguda. 3. Rato como animal de laboratório. Isquemia. 4. Isquemia. 5. Alopurinol. 6. Reperfusão (Fisiologia).

Palavras-chave: Biomarcadores; Isquemia; Lesão renal aguda; Ratos; Reperfusão.

Dedicatória

À minha esposa, Regina Maldonado Bussmann, pela paciência, apoio e amor demonstrado ao longo dos anos.

Aos meus filhos, Eduardo Maldonado Bussmann e Gustavo Maldonado Bussmann, pela alegria de suas presenças e por suportarem a minha ausência.

Aos meus pais, José Jair Bussmann e Delma Bussmann, por construir o meu caráter e me ensinar o caminho.

Agradecimento Especial

*"A educação é a arma mais poderosa que
você pode usar para mudar o mundo".*

Nélson Mandela

À Professora Titular Norma Sueli Pinheiro Módolo, orientadora
e mestre, que demonstrou ao longo desses anos de convivência
acadêmica muito carinho e sabedoria.

Meu muito obrigado e amizade eterna.

Agradecimentos

À UNESP – Universidade Estadual Paulista, por ser instituição de excelência acadêmica.

À FAPESP, pelo apoio na forma de Auxílio à Pesquisa - Regular, Processo número 12/13604-9.

Aos professores do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, por todo o aprendizado e ensino ofertado com qualidade.

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

À Rosângela Martins, pela avaliação estatística do trabalho.

À Neli Aparecida Pavan, Joana Jacirene Costa Teixeira, André Renato Passaroni, Sônia Maria Martins e Silva, Tatiana Pineiz, funcionários do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, que sempre se mostraram acessíveis e inspirados a auxiliar a evolução desse projeto.

A Marcos Antônio Marton Filho e Patrícia Amado, alunos de iniciação científica, pelo auxílio na realização da pesquisa.

"Hei de vencer.

Hei de vencer-me!

Pois só aqueles que são capazes de vencer suas
próprias limitações e erros, é que alcançam a
verdadeira vitória"

Arthur Riedel

Bussmann AR. Efeitos do alopurinol na proteção renal por meio da dosagem plasmática e urinária de biomarcadores e histologia: estudo em modelo experimental de lesão de isquemia e reperfusão em ratos sob anestesia inalatória. 2014. 68f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

Resumo

Lesão renal por isquemia e reperfusão estão envolvidas em muitas condições clínicas. A lesão de reperfusão leva a formação de espécies reativas de oxigênio e o alopurinol apresenta o potencial de diminuí-las. Os novos biomarcadores podem realizar o diagnóstico da lesão de maneira precoce. O objetivo desse estudo foi investigar se o alopurinol tem efeito protetor sobre os rins utilizando os novos biomarcadores de dano (NGALp, NGALu, KIM-1 e IL-18), a função renal e a histologia renal durante lesão de isquemia e reperfusão (I/R) em ratos uninefrectomizados. Trinta e dois ratos *Wistar* foram randomizados em 4 grupos: **Sham** (S): laparotomia e nefrectomia direita. **Controle** (C): laparotomia e nefrectomia direita, I/R em rim esquerdo. **Controle Alopurinol** (CA): laparotomia e nefrectomia direita, alopurinol na dose de 100 mg.kg⁻¹.d⁻¹. **Alopurinol** (A): laparotomia e nefrectomia direita, I/R em rim esquerdo, alopurinol na dose de 100mg.kg⁻¹.d⁻¹. Foram analisados NGALp, NGALu, IL-18, KIM-1, creatinina e histologia. Nível de significância considerado quando $p < 0,05$. Todos grupos aumentam a creatinina ao longo do experimento com $A \approx C > S \approx CA$. A NGALp e IL-18 aumentaram em todos os grupos, porém todos evoluem de forma semelhante. A NGALu aumentou no grupo C, porém todos os grupos evoluem de forma semelhante. KIM-1 foi maior no grupo A em relação ao C e intermediário nos grupos S e CA. Em relação aos achados histológicos, os grupos C e A apresentaram grau de lesão no lado esquerdo significativamente maior que os grupos S e CA. Não existiu diferença histológica entre C e A e nem entre S e CA. O alopurinol na dose de 100 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ não exerceu efeito protetor ou danoso aos rins submetidos a lesão de I/R na avaliação da função, da histologia renal e dos biomarcadores novos.

Palavras-chave: isquemia; reperfusão; lesão renal aguda; insuficiência renal aguda; rim; ratos; alopurinol; NGAL; IL-18; KIM-1; biomarcadores; radicais livres.

Bussmann AR. The effects of allopurinol in renal protection using urinary and serum biomarkers levels and histopathologic features: experimental model study of ischemia/reperfusion injury in rats under general anesthesia. 2014. 68p. Thesis (MSc degree in Anesthesiology), Botucatu Medical School, UNESP, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2014.

Abstract

Ischemic and reperfusion kidney injury are involved in many clinical conditions. The reperfusion injury leads to reactive oxygen species formation and allopurinol has the potential to inhibit this process. The novel biomarkers can perform early diagnosis of acute kidney injury. The purpose of this study was to investigate whether allopurinol had a renal protective effect measuring renal function, novel biomarkers levels (pNGAL, uNGAL and IL-18) and studying histopathologic features during renal ischemia–reperfusion (I/R) injury in uninephrectomized rats. 32 Wistar Rats were randomized in 4 groups: **Sham** (S): laparotomy and right nephrectomy. **Control** (C): laparotomy and right nephrectomy, I/R maneuvers in left kidney. **Allopurinol Control** (AC): laparotomy and right nephrectomy, pretreated with allopurinol 100mg.kg⁻¹.d⁻¹. **Allopurinol** (A): laparotomy and right nephrectomy, I/R maneuvers in left kidney, pretreated with allopurinol 100mg.kg⁻¹.d⁻¹. pNGAL, uNGAL, IL-18, KIM-1, serum creatinine and histopathologic features were analysed. Differences in the mean values were deemed significant at P<0.05. All groups showed a significant rise in serum creatinine throughout the experiment being A≈C>S≈AC. pNGAL and IL-18 showed a significant rise in all groups too, however all of them evolve in a similar way. uNGAL showed significantly rise in group C, but all of them evolve in a similar way. KIM-1 was higher in group A than C and had intermediate values in groups S and AC. With regard to histopathologic features, C and A groups showed left kidney injury significantly higher than S and AC groups. There were no difference in histopathologic features between groups C and A neither between S and AC. Allopurinol given 100mg.kg⁻¹.d⁻¹ did not seem to exert protective or harmful effects in kidneys that underwent I/R injury under functional, novel biomarkers levels and histopathologic features evaluation.

Key words: ischemia; reperfusion; acute kidney injury, acute kidney failure, kidney; rats; allopurinol; NGAL; IL-18; KIM-1; biomarkers; free radicals.

Lista de Tabelas

Tabela 1	Grau de lesão renal segundo Park	30
Tabela 2	Peso (gramas) segundo grupo experimental	33
Tabela 3	Análise longitudinal da PAM (mmHg)	34
Tabela 4	ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para a variável de monitorização PAM.....	35
Tabela 5	Análise longitudinal da temperatura (°C).....	36
Tabela 6	ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para as variáveis de monitorização temperatura.....	37
Tabela 7	Análise longitudinal do biomarcador NGALp (ng.mL ⁻¹)	38
Tabela 8	Análise longitudinal do biomarcador NGALu (ng.mL ⁻¹)	39
Tabela 9	ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para os biomarcadores NGALp e NGALu.....	40
Tabela 10	Análise longitudinal do biomarcador KIM-1 (pg.mL ⁻¹)	41
Tabela 11	ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para o biomarcador KIM-1	42
Tabela 12	Análise longitudinal do biomarcador IL-18 (pg.mL ⁻¹)	43
Tabela 13	ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para o biomarcador IL-18	44
Tabela 14	Análise longitudinal da creatinina (mg.dL ⁻¹)	45
Tabela 15	ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para a creatinina	46
Tabela 16	Análise longitudinal da ureia (mg.dL ⁻¹)	47
Tabela 17	ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para a ureia	48
Tabela 18	Classificação de RIFLE/AKIN no momento M1 e M2	49
Tabela 19	Grau de lesão histológica em rim direito	50
Tabela 20	Grau de lesão histológica em rim esquerdo	51

Lista de Figuras

Figura 1	Comparação entre os critérios de RIFLE e AKIN	14
Figura 2	Alterações na estrutura celular após LRA isquêmica	16
Figura 3	Alterações no metabolismo celular após lesão isquêmica renal	17
Figura 4	Mecanismo proposto para a geração de EROs em lesão de I/R.....	23
Figura 5	Esquema da sequência experimental.....	27
Figura 6	PAM ao longo do experimento	34
Figura 7	Temperatura ao longo do experimento	36
Figura 8	Boxplot - NGALp ao longo do experimento.....	38
Figura 9	Boxplot - NGALu ao longo do experimento.....	39
Figura 10	KIM-1 ao longo do experimento	41
Figura 11	IL-18 ao longo do experimento	43
Figura 12	Creatinina ao longo do experimento	45
Figura 13	Ureia ao longo do experimento	47
Figura 14	Grau de lesão histológica em rim direito	50
Figura 15	Grau de lesão histológica em rim esquerdo	51
Figura 16	Novo espectro de LRA: combinação de marcadores funcionais e de dano	58
Figura 17	Novos critérios para o diagnóstico de LRA	58

Lista de Abreviaturas e Siglas

ADQI	Acute Dialysis Quality Initiative
AKIN	Acute Kidney Injury Network
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
AURoC	Area under receiver operating characteristic curve
DEH	Dose equivalente em humanos
DP	Desvio padrão
DR	Dose em ratos
DU	Débito urinário
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FC	Frequência cardíaca
IL-18	Interleucina-18
I/R	Isquemia/Reperusão
IRA	Insuficiência renal aguda
KIM-1	Kidney injury molecule
LRA	Lesão renal aguda
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NGALp	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin plasmática
NGALu	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin urinária
NO	Óxido nítrico
PAM	Pressão arterial média
RIFLE	Risk/Injury/Failure/Loss/ End stage kidney disease
RFG	Ritmo de filtração glomerular
TRR	Trapia de reposição renal
UNESP	Universidade do Estado de São Paulo
VPP	Valor preditivo positivo
VPN	Valor preditivo negativo
XD	Xantina desidrogenase
XO	Xantina oxidase

Sumário

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Lista de Abreviaturas e Siglas

1	Introdução	13
1.1	Lesão Renal Aguda	13
1.2	Lesão de Isquemia/Reperusão	14
1.3	Biomarcadores	18
1.3.1	NGAL	19
1.3.2	KIM-1	20
1.3.3	IL-18	21
1.4	Alopurinol	22
2	Objetivos	24
3	Materiais e Métodos	25
3.1	Grupos Experimentais	25
3.2	Dose	26
3.3	Anestesia	26
3.4	Manobras de Isquemia-Reperusão	26
3.5	Sequência Experimental	27
3.6	Momentos	29
3.7	Crítérios de RIFLE e AKIN	30
3.8	Histopatologia	30
3.9	Variáveis	31
3.10	Metodologia Laboratorial	31
3.11	Análise Estatística	31
4	Resultados	33
4.1	Peso	33
4.2	Frequência Cardíaca	33
4.3	Pressão Arterial Média	34
4.4	Temperatura	36
4.5	NGALp e NGALu	38
4.6	KIM-1	41
4.7	IL-18	43
4.8	Creatinina	45
4.9	Ureia	47
4.10	Crítérios de RIFLE e AKIN	49
4.11	Histopatologia	50

5	Discussão	52
5.1	Modelo Animal	52
5.2	Isquemia/Reperusão	54
6	Considerações Finais	62
7	Conclusão	63
8	Referências	64

1 Introdução

1.1 Lesão Renal Aguda

Durante muitos anos uma diminuição aguda e potencialmente reversível na taxa de filtração glomerular foi chamada de insuficiência renal aguda (IRA). O termo insuficiência renal aguda (IRA) foi usado inicialmente em 1951 por Homer W. Smith referindo-se a IRA relacionada com lesão traumática. A IRA é uma síndrome que se caracteriza por rápida diminuição do ritmo de filtração glomerular (RFG)⁽¹⁾, associada com o acúmulo de resíduos como ureia e creatinina⁽²⁾. As mudanças na função renal são manifestações comuns em doenças graves e sua importância é refletida nos cuidados com a monitorização fisiológica e bioquímica. A incidência de lesão renal aguda alcançou proporções epidêmicas, afetando 7% dos pacientes hospitalizados, nos quais é um preditor independente de morbidade e mortalidade. Apesar dos avanços alcançados nos últimos anos, as taxas de morbidade e de mortalidade da lesão renal permanecem altas podendo chegar a mais de 60%⁽³⁻⁶⁾.

Infelizmente o progresso nessa área durante muito tempo foi prejudicado pelas definições imprecisas de disfunção renal, cuja classificação e definição não eram universalmente aceitas, existindo mais de 35 definições diferentes na literatura⁽⁷⁾. Recentemente o grupo de estudos *Acute Dialysis Quality Initiative* (ADQI) propôs duas mudanças na descrição e terminologia de IRA.

A primeira mudança foi a proposição do uso do termo lesão renal aguda (LRA) para diminuição aguda e potencialmente reversível na taxa de filtração glomerular ao invés de IRA. Essa mudança na terminologia foi baseada em dados que sugerem fortemente que apenas alterações discretas na creatinina sérica estão relacionadas com morbidade e mortalidade clinicamente significantes.

A segunda mudança foi na definição de IRA, com o intuito de desenvolver uma diretriz para o manejo de LRA, em 2002 o mesmo grupo (ADQI), sugeriu a classificação de RIFLE (Risk/Injury/Failure/Loss/End-stage kidney disease)^(8,9). Nessa nova classificação proposta os três primeiros estágios representam o grau de gravidade e os últimos dois estágios representam critérios de prognóstico. Essa classificação tem

demonstrado ser um bom preditor do prognóstico, com aumento da mortalidade conforme a piora da classe RIFLE^(10, 11).

Após a publicação da classificação de RIFLE, muitos grupos vêm estudando e validando os seus critérios, porém, de acordo com dados mais atuais, notou-se que mudanças nos níveis séricos de creatinina menores que os descritos no sistema RIFLE podem estar associadas com desfechos adversos. Mais recentemente o grupo Acute Kidney Injury Network (AKIN) propôs algumas modificações na classificação de RIFLE⁽¹²⁾. As modificações incluem: a) os critérios de prognóstico foram removidos e os critérios de gravidade são designados como estágio 1, 2 e 3; b) a categoria “*Risk*” do RIFLE foi ampliada para incluir um aumento na creatinina sérica de no mínimo 0,3mg.dL⁻¹; c) uma janela de 48 horas é determinada para documentação de qualquer estágio. As duas classificações estão descritas na **Figura 1**.

RIFLE		Acute Kidney Injury Network	
	Creatinina/RFG Débito Urinário (DU)		Creatinina Débito Urinário (DU)
<u>R</u>isk	Aumento Cr > 50% ou RFG diminui > 25%	Estágio 1	Aumento Cr > 50% ou ≥ 0,3mg/dL
<u>I</u>njury	Aumento Cr > 100% ou RFG diminui > 50%	Estágio 2	Aumento Cr > 100%
<u>F</u>ailure	Aumento Cr > 200% ou RFG diminui > 75% ou Cr ≥ 4mg/dL com aumento agudo ≥ 0,5mg/dL)	Estágio 3	Aumento Cr > 200% ou Cr ≥ 4mg/dL (com aumento agudo ≥ 0,5mg/dL)
<u>L</u>oss	Lesão renal aguda persistente=perda completa de função renal > 4 semanas		
<u>E</u>SKD	Doença renal terminal		Pacientes que recebem terapia de reposição renal (TRR) apresentam critérios para estágio 3, independente do estágio que se encontravam no início da TRR

Figura 1 - Comparação entre os critérios de RIFLE e AKIN. Adaptada de Bellomo 2004⁽⁹⁾ e Mehta 2007⁽¹²⁾

Risk - Risco; Injury - Dano; Failure - Falência; Loss - Perda; ESKD - Doença renal terminal; Cr - Creatinina

1.2 Lesão de Isquemia/Reperusão

As causas de LRA são tradicionalmente divididas em três categorias: pré-renal, renal intrínseca e pós-renal. Na forma pré-renal ocorre elevação da ureia e creatinina

séricas como uma resposta fisiológica a hipoperfusão renal, nessa forma a integridade do tecido renal está preservada⁽¹³⁾. A forma pós-renal ocorre por obstrução intrínseca ou extrínseca das vias urinárias. Na forma renal a necrose tubular aguda é a responsável por 75% das causas de LRA em pacientes graves, sendo o choque séptico (47,5%) a principal etiologia, seguido por LRA pós-cirúrgica (34%), choque cardiogênico (27%), hipovolemia (26%) e drogas nefrotóxicas (19%)⁽⁶⁾. No período peri operatório, lesão por isquemia e reperfusão (I/R) permanece como a primeira causa de LRA⁽¹⁴⁾.

A isquemia renal ocorre quando há um fornecimento de oxigênio menor que a demanda causando um acúmulo de resíduos do metabolismo. Como resultado as células tubulares epiteliais sofrem dano e, conforme a intensidade, podem apresentar morte por apoptose e necrose, desencadeando disfunção renal.

As características morfológicas da LRA incluem perda da borda em escova nos tubulos proximais, *blebbing* da membrana apical, edema celular e mitocondrial, picnose do núcleo e apoptose⁽¹⁵⁾. Com o agravamento da lesão as células epiteliais tubulares descolam da membrana basal e contribuem para a agregação intraluminal de células e proteínas, resultando em obstrução do túbulo⁽¹⁶⁾. A fase inicial, que ocorre devido a um dano subletal, cursa com desaparecimento da borda em escova e perda da polaridade celular e do citoesqueleto. Se o fator causal for retirado nesse estágio, ocorre recuperação completa. Caso contrário, o dano progride para a fase de extensão com morte celular, descamação, obstrução luminal, e resposta inflamatória. Inibição da apoptose e inflamação nesse estágio pode representar uma abordagem terapêutica importante. A fase de manutenção é caracterizada pelo balanço entre morte de células tubulares e regeneração (**Figura 2**).

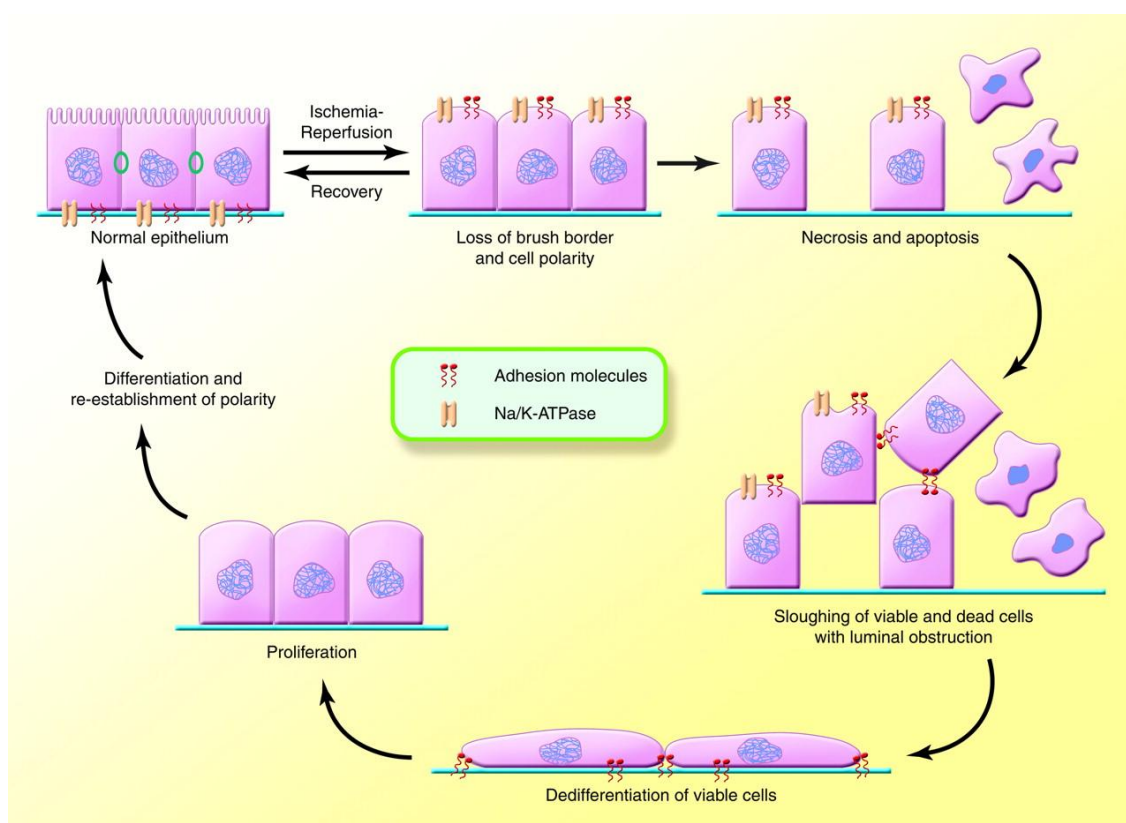


Figura 2 - Alterações na estrutura celular após LRA isquêmica. Devarajan, 2006⁽¹⁷⁾.

Quando há um insulto isquêmico ao rim ocorre um desequilíbrio entre as substâncias vasoativas com aumento de endotelina e diminuição de óxido nítrico (NO)⁽¹⁷⁾. Esse desbalanço entre as substâncias vasoativas leva a vasoconstrição nas artérias aferentes e eferentes e aumento da resistência vascular com consequente diminuição do fluxo plasmático renal e do RFG⁽¹⁸⁾. Nessa situação o nível sérico de vasoconstritores bem como o tônus simpático estão aumentados⁽¹⁹⁾. Devido à heterogeneidade do fluxo sanguíneo renal, essas alterações causam maior dano à medula externa, que é região mais suscetível a dano isquêmico, por apresentar uma pressão parcial de oxigênio menor⁽²⁰⁾. A hipoperfusão e congestão na medula externa persistem mesmo após a melhora do fluxo cortical durante a reperfusion, levando ao prolongamento da agressão e morte celular nessa região⁽¹⁷⁾. O endotélio vascular também sofre alterações como alvo de processos inflamatórios. Existe um aumento da expressão de moléculas de adesão que promovem a interação endotélio-leucócitos. Entre elas estão a ICAM-1, P-selectin e a E-selectina⁽²¹⁾.

No mecanismo de dano celular por isquemia inicialmente ocorre depleção de ATP. Com a persistência da isquemia o AMP é metabolizado posteriormente a

nucleotídeos de adenosina e a hipoxantina, causando acúmulo dos mesmos. Como consequência, ocorre aumento do cálcio intracelular por disfunção do retículo endoplasmático e ativação de proteases e fosfolipases. A depleção de ATP seguida do aumento do cálcio intracelular, ativação de múltiplas enzimas, alteração no metabolismo do NO e a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) podem levar a necrose e apoptose celular⁽²⁾. Esses efeitos causam perda definitiva da função mitocondrial e impedindo a regeneração de ATP após reperfusão⁽¹⁷⁾.

Durante a reperfusão, a conversão da hipoxantina acumulada a xantina gera peróxido de hidrogênio e superóxido catalizada pela enzima xantina oxidase (XO). A conversão de hipoxantina em xantina via XO é a maior fonte potencial de EROs, que parecem exercer uma importante função na gênese da lesão de I/R. Coletivamente as EROs causam dano as células dos túbulos renais mediado por oxidação de proteínas, peroxidação de lipídeos, dano ao DNA e indução de apoptose conforme esquema na **Figura 3**⁽¹⁷⁾. A mitocôndria também colabora para a formação de superóxido através da oxidação de NADH⁻. Outra fonte importante de EROs é através da ativação de leucócitos⁽²⁾.

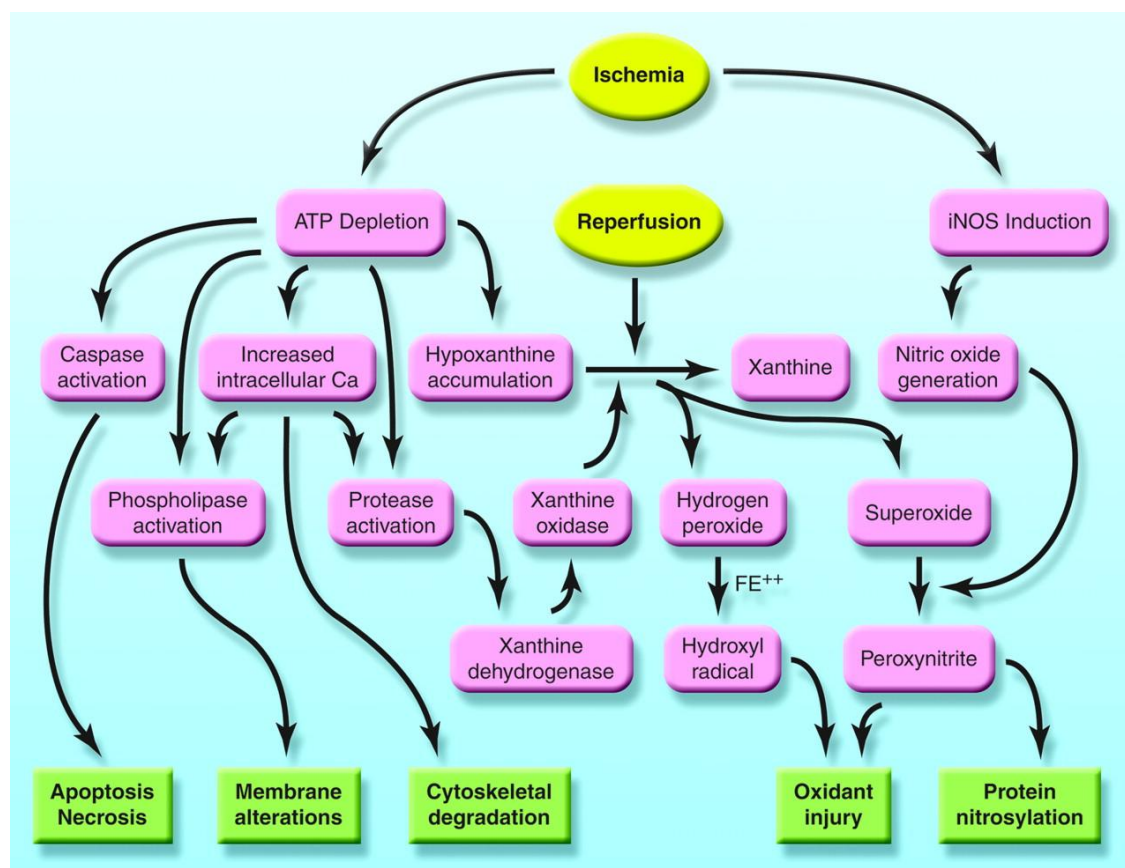


Figura 3 - Alterações no metabolismo celular após lesão isquêmica renal. Devarajan 2006⁽¹⁷⁾.

1.3 Biomarcadores

A creatinina sérica e o DU são comumente usados para indicar disfunção renal, apesar das limitações conhecidas. A creatinina é uma substância endógena e a dosagem da sua concentração plasmática é utilizada como uma forma indireta de aferir a adequação da filtração glomerular. Ela é produto do metabolismo da creatinina e fosfocreatina no músculo esquelético, porém seus níveis podem sofrer alteração pela ingestão de determinados alimentos, apresentando uma produção e liberação no sangue variáveis. Em pacientes com função renal estável, os níveis plasmáticos da creatinina são quase constantes, com variação de cerca de 8%⁽²²⁾.

O aumento dos níveis séricos de creatinina é observado quando ocorre lesão dos néfrons funcionantes, entretanto, para ocorrer esse aumento, o tempo necessário pode variar entre 24 a 72 horas. Em situações onde o diagnóstico e tratamento precoces de isquemia renal são determinantes de morbimortalidade e prognóstico, esse período é muito longo e a creatinina sérica tem sido sistematicamente questionada como marcador da função renal.

A creatinina e o DU têm sensibilidade e especificidade limitados e o nível de creatinina tem uma velocidade de alteração muito baixa, limitando o seu uso no diagnóstico de LRA⁽²³⁾. Assim, a creatinina seria útil nos casos em que o organismo alcançou estado de equilíbrio, o que pode levar dias para ocorrer⁽²⁴⁾. Além disso, a alteração na creatinina sérica não consegue discriminar entre mudanças na função renal devido à depleção de volume, às mudanças hemodinâmicas na perfusão renal, à obstrução urinária ou à lesão renal intrínseca⁽²⁵⁾.

Sabemos que as modificações moleculares induzidas pela lesão ocorrem antes do dano celular e do desenvolvimento da síndrome clínica, por isso a detecção de biomarcadores pode nos fornecer um diagnóstico precoce e preciso de LRA⁽²⁶⁾.

O biomarcador ideal deve⁽²⁷⁾:

- diagnosticar disfunção renal rapidamente;
- distinguir LRA pré-renal de dano apoptótico e necrótico;
- ter capacidade de localizar o dano
- ser específico para lesão renal na presença de lesão concomitante de outros órgãos;

- ter capacidade de distinguir LRA de doença renal crônica;
- classificar de acordo com o grau de gravidade;
- prever o prognóstico;
- permitir a modificação da doença;
- ser barato e fácil de executar;
- ser capaz de agir como desfecho

Entre os biomarcadores utilizados encontramos Lipocalina Associada à Gelatinase do Neutrófilo (*Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*/NGAL) urinária (NGALu) e plasmática (NGALp), Molécula de Lesão Renal - 1 (*Kidney Injury Molecule-1*/KIM-1) urinária, cistatina-C urinária e plasmática, Interleucina-18 urinária (IL-18) e L-FABP urinária e plasmática. Esses marcadores tem contribuído para detecção precoce da LRA⁽²⁶⁾.

1.3.1 NGAL

As lipocalinas constituem uma família de mais de 20 pequenas proteínas que são definidas baseado nas suas estruturas tridimensionais, caracterizadas por 8 cadeias β que formam um β barril com um cálice anexado. A NGAL é um membro da família das lipocalinas, é constituído de uma cadeia única de polipeptídeos com 178 aminoácidos e possui uma massa molecular calculada de 22kDa, que aumenta para 25kDa com a glicosilação⁽²⁸⁾. Ocorre principalmente na forma monomérica, com uma pequena porcentagem ocorrendo nas formas de dímeros e trímeros⁽²⁶⁾.

Em condições fisiológicas o mRNA da NGAL é expresso em vários tecidos humanos incluindo rim, medula óssea, próstata, útero, glândula salivar, estômago, cólon, pulmões e fígado^(24, 28) e os níveis normais em adultos saudáveis é de 50 a 90 ng.mL⁻¹. Ela é hiperproduzida por esses tecidos em resposta a diversas condições inflamatórias com aumento significativo nos níveis de expressão local e sistêmico. A NGAL circulante é filtrada pelo glomérulo e reabsorvida no tubulo proximal. Ele é secretada em baixas concentrações pela alça ascendente do túbulo renal e os níveis urinários normais são muito baixos (<5ng.mL⁻¹)⁽²⁹⁾.

Em condições específicas, como em doenças renais, os níveis de NGAL no soro e na urina podem ser de grande importância diagnóstica uma vez que essa proteína representa um biomarcador precoce de estresse no órgão⁽²⁸⁾. Tem sido demonstrado a

NGALu como um novo biomarcador de lesão isquêmica renal, apresentando um aumento de 4 vezes 3 horas após o início da reperfusão, ocorrência de pico transcorridas 24 horas e declínio a valores normais após 72 horas⁽³⁰⁾. O valor de corte para sensibilidade e especificidade ótimos para prever LRA é 100-270ng.mL⁻¹, com maiores valores aceitos em adultos (170ng.mL⁻¹), comparados com crianças 100-135ng.mL⁻¹). Sendo de maior aceitação valores >150ng.mL⁻¹ para ambas as populações⁽³¹⁾. Já foi demonstrado que a NGAL se apresenta como um poderoso preditor independente de LRA, com uma surpreendente AUROC (Area Under Receiver Operating Characteristic Curve) de 0,998 para a NGALu e 0,91 para a NGALp em medidas realizadas 2 horas após *bypass* cardiopulmonar em crianças⁽²⁹⁾ e, mais recentemente, apresentou valores de 0,95⁽³²⁾. Já em adultos que se submeteram a cirurgia cardíaca a AUROC relatada é de 0,74 para NGALu coletado 3 horas após e 0,8 para NGALu coletado 18 horas o término da cirurgia⁽³³⁾ e em novos trabalhos apresenta valores de AUROC de 0,87⁽³⁴⁾.

Em uma revisão sistemática os autores concluíram que a NGAL parece ser uma ferramenta prognóstica útil em relação ao início da terapia de reposição renal, porém com algumas limitações em relação a morte intra-hospitalar⁽³¹⁾.

1.3.2 KIM-1

O KIM-1 é uma glicoproteína de membrana que contém, na sua porção extracelular, um domínio *Ig-like* e um domínio de proteína *mucin-like*. Inicialmente, pensou-se que a KIM-1 apresentava propriedades de moléculas de adesão devido a sua estrutura semelhante a outra molécula de adesão celular, a *mucosal adressin*⁽³⁵⁾. O gene KIM-1 ou a expressão da proteína é indetectável em rins normais ou na urina e, após sofrer dano isquêmico ou tóxico, KIM-1 mRNA é rapidamente sintetizado e a proteína gerada é localizada em níveis altos na membrana apical das células desdiferenciadas do túbulo proximal após dano isquêmico ou tóxico⁽³⁶⁾.

Muitas transmembranas sofrem clivagem proteolítica, liberando o seu domínio extracelular, podendo apresentar uma função de sinalização autócrina ou parácrina, sendo o ectodomínio da KIM-1 uma delas. Ele é clivado de um modo dependente de metaloproteinases e seu domínio solúvel é liberado na urina. A clivagem da molécula transmembrana KIM-1 é regulada pela região justamembrana e por MAP kinases⁽³⁷⁾.

KIM-1 proporciona às células epiteliais a habilidade de reconhecer e fagocitar células mortas que estão presentes no rim pós-isquêmico e contribuem para a obstrução do lúmen do túbulo, uma das características da LRA. Além de facilitar o *clearance* de debris apoptóticos do lúmen tubular, KIM-1 também parece ajudar a limitar a resposta autoimune a lesão, uma vez que a fagocitose de corpos apoptóticos é um mecanismo que limita a resposta pró-inflamatória⁽³⁸⁾.

A forma solúvel de KIM-1, que é a porção externa da proteína, é encontrada na urina de pacientes com necrose tubular aguda e pode servir como um biomarcador útil. De fato, níveis urinários altos de KIM-1 estão associados com desfecho clínico adverso (morte e necessidade de diálise) em pacientes com LRA⁽³⁶⁾, e a extensão do dano túbulo-glomerular e fibrose tem sido associadas às concentrações urinárias altas de KIM-1⁽³⁹⁾. Os níveis ótimos que devem ser usados como ponto de corte para o diagnóstico de LRA ainda precisam ser estabelecidos.

1.3.3 IL-18

A IL-18 é uma citocina pró-inflamatória que é produzida no túbulo proximal, é detectada na urina após vários processos patológicos renais, incluindo I/R, rejeição de transplante, infecção, malignidade e condições autoimunes⁽²⁶⁾. Ela é sintetizada como um precursor biologicamente inativo (pró-IL-18) que sofre clivagem e é convertida na forma ativa pela enzima intracelular caspase-1^(40, 41). Após ser clivada no túbulos proximais, a forma ativa de IL-18 é secretada pela célula e vai para a urina⁽⁴¹⁾.

Os valores urinários de IL-18 (pg.ml⁻¹) mostraram-se significativamente maiores em paciente com LRA 24 e 48 horas antes do evento diagnosticado por creatinina sérica. Apresentam pico 6 horas após o dano isquêmico e a performance do teste na AUROC para o teste de IL-18 urinária é de 0,73, demonstrando uma boa eficácia para o diagnóstico de LRA dentro das próximas 24 horas. A performance para diagnóstico precoce, antes de 48 horas foi de 65% e também tem se mostrado útil como preditor independente de mortalidade⁽⁴²⁾. Os níveis ótimos que devem ser usados como ponto de corte para o diagnóstico de LRA também ainda não foram definidos.

1.4 Alopurinol

O alopurinol inibe a xantina oxidase (XO) e impede a síntese de urato a partir da hipoxantina e xantina e é usado para o tratar hiperuricemia. O alopurinol também é um substrato da XO e o produto dessa reação, o oxipurinol, também é inibidor da enzima. A absorção do alopurinol é rápida após ingestão oral e as concentrações plasmáticas de pico são atingidas em 60-90 minutos⁽⁴³⁾, com uma bioavaliabilidade de aproximadamente 80%. O pico do oxipurinol é cerca de 3,5 vezes maior que do alopurinol e ocorre cerca de 4 horas após a ingestão oral. O tempo de meia vida plasmática do alopurinol é de aproximadamente 1-2 horas e do oxipurinol 18-30 horas, isso permite a dose única diária. O alopurinol é um ácido fraco com pKa de 9,4 e é encontrado na forma não ionizada em pH fisiológicos. Já o oxipurinol é uma ácido um pouco mais forte com pKa 7,7 e é encontrado cerca de 30% ionizado no plasma⁽⁴⁴⁾.

Cerca de 20% são excretados nas fezes e 10-30% inalterados na urina. O restante sofre metabolismo (a maior parte em oxipurinol). Uma vez que alopurinol e oxipurinol inibem a XO, a oxidação do alopurinol a oxipurinol é auto inibitória e a velocidade da reação diminuída⁽⁴⁴⁾.

Durante a isquemia o ATP é degradada a adenosina, inosina, xantina e hipoxantina. A xantina desidrogenase (uma enzima incapaz de produzir EROs) é convertida a XO pela sobrecarga de cálcio intracelular induzida pela isquemia. Na reoxigenação do tecido isquêmico a XO pode formar EROs como superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$). As EROs podem atacar uma grande variedade de componentes celulares e de membrana, causando peroxidação de ácidos graxos da estrutura fosfolipídica das membranas⁽⁴⁵⁾.

Já foi descrito que o inibidor da XO, alopurinol, e seu metabólito ativo, oxipurinol, têm um efeito protetor sobre a lesão de I/R em miocárdio⁽⁴⁶⁾. Os efeitos descritos são redução no tamanho do infarto, melhora da função ventricular, menor incidência de arritmias e diminuição da liberação de creatinina-kinase miocárdica.

O mecanismo preciso de como o alopurinol exerce o efeito protetor ainda não foi esclarecido, porém, uma das possibilidades levantadas é o efeito protetor do alopurinol em tecido isquêmico ser mediado pela inibição da formação de EROs⁽⁴⁷⁾, conforme

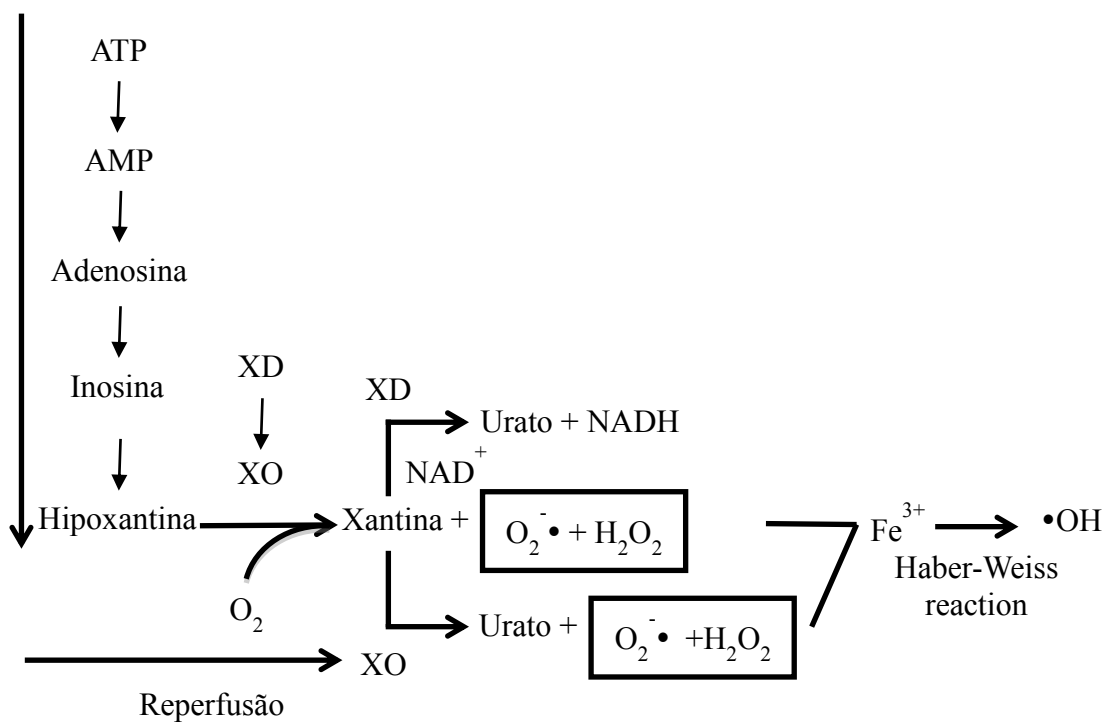
Figura 4⁽⁴⁸⁾:

Figura 4 - Mecanismo proposto para a geração de EROs em lesão de I/R.
 XD: xantina desidrogenase; XO xantina oxidase

2 Objetivos

Geral: avaliar se o alopurinol exerce efeito protetor sobre as células renais, usando um modelo experimental de I/R em ratos.

Específico: quantificar o efeito do alopurinol na proteção de células renais em situação de estresse de I/R por meio da análise histológica, da dosagem plasmática NGAL, ureia e creatinina e da dosagem urinária de KIM-1, IL-18 e NGAL.

Verificar a classificação de AKIN e de RIFLE em M1 e M2.

3 Materiais e Métodos

Após aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, foram incluídos no estudo 32 ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*), machos, com peso entre 300g e 500g, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu da UNESP. O experimento foi realizado no Laboratório Experimental de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

3.1 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos e alocados aleatoriamente em quatro grupos experimentais descritos a seguir:

Grupo S (Sham - n=8): indução anestésica com isoflurano a 3% e manutenção com isoflurano na concentração inspirada de 1,5 a 2%. Foi realizado laparotomia e nefrectomia direita.

Grupo C (Controle - n=8): indução anestésica com isoflurano a 3% e manutenção com isoflurano na concentração inspirada de 1,5 a 2%. Foi realizado laparotomia e nefrectomia direita. Foram realizadas manobras de I/R renal esquerda conforme itens 16 a 19 da sequência experimental. Os animais desse grupo foram tratados com placebo.

Grupo CA (Controle Alopurinol - n=8): indução anestésica com isoflurano a 3% e manutenção com isoflurano na concentração inspirada de 1,5 a 2%. Foi realizado laparotomia e nefrectomia direita. Os animais desse grupo foram tratados com alopurinol na dose de $100\text{mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

Grupo A (Alopurinol - n=8): indução anestésica com isoflurano a 3% e manutenção com isoflurano na concentração inspirada de 1,5 a 2%. Foi realizado laparotomia e nefrectomia direita. Os animais desse grupo foram tratados com alopurinol na dose de $100\text{mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Foram realizadas manobras de I/R renal esquerda conforme itens 6 a 19 da sequência experimental.

3.2 Dose

O alopurinol foi administrado na dose de $100\text{mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, por via oral em duas doses iguais administradas 24 horas e 1 hora antes da indução anestésica. Essa forma de administração já foi utilizada em trabalhos anteriores, e está de acordo com a dose preconizada pela *Food and Drug Administration (FDA) – Guidance for Industry – Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers*⁽⁴⁹⁾. Esse guia apresenta uma fórmula que converte a dose em ratos (DR) em dose equivalente em humanos (DEH) e leva em consideração as diferenças de superfície corpórea.

Fórmula: $\text{DR}=0,16\text{DEH}$

3.3 Anestesia

Após pesados, os animais foram colocados em um recipiente específico, onde foi iniciada a indução anestésica. Foi administrado na atmosfera deste recipiente isoflurano a 3% (vaporizador calibrado Isotec 5 Ohmeda) em uma mistura com oxigênio 40%. O recipiente é provido de um sistema de eliminação de gases que não permite o acúmulo de dióxido de carbono. O tempo de indução foi de 5 minutos.

Após o animal estar adormecido e em plano anestésico, o mesmo foi colocado em uma plataforma, em seguida foi adaptou-se a máscara ao focinho do animal e realizou-se a manutenção da anestesia com fração inspirada de oxigênio de 0,40 e isoflurano na concentração de 1,5% a 2%.

Foi instalado um sensor para a medida da temperatura retal. Os animais foram mantidos sobre e cobertos com bolsas térmicas (Bolsa térmica Gel - Body Care - Mercur[®]) pré-aquecidas para a manutenção da temperatura entre 36°C e 38°C.

3.4 Manobras de Isquemia-Reperusão

As manobras de I/R foram realizadas como segue:

Após um intervalo inicial de 10 minutos, foi feita laparotomia e nefrectomia direita.

A artéria renal esquerda foi clampeada completamente durante um período de 30 minutos. Após esse período a artéria renal esquerda foi liberada e foi aguardado um período de 30 minutos para a reperfusão. Durante esse período a parede abdominal e o acesso cirúrgico cervical foram fechados e o animal preparado para despertar.

	T0		T1		T2
Indução inalatória	Intervalo	Laparotomia + Nefrectomia direita	Clampeamento da artéria renal esquerda ou intervalo	Reperusão renal ou intervalo	Despertar e sacrifício 24hs após
5 min	10 min		30 min	30 min	
	M0			M1	M2

Figura 5 - Esquema da sequência experimental.

3.5 Sequência Experimental

A sequência experimental foi realizada na seguinte ordem cronológica:

- 1) Os animais receberam uma dieta padrão e água *ad libitum* em gaiola metabólica.
- 2) Realizada a coleta de urina, esse foi o Momento 0 (M0) para as variáveis urinárias (NGALu, KIM-1 e IL-18).
- 3) Foram pesados imediatamente antes do início do experimento.
- 4) Todos os cálculos relativos às infusões e doses foram feitos e preparadas.
- 5) Anestesia em um recipiente específico com isoflurano a 3% e oxigênio a 40%.
- 6) Colocação de bolsas aquecidas para manutenção da temperatura retal entre 36°C e 38°C.
- 7) Manutenção da anestesia com a administração de isoflurano por via inalatória sob máscara em concentração variando entre 1,5% e 2%.
- 8) Posicionamento do termômetro retal.
- 9) Dissecção e cateterismo da veia jugular externa direita para infusão da solução hidratação em bomba de infusão contínua.
- 10) Início da infusão venosa de Ringer lactato, $3\text{mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$, para reposição das perdas de fluidos, utilizando a bomba de infusão ANNE® (ABBOTT Laboratórios do Brasil Ltda).
- 11) Dissecção e cateterismo da artéria carótida esquerda para monitorização da

pressão arterial e coleta de amostras de sangue.

- 12) Intervalo de 10 minutos para estabilização e avaliação da estabilidade hemodinâmica.
- 13) Coleta dos seguintes dados de monitorização (T0): Frequência Cardíaca (FC), Pressão Arterial Média (PAM) e Temperatura Retal.
- 14) Coleta de 1,5mL de sangue da artéria carótida esquerda para dosagem das variáveis plasmáticas (NGALp, creatinina, ureia). Este foi o Momento 0 (M0) para amostras plasmáticas. A retirada dessa amostra foi acompanhada de infusão de 4,5mL de Ringer Lactato ao longo de 1 minuto.
- 15) Realização de laparotomia e nefrectomia direita. O rim direito foi guardado em solução apropriada para análise posterior.
- 16) Clampeamento da artéria renal esquerda por um período de 30 minutos.
- 17) Abertura do clampeamento da artéria renal esquerda.
- 18) Um minuto após a liberação do *clamp* da artéria renal esquerda foram coletados os seguintes dados de monitorização (T1): FC, PAM e Temperatura Retal.
- 19) Após o período de 30 minutos de reperfusão, 1,5 mL de sangue foi coletado da carótida esquerda para dosagem das variáveis plasmáticas. Esse foi o Momento 1 (M1). A retirada desse sangue foi acompanhada de infusão de 4,5mL de Ringer Lactato ao longo de 1 minuto.
- 20) Avaliação da estabilidade hemodinâmica
- 21) Coleta dos seguintes dados de monitorização (T2): FC, PAM e Temperatura Retal.
- 22) Realização do fechamento da parede abdominal.
- 23) A analgesia pós-operatória foi realizada com 1 mL de bupivacaína 0,15% por via subcutânea nos locais onde foram feitas as incisões.
- 24) Retirada dos cateteres venoso e arterial.
- 25) Fechamento da incisão cervical.
- 26) Interrupção do anestésico inalatório.
- 27) Foi aguardada a recuperação do animal.
- 28) Manutenção do animal em gaiola metabólica com alimentação e água *ad*

libitum, em ambiente controlado.

- 29) Coleta da urina das gaiolas metabólicas para realizar as dosagens.
- 30) Quantificação do volume urinário.
- 31) Centrifugação e armazenamento.
- 32) Vinte e quatro horas após o início de experimento, os animais foram novamente anestesiados em recipiente específico, com isoflurano 3% e oxigênio a 40%.
- 33) Verificada a adequação da ventilação.
- 34) Coleta de 2,5mL de sangue intracardíaco para a dosagem de NGALp, ureia e creatinina. Este foi o Momento 2 (M2).
- 35) Realizada a nefrectomia esquerda. O rim esquerdo foi armazenado em solução apropriada para análise.
- 36) O animal foi sacrificado com injeção intraventricular de 125mg de tiopental sódico. Descarte do animal após a confirmação da sua morte.

3.6 Momentos

Os atributos PAM, FC e Temperatura Retal foram estudados nos tempos: T0 - 10 minutos após a cateterização da artéria carótida direita; T1 - 1 minuto após a liberação do *clamp* da artéria renal esquerda nos grupos com isquemia (A e C) e após ter passado intervalo de tempo semelhante nos grupos sem isquemia (S e CA); T2 - 30 minutos após a liberação do *clamp* da artéria renal esquerda nos grupos com isquemia (A e C) e após ter passado intervalo de tempo semelhante nos grupos sem isquemia (S e CA).

A concentração plasmática de NGAL, ureia e creatinina foi estudada nos momentos: M0 - 10 minutos após a cateterização da artéria carótida direita; M1 - 30 minutos após a liberação do *clamp* da artéria renal esquerda nos grupos com isquemia (A e C) e após ter passado intervalo de tempo semelhante nos grupos sem isquemia (S e CA); M2 - 24 horas após o início do experimento.

As dosagens urinárias de NGAL, KIM-1 e IL-18 foram estudadas nos momentos: M0 - imediatamente antes do início do procedimento cirúrgico; M2 24 horas após o início do experimento.

3.7 Critérios de RIFLE e AKIN

Os critérios de RIFLE e AKIN foram utilizados para estadiamento do grau da lesão entre os pares de momentos M0-M1 e M0-M2. Levando em consideração apenas a creatinina sérica, a diferença entre as duas classificações encontra-se apenas no estágio 1 de AKIN e *Risk* de RIFLE. Uma vez que, na classificação de AKIN a categoria “*Risk*” da classificação de RIFLE foi ampliada para incluir um aumento na creatinina sérica de no mínimo 0,3 mg.dL⁻¹.

3.8 Histopatologia

A Análise histopatológica foi realizada em todos os rins retirados. O tecido fresco foi fixado em solução de Duboscq-Brasil durante as primeiras 48 horas e a seguir acondicionado em solução de álcool 70% para avaliação histológica posterior. A solução de Duboscq-Brasil foi preparada com 6 mL de formol a 40%, 12 mL de álcool absoluto, 1,5 mL de ácido acético e 8 mL de ácido pícrico.

As lâminas foram preparadas e coradas com hematoxilina e eosina e examinadas sob diversos aumentos de microscopia óptica. Os rins foram identificados por números e o patologista que fez análise histológica não tinha conhecimento a qual grupo experimental pertencia a peça do anatomopatológico. O grau de lesão renal foi classificada segundo os critérios de Park⁽⁵⁰⁾ apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Grau de lesão renal segundo Park

Grau	Tipo	% de Lesão (área de necrose)
0	Sem lesão	-
1	Lesão leve	<10%
2	Moderada	10 a 25%
3	Moderada a Grave	25 a 50%
4	Grave	50 a 75%
5	Muito Grave	>75%

3.9 Variáveis

Foram estudados, em cada um dos animais dos três grupos de estudo os seguintes atributos:

- Peso
- Frequência cardíaca
- Pressão arterial média (PAM)
- Temperatura retal
- Dosagem plasmática de NGAL, ureia e creatinina
- Dosagem urinária de KIM-1, IL-18, NGAL
- Critérios de RIFLE e AKIN
- Exame histológico dos rins direito e esquerdo

3.10 Metodologia Laboratorial

Para as dosagens de ureia e creatinina foram utilizados reagentes da marca EBRAM e o equipamento para análise foi o COBAS MIRA PLUS. Para a dosagem de NGALp, NGALu, KIM-1 e IL-18 foi utilizada a metodologia ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), teste imunoenzimático que permite a detecção quantitativa e os kits utilizados foram kits padrão da Bioporto (Dinamarca)

3.11 Análise Estatística

A análise inferencial foi composta pelos seguintes métodos:

- ANOVA para medidas repetidas e testes de contrastes foram usadas para avaliar o comportamento das variáveis de monitorização e biomarcadores ao longo de três momentos no interior de cada grupo experimental;
- ANOVA para medidas repetidas com um fator e testes de contrastes foram realizadas para verificar se a evolução das variáveis foi diferenciada entre os grupos (efeito da interação);

- ANOVA de Kruskal-Wallis (não paramétrica) e o teste de comparações múltiplas de Dunn foram aplicados para comparação do peso, volume urinário e grau de lesão pela histologia entre os quatro grupos experimentais;

Foi aplicada a transformação logarítmica (log natural) nos dados para análise longitudinal (ANOVA para medidas repetidas), devido à falta de normalidade na distribuição das variáveis nos grupos estudados. O critério de determinação de significância adotado foi o nível de 5%. A análise estatística foi processada pelo software SAS 6.11 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

4 Resultados

4.1 Peso (gr)

Tabela 2 - Peso (gramas) segundo grupo experimental.

Grupo	n	média	DP	<i>p valor</i>
C	8	451,3	43,9	0,14
S	8	400	45	
CA	8	425	52,9	
A	8	395	60,4	
Total	32	416,5	54,3	

ANOVA de Kruskal-Wallis

DP: Desvio padrão

Comentários: que não existe diferença significativa no peso entre os grupos experimentais ($p = 0,14$) demonstrando homogeneidade da distribuição da amostra.

4.2 Frequência Cardíaca (FC)

Uma vez que a frequência cardíaca normal de um rato é maior que 300 batimentos por minuto, a frequência cardíaca apresentada pelo monitor em todos os ratos durante todos os momentos foi maior que 250 batimentos por minuto por limitações do próprio monitor. Devido a esse fato não possível realizar análise estatística dessa variável.

4.3 Pressão Arterial Média (PAM)

Tabela 3 - Análise longitudinal da PAM (mmHg)

Grupo	T0		T1		T2		Efeito Tempo ^a	Teste de contrastes
	média	± DP	média	± DP	média	± DP		
C	118,1	± 10,6	76,8	± 10,6	80,5	± 16,4	0,0001	T0 > (T1 ≈ T2)
S	101,6	± 17,1	91,3	± 7,7	91,1	± 17,7	0,21	
CA	107,1	± 16,9	97,9	± 12,2	99,9	± 18,1	0,29	
A	96,5	± 22,8	57,2	± 11,3	72,1	± 21,3	0,0001	T0 > T2 > T1

DP: desvio padrão

^a ANOVA para medidas repetidas no interior de cada grupo experimental

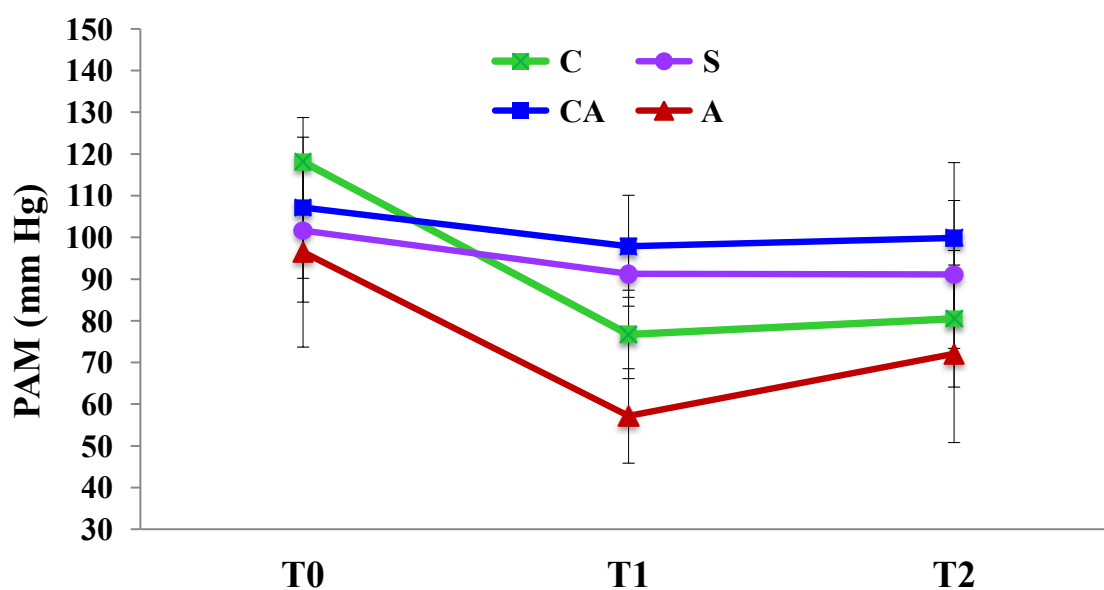


Figura 6 - PAM ao longo do experimento.

Pela ANOVA para medidas repetidas, observou-se que existe variação significativa na PAM dos grupos C ($p=0,0001$) e A ($p=0,0001$) ao longo do experimento. De uma forma geral, segundo os testes de contrastes, observou-se queda na PAM conforme ilustram a **Figura 6** e a **Tabela 3**.

Após a análise longitudinal no interior de cada grupo, foi aplicada a ANOVA para medidas repetidas com um fator visando estudar principalmente o efeito da interação (grupo*tempo), com ênfase na influência do grupo nos pares de momentos das variáveis de monitorização e biomarcadores, ou seja, verificar se existe diferença significativa na evolução das variáveis entre os grupos.

Tabela 4 - ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para a variável de monitorização PAM

Efeito Principal			Interação	Análise de Contraste entre grupos		
Grupo	Tempo			Par de momento	<i>p valor</i>	Comentários
PAM	0,0001	0,0001	0,0005	T0 x T1	0,0001	$(S \approx CA) > (C \approx A)$
				T0 x T2	0,050	$(S \approx CA) > C, A$ intermediário
				T1 x T2	0,12	$C \approx S \approx CA \approx A$

Pela ANOVA para medidas repetidas com um fator, observou-se o efeito significativo da interação na PAM ($p=0,0005$).

A análise de contrastes para a variável PAM mostrou que existe diferença significativa na variação da PAM de T0 para T1 entre os grupos experimentais ($p=0,0001$). Identificou-se, ao nível de 5% de significância, que os grupos C e A apresentaram queda significativamente maior que os grupos S e CA. Não há diferenças significativas entre C e A, nem entre S e CA.

Existe diferença significativa na variação da PAM do T0 para T2 entre os grupos experimentais ($p=0,05$). Identificou-se, ao nível de 5%, que o grupo C apresentou queda significativamente maior que os grupos S e CA. Não existem diferenças significativas entre C e A, e nem entre S, CA e A (A grupo intermediário).

Não existe diferença significativa na variação da PAM do T1 para T2 ($p=0,12$), entre os grupos experimentais, ou seja, os quatro grupos evoluem de forma semelhante.

4.4 Temperatura

Tabela 5 - Análise longitudinal da temperatura (°C)

Grupo	T0		T1		T2		Efeito Tempo ^a	Teste de contrastes
	média	± DP	média	± DP	média	± DP		
C	36,8	± 0,7	37,8	± 0,8	37,7	± 0,7	0,002	T0 < (T1 ≈ T2)
S	36,6	± 0,8	36,9	± 1,1	38	± 1,4	0,003	T2 > (T0 ≈ T1)
CA	37,5	± 0,8	38,2	± 1	38,1	± 0,7	0,066	
A	36,9	± 0,7	38	± 0,8	37,3	± 0,8	0,002	T1 > (T0 ≈ T2)

DP: desvio padrão

^a ANOVA para medidas repetidas no interior de cada grupo experimental

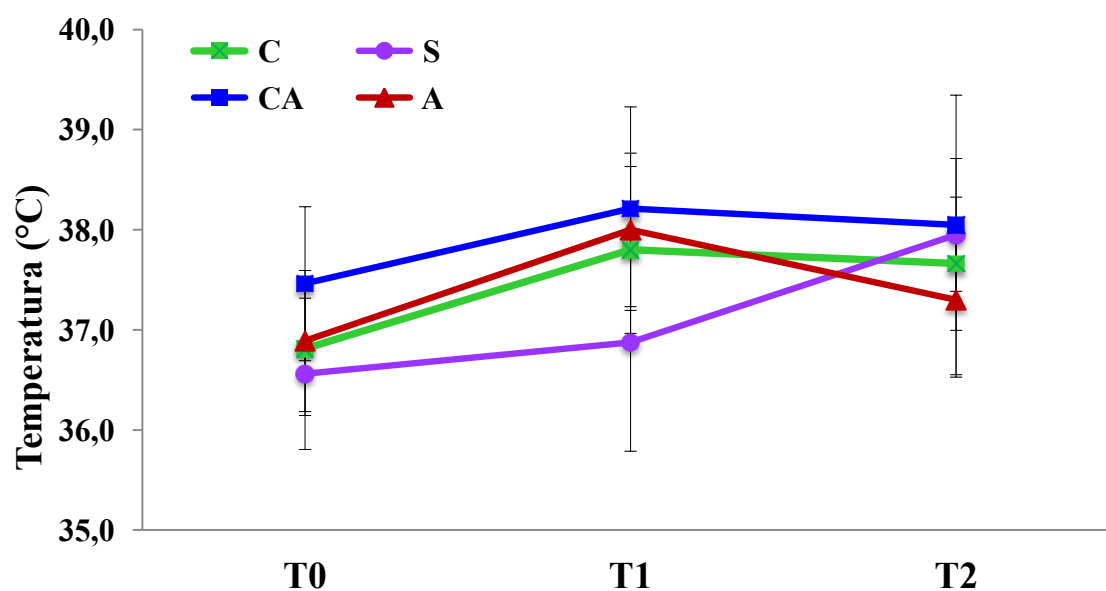


Figura 7 - Temperatura ao longo do experimento.

Pela ANOVA para medidas repetidas, observou-se que existe variação significativa na temperatura dos grupos C ($p=0,002$), S ($p=0,003$) e A ($p=0,002$) ao longo do experimento. De uma forma geral, segundo os testes de contrastes, observou-se aumento na temperatura, conforme ilustram a **Figura 7** e a **Tabela 5**.

Tabela 6 - ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para as variáveis de monitorização temperatura

Variável	Efeito Principal			Análise de Contraste entre grupos		
	Grupo	Tempo	Interação	Par de momento	<i>p valor</i>	Comentários
Tempe- ratura	0,19	0,0001	0,005	T0 x T1	0,22	$C \approx S \approx CA \approx A$
				T0 x T2	0,14	$C \approx S \approx CA \approx A$
				T1 x T2	0,0009	$S > (C \approx CA \approx A)$

A análise de contrastes para variável Temperatura mostrou que não existe diferença significativa na variação da temperatura do T0 para T1 ($p=0,22$) entre os grupos experimentais, ou seja, os quatro grupos evoluem de forma semelhante.

Não existe diferença significativa na variação da temperatura do T0 para T2 ($p=0,14$) entre os grupos experimentais, ou seja, os quatro grupos evoluem de forma semelhante.

Existe diferença significativa na variação da temperatura do T1 para T2 entre os grupos experimentais ($p=0,0009$). Identificou-se, ao nível de 5%, que o grupo S apresentou aumento significativamente maior que os grupos C, CA e A (A teve queda). Não existem diferenças significativas, ao nível de 5%, entre C, CA e A.

4.5 NGALp e NGALu

Tabela 7 - Análise longitudinal do biomarcador NGALp (ng.mL⁻¹)

	M0	M1	M2	Efeito	Teste de
Grupo	med [AIQ]	med [AIQ]	med [AIQ]	Tempo ^a	contrastes
C	29,5[9,0;93,6]	52,1[20,5;65,1]	368,3[357,6;385,4]	0,0001	(M0 ≈ M1) < M2
S	14[9,8;54,8]	12[10,5;91]	343[239,8;364]	0,001	(M0 ≈ M1) < M2
CA	15,5[12;238]	21,5[13,8;322,5]	380,5[372;390,5]	0,001	(M0 ≈ M1) < M2
A	29,5[11,5;43,8]	80[43,8;99]	300,5[295,8;303,5]	0,0001	M0 < M1 < M2

med: Mediana [AIQ]: Amplitude interquartil

^a ANOVA para medidas repetidas no interior de cada grupo experimental

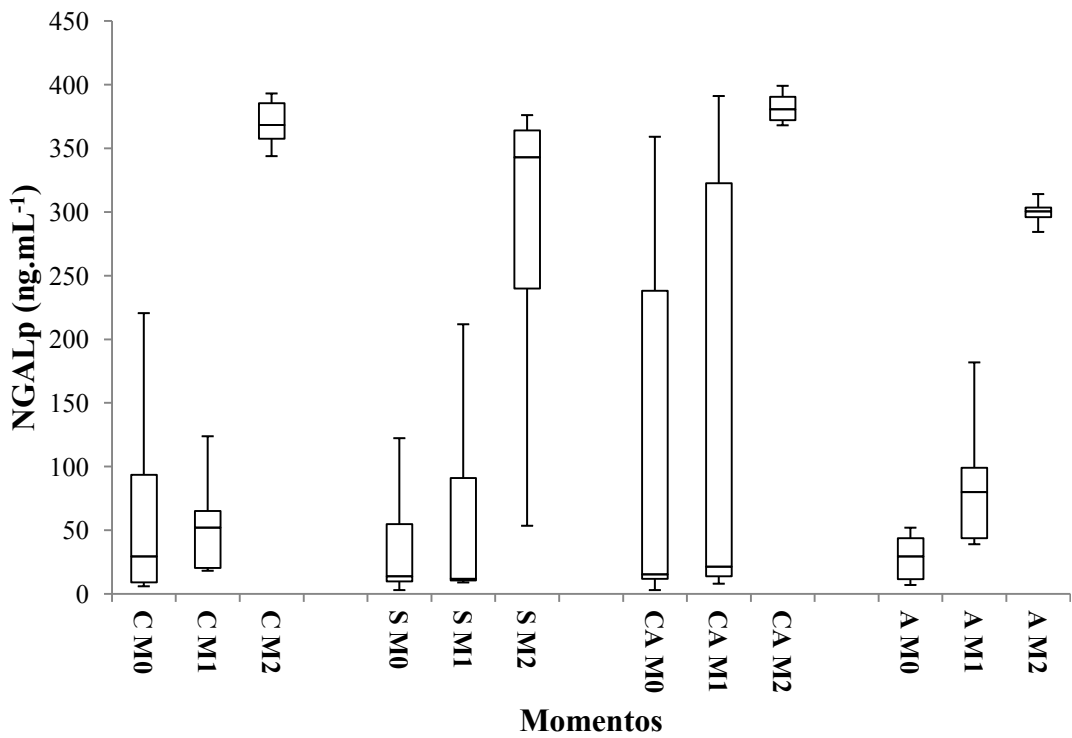
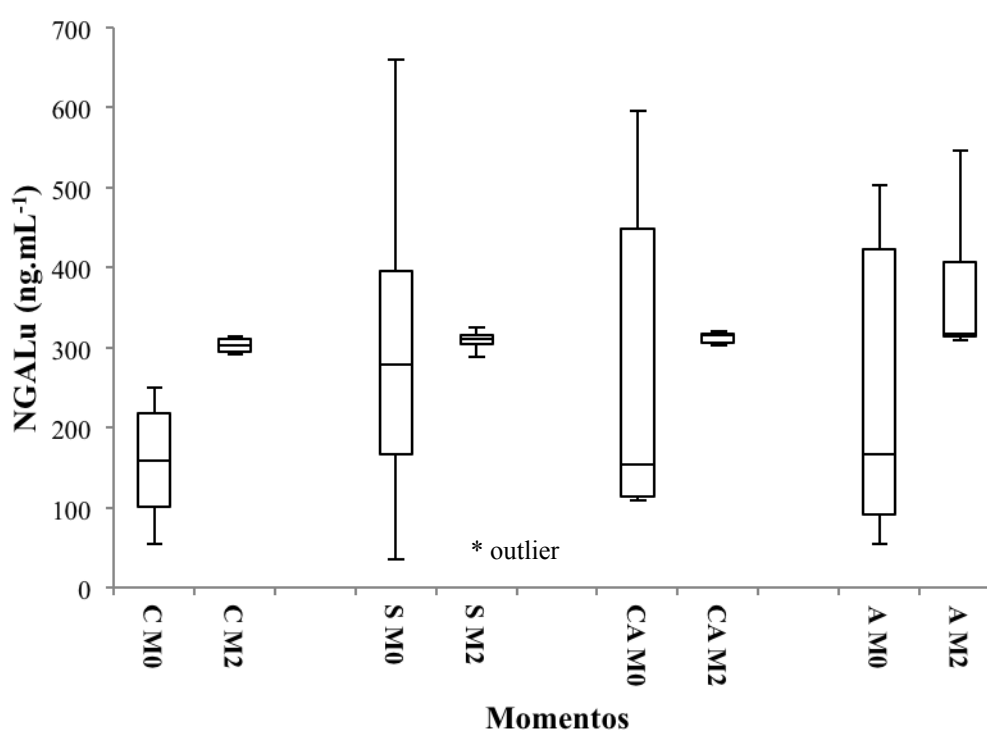


Figura 8 - Boxplot - NGALp ao longo do experimento.

Tabela 8 - Análise longitudinal do biomarcador NGALu (ng.mL⁻¹)

Grupo	M0	M2	Efeito Tempo ^a	Teste de contrastes
	med [AIQ]	med [AIQ]		
C	159 [101;218,6]	303 [295;311]	0,046	M0 < M2
S	278,6 [166,4;396,3]	311 [304,3;315]	0,99	
CA	154,6 [114;448,6]	315 [306;318]	0,25	
A	167,5 [91,6;423,6]	317 [313,5;406,8]	0,12	

med: Mediana [AIQ]: Amplitude interquartil

^a ANOVA para medidas repetidas no interior de cada grupo experimental**Figura 9** - Boxplot - NGALu ao longo do experimento.

Pela ANOVA para medidas repetidas, observou-se que existe variação significativa nas medidas NGALu apenas no grupo C e que houve variação significativa na NGALp nos grupos C ($p=0,0001$), S ($p=0,001$), CA ($p=0,001$) e A ($p=0,0001$) ao longo do experimento. Pelos testes de contrastes, identificou-se, ao nível de 5%, que o momento M2 foi significativamente maior que os momentos M0 e M1 nos grupos C, S e CA, e um aumento progressivo significativo entre M0, M1 e M2 no grupo A. Não existe diferença significativa, ao nível de 5%, entre M0 e M1 nos grupos C, S e CA. Conforme ilustra a

Figura 8 e Figura 9.

Tabela 9 - ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para os biomarcadores NGALp e NGALu

Variável	Efeito Principal			Análise de Contraste entre grupos		
	Grupo	Tempo	Interação	par de momento	<i>p valor</i>	Comentários
NGALp	0,33	0,0001	0,76	M0 x M1	0,42	$C \approx S \approx CA \approx A$
				M0 x M2	0,99	$C \approx S \approx CA \approx A$
				M1 x M2	0,50	$C \approx S \approx CA \approx A$
NGALu	0,89	0,026	0,46	M0 x M2	0,46	$C \approx S \approx CA \approx A$

Pela ANOVA para medidas repetidas com um fator não foi observado efeito significativo nas variáveis NGALp e NGALu.

Análise de contrastes para variável NGALp mostrou que não existe diferença significativa na variação da NGALp do M0 para M1 ($p=0,42$), do M0 para M2 ($p=0,99$) e nem do M1 para M2 ($p=0,50$) entre os grupos experimentais, ou seja, os quatro grupos evoluem de forma semelhante.

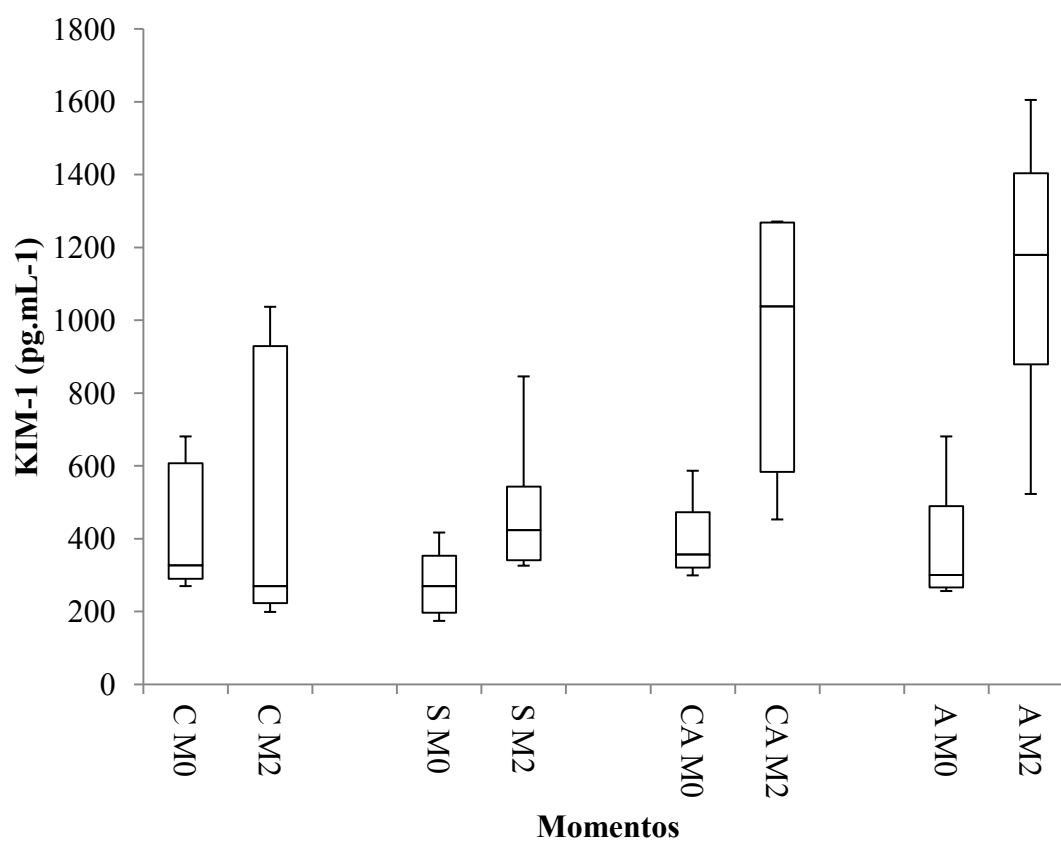
Análise de contrastes para variável NGALu mostrou que não existe diferença significativa na variação da NGALu do M0 para M2 ($p=0,46$) entre os grupos experimentais, ou seja, os quatro grupos evoluem de forma semelhante.

4.6 KIM-1

Tabela 10 - Análise longitudinal do biomarcador KIM-1 (pg.mL⁻¹)

Grupo	M0		M2		Efeito Tempo ^a	Teste de contrastes
	med	[AIQ]	med	[AIQ]		
C	327	[289,8;607]	270	[223,5;929]	0,94	M0 < M2
S	270,1	[196,8;353,5]	423,5	[340,8;542,8]	0,029	
CA	356,5	[320,5;473,2]	1038	[583,5;1268,5]	0,005	
A	300,5	[265,9;489,9]	1180	[879,3;1403,3]	0,011	

med: Mediana [AIQ]: Amplitude interquartil

^a ANOVA para medidas repetidas no interior de cada grupo experimental**Figura 10** - KIM-1 ao longo do experimento.

A ANOVA para medidas repetidas mostrou que houve variação significativa no KIM-1 nos grupos S ($p=0,029$), CA ($p=0,005$) e A ($p=0,011$) ao longo do experimento. Pelos testes de contrastes, identificou-se, ao nível de 5%, que o momento M2 foi significativamente maior que o momento M0 nos grupos S, CA e A, conforme ilustra a **Figura 10**.

Tabela 11 - ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para o biomarcador KIM-1

Variável	Efeito Principal			Análise de Contraste entre grupos		
	Grupo	Tempo	Interação	par de momento	<i>p valor</i>	Comentários
KIM-1	0,004	0,0001	0,050	M0 x M2	0,050	A > C S e CA intermediários

Pela ANOVA para medidas repetidas com um fator, observou-se o efeito significativo da interação da variável KIM-1 ($p=0,05$).

A análise de contrastes para variável KIM-1 mostrou que existe diferença significativa na variação do KIM-1 do M0 para M2 entre os grupos experimentais ($p=0,05$). Identificou-se, ao nível de 5%, que o grupo A apresentou aumento significativamente maior que o grupo C (C não variou significativamente).

4.7 IL-18

Tabela 12 - Análise longitudinal do biomarcador IL-18 (pg.mL⁻¹)

	M0	M2	Efeito Tempo ^a	Teste de contrastes
	med [AIQ]	med [AIQ]		
C	41,5 [23,7;58,7]	138 [95;142,5]	0,006	M0 < M2
S	41,1 [30,9;46,1]	119 [100;171,5]	0,0001	
CA	34,4 [28,8;36,5]	143 [87;158,5]	0,001	
A	36,6 [30,3;41]	267,5 [129,5;474,5]	0,005	

med: Mediana [AIQ]: Amplitude interquartil

^a ANOVA para medidas repetidas no interior de cada grupo experimental

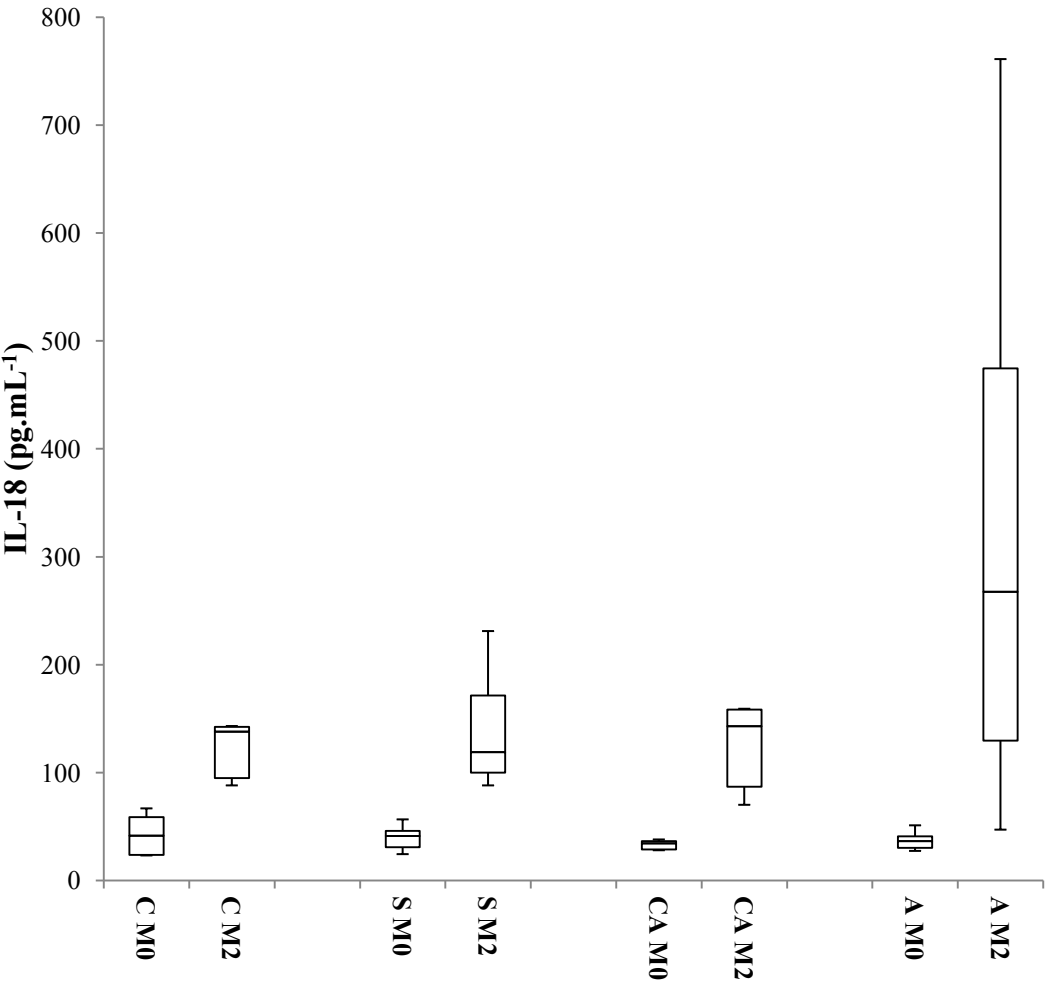


Figura 11 - IL-18 ao longo do experimento.

Pela ANOVA para medidas repetidas, observou-se que existe variação significativa na medida de IL-18 em todos os grupos ao longo do experimento. Segundo os testes de contrastes, observou-se aumento na IL-18 no momento M2, conforme ilustra a **Figura 11**.

A ANOVA para medidas repetidas mostrou que houve variação significativa na IL-18 nos grupos C ($p=0,0006$), S ($p=0,0001$), CA ($p=0,001$) e A ($p=0,005$) ao longo do experimento. Pelos testes de contrastes, identificou-se, ao nível de 5%, que o momento M2 foi significativamente maior que o momento M0 em todos os grupos.

Tabela 13 - ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para o biomarcador IL-18

Variável	Efeito Principal			Análise de Contraste entre grupos		
	Grupo	Tempo	Interação	par de momento	<i>p valor</i>	Comentários
IL-18	0,27	0,0001	0,16	M0 x M2	0,16	$C \approx S \approx CA \approx A$

A análise de contrastes para variável IL-18 mostrou que não existe diferença significativa na variação do IL-18 do M0 para M2 ($p=0,16$) entre os grupos experimentais, ou seja, os quatro grupos evoluem de forma semelhante.

4.8 Creatinina

Tabela 14 - Análise longitudinal da creatinina (mg.dL⁻¹)

Grupo	M0	M1	M2	Efeito Tempo ^a	Teste de contrastes
	med ± DP	med ± DP	med ± DP		
C	0,46 ± 0,07	0,79 ± 0,2	3,36 ± 2,2	0,0001	M0 < M1 < M2
S	0,43 ± 0,1	0,45 ± 0,08	0,58 ± 0,07	0,0008	(M0 ≈ M1) < M2
CA	0,41 ± 0,08	0,59 ± 0,06	0,93 ± 0,63	0,007	M0 < (M1 ≈ M2)
A	0,49 ± 0,16	0,74 ± 0,13	2,24 ± 1,34	0,0001	M0 < M1 < M2

med: média DP: desvio padrão

^a ANOVA para medidas repetidas no interior de cada grupo experimental

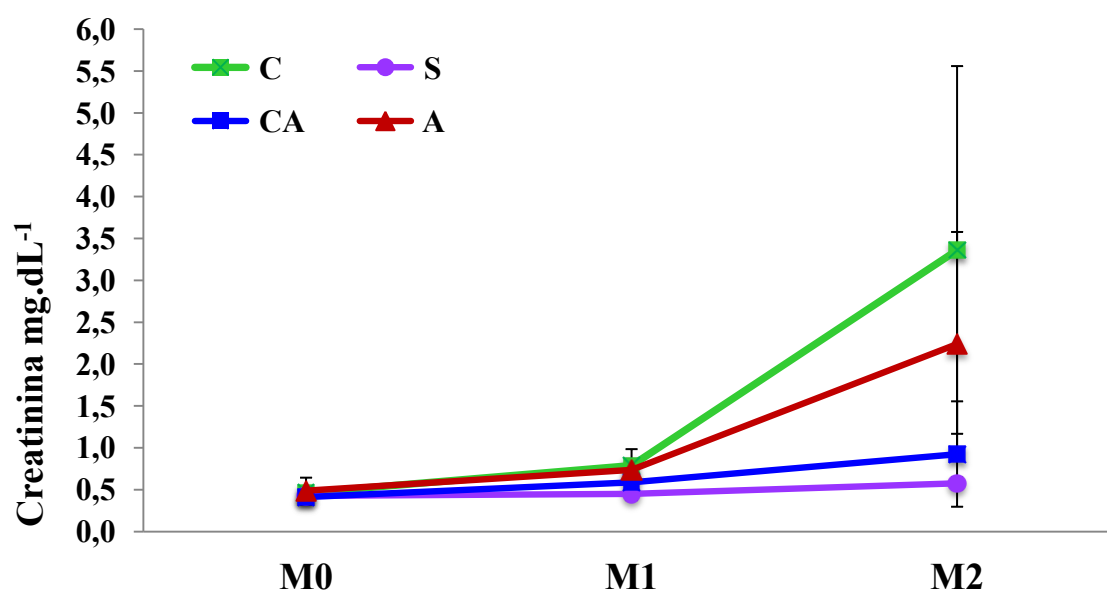


Figura 12 - Creatinina ao longo do experimento.

Pela ANOVA para medidas repetidas, observou-se que existe variação significativa nas medidas de creatinina nos grupos ao longo do experimento. De uma forma geral, segundo os testes de contrastes, observou-se aumento na creatinina, principalmente no momento M2, conforme ilustra a **Figura 12**.

Tabela 15 - ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para a creatinina

Variável	Efeito Principal		Análise de Contraste entre grupos			
	Grupo	Tempo	Interação	par de momento	p valor	Comentários
Creatinina	0,0001	0,0001	0,0001	M0 x M1	0,009	(C $\approx$ CA $\approx$ A) > S
				M0 x M2	0,001	C > (S $\approx$ CA), A > S, C $\approx$ A
				M1 x M2	0,011	C > (S $\approx$ CA), A > S, C $\approx$ A

Pela ANOVA para medidas repetidas com um fator, observou-se o efeito significativo da interação na creatinina ($p=0,0001$).

A análise de contrastes para variável creatinina mostrou que existe diferença significativa na variação da creatinina do M0 para M1 entre os grupos experimentais ($p=0,009$). Identificou-se, ao nível de 5%, que os grupos C, CA e A apresentaram aumento significativamente maior que o grupo S. Não existem diferenças significativas entre C, CA e A (os grupos evoluem de forma semelhante).

Existe diferença significativa na variação da creatinina do M0 para M2 entre os grupos experimentais ($p=0,001$). Identificou-se, ao nível de 5%, que o grupo C apresentou aumento significativamente maior que os grupos S e CA, e o grupo A apresentou aumento significativamente maior que o grupo S. Não existem diferenças significativas entre C e A e nem entre S e CA.

Existe diferença significativa na variação da creatinina do M1 para M2 entre os grupos experimentais ($p=0,011$). Identificou-se, ao nível de 5%, que o grupo C apresentou aumento significativamente maior que os grupos S e CA, e o grupo A apresentou aumento significativamente maior que o grupo S. Não existem diferenças significativas entre C e A e nem entre S e CA.

4.9 Ureia

Tabela 16 - Análise longitudinal da ureia (mg.dL^{-1})

Grupo	M0 med $\pm$ DP	M1 med $\pm$ DP	M2 med $\pm$ DP	Efeito Tempo ^a	Teste de contrastes
C	37,8 $\pm$ 6,1	44,6 $\pm$ 6,6	147,1 $\pm$ 58,4	0,0001	M0 < M1 < M2
S	39,9 $\pm$ 5,5	40,8 $\pm$ 5,2	50,4 $\pm$ 4,7	0,002	(M0 $\approx$ M1) < M2
CA	37,1 $\pm$ 3,6	43,1 $\pm$ 4,3	85,1 $\pm$ 48,3	0,001	M0 < M1 < M2
A	50,1 $\pm$ 7,1	55,1 $\pm$ 8,1	207,1 $\pm$ 115,9	0,0001	(M0 $\approx$ M1) < M2

med: média DP: desvio padrão

^a ANOVA para medidas repetidas no interior de cada grupo experimental

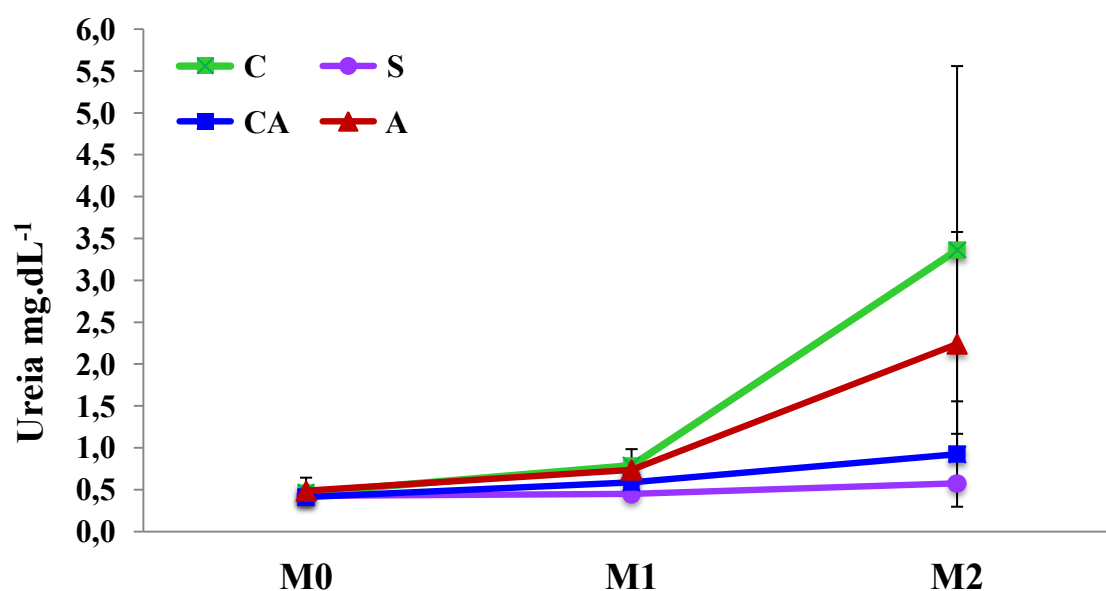


Figura 13 - Ureia ao longo do experimento.

Pela ANOVA para medidas repetidas, observou-se que existe variação significativa na medida de ureia em todos os grupos ao longo do experimento. De uma forma geral, segundo os testes de contrastes, observou-se aumento nos níveis de ureia, principalmente no momento M2, conforme ilustra a Figura 13.

Tabela 17 - ANOVA para medidas repetidas com um fator e a análise de contraste entre grupos para a ureia

Variável	Efeito Principal		Interação	Análise de Contraste entre grupos		
	Grupo	Tempo		par de momento	<i>p</i> valor	Comentários
Ureia	0,0001	0,0001	0,0001	M0 x M1	0,041	(C $\approx$ CA) > S
				M0 x M2	0,0004	(C $\approx$ A) > S, CA intermediário
				M1 x M2	0,002	(C $\approx$ A) > S, CA intermediário

Pela ANOVA para medidas repetidas com um fator, observou-se o efeito significativo da interação na ureia ($p=0,0001$). A análise de contrastes para variável ureia mostrou que existe diferença significativa na variação da ureia do M0 para M1 entre os grupos experimentais ($p=0,041$). Identificou-se, ao nível de 5%, que os grupos C e CA apresentaram aumento significativamente maior que o grupo S. Não existem diferenças significativas entre C, CA e A (os grupos evoluem de forma semelhante).

Existe diferença significativa na variação da ureia do M0 para M2 entre os grupos experimentais ($p=0,0004$). Identificou-se, ao nível de 5%, que os grupos C e A apresentaram aumento significativamente maior que o grupo S. Não existem diferenças significativas entre C, CA e A e nem entre S e CA (CA grupo intermediário).

Existe diferença significativa na variação da ureia do M1 para M2 entre os grupos experimentais ($p=0,002$). Identificou-se, ao nível de 5%, que os grupos C e A apresentaram aumento significativamente maior que o grupo S. Não existem diferenças significativas entre C, CA e A e nem entre S e CA (CA grupo intermediário).

4.10 Critérios de RIFLE e AKIN

Mesmo levando em consideração as diferenças existentes entre as classificações de RIFLE e AKIN, em nosso trabalho encontramos valores iguais para as duas classificações em todos os indivíduos estudados.

A **Tabela 18** fornece a frequência e o percentual da classificação RIFLE/AKIN no momento M1 e M2 segundo o grupo experimental. Devido o tamanho muito reduzido da amostra em cada grupo experimental o teste estatístico não processa. Observa-se que existe piora expressiva do momento M1 para o momento M2 na classificação de RIFLE/AKIN em todos os grupos experimentais, principalmente nos grupos C e A.

Tabela 18 - Classificação de RIFLE/AKIN no momento M1 e M2

RIFLE/ AKIN	Grupo C				Grupo S				Grupo CA				Grupo A			
	M1		M2		M1		M2		M1		M2		M1		M2	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Normal/0	2	25	1	12,5	8	100	4	50	5	62,5	3	37,5	2	25	2	25
Risk/1	4	50	0	0	0	0	4	50	3	37,5	2	25	5	62,5	0	0
Injury/2	2	25	1	12,5	0	0	0	0	0	0	1	12,5	1	12,5	0	0
Failure/3	0	0	6	75	0	0	0	0	0	0	2	25	0	0	6	75

4.11 Histopatologia

A classificação do grau de lesão segundo a histologia foi obtida por uma avaliação semiquantitativa variando de 0 a 5, onde zero corresponde a ausência de lesão e cinco uma lesão de alta gravidade. Sendo assim, para maior abrangência analítica, foi proposto analisar os dados sob o ponto de vista discreto (numérico).

Tabela 19 - Grau de lesão histológica em rim direito

Grupo	mediana	[AIQ]	
C	0	[0;0]	$C \approx S \approx CA \approx A$
S	0	[0;0]	
CA	0	[0;0]	
A	0	[0;0]	

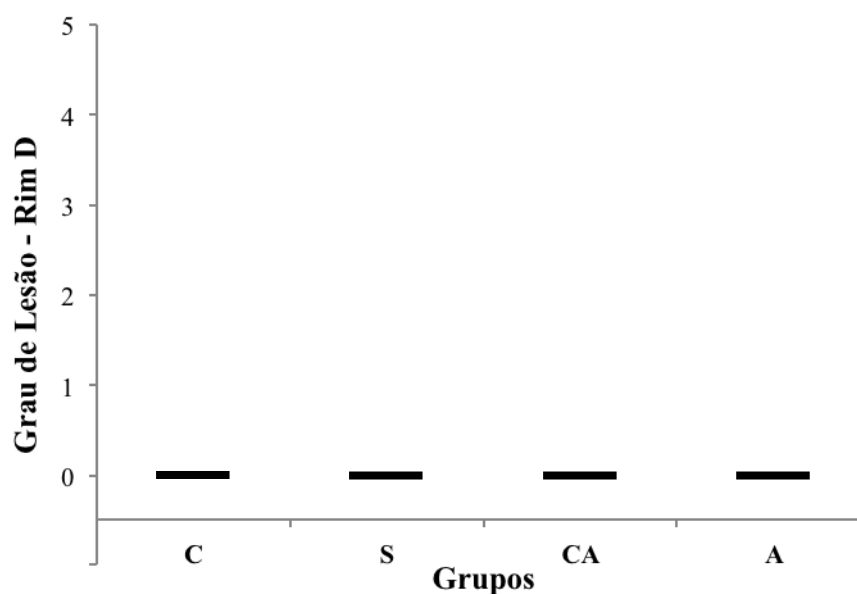


Figura 14 - Grau de lesão histológica em rim direito.

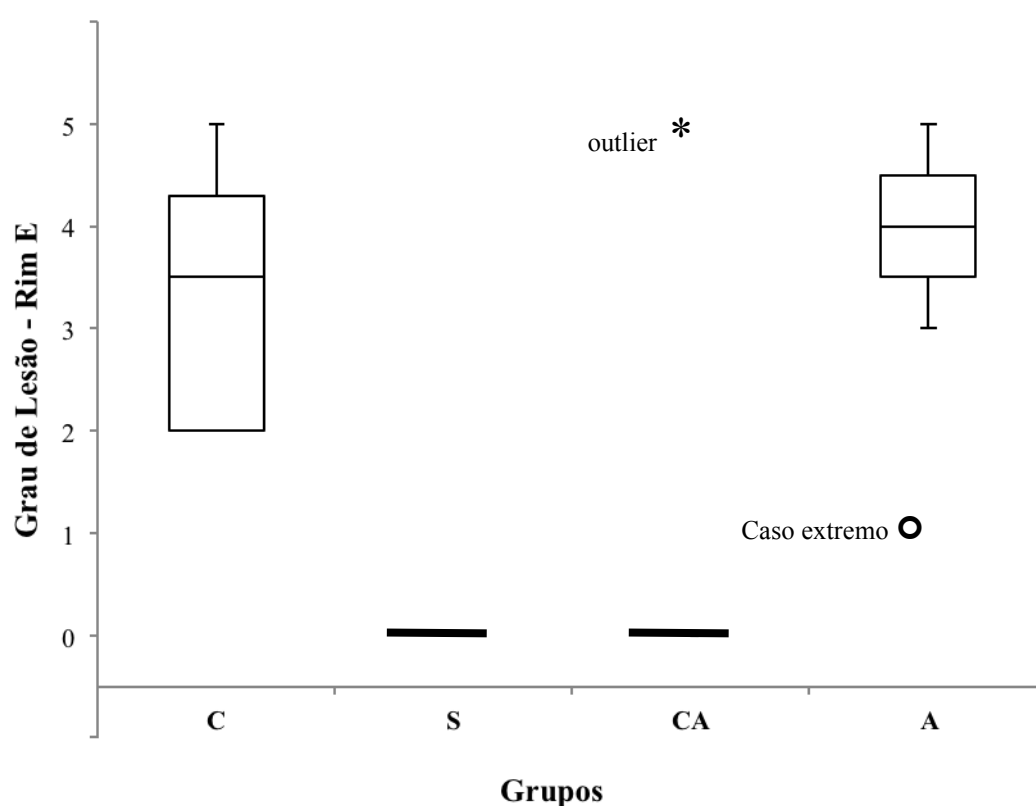
Não houve diferença na análise estatística dos rins direitos, sendo todos os grupos idênticos com ausência de lesão.

Tabela 20 - Grau de lesão histológica em rim esquerdo

Grupo	mediana	interquartil	<i>p</i> valor ^a	diferenças significativas ^b
C	3,5	[2,25;4]	0,0002	(C $\approx$ A) > (S $\approx$ CA)
S	0	[0;0]		
CA	0	[0;0]		
A	4	[3,5;4,5]		

^a ANOVA de Kruskal-Wallis.

^b teste de comparações múltiplas de Dunn, ao nível de 5%.

**Figura 15** - Grau de lesão histológica em rim esquerdo.

Observou-se que existe diferença significativa no grau de lesão pela histopatologia entre os grupos experimentais ($p=0,0002$). Os grupos C e A apresentaram grau de lesão do lado esquerdo significativamente maior que os grupos S e CA. Não existe diferença significativa, ao nível de 5%, entre C e A e nem entre S e CA.

5 Discussão

5.1 Modelo Animal

Esse experimento utilizou o modelo de I/R em ratos, desenvolvido pelo Laboratório Experimental de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. É um modelo consolidado, tendo sido utilizado para estudos de proteção renal em mais de 1000 ratos *Wistar*. Os animais provenientes do Biotério Central da UNESP - Botucatu foram gerados e criados em cativeiro, sendo submetidos às mesmas condições de ambientação e alimentação. Receberam controle interno de zoonoses e apresentavam maturidade semelhante.

Os indivíduos da amostra eram todos do sexo masculino e foram selecionados de maneira aleatória. A amostra apresentou uma distribuição homogênea, não havendo diferença significativa para a variável peso. Para este experimento foram escolhidos ratos machos por serem mais suscetíveis à lesão por I/R, mediada por ativação diferencial do sistema nervoso simpático renal⁽⁵¹⁾.

O tempo de isquemia influencia diretamente os níveis de creatinina plasmática e o grau de lesão. Vinte e cinco minutos de isquemia arterial dobram os valores basais e 45 minutos resultam em um aumento de 7 a 8 vezes nos níveis plasmáticos de creatinina, com grau de necrose significante ($>75\%$)⁽⁵⁰⁾. O tempo de 30 minutos foi utilizado por causar lesões renais isquêmicas moderadas, uma vez que necrose massiva teria impedido exame histológico relevante e por ter sido usado anteriormente em outros modelos animais⁽⁵²⁾. Em trabalho recente, os níveis de NGALu demonstraram que o período de 30 minutos de isquemia é o ideal para atingir nível de pico de dano renal⁽⁵³⁾.

A isquemia renal temporária foi executada com *clamp* microvascular atraumático, garantindo assim a integridade vascular e subsequente reperfusão adequada após a retirada do *clamp* e liberação do fluxo arterial. Nos animais que foram submetidos à I/R, após o clampeamento da artéria renal esquerda, foi observada a mudança da coloração do rim para vermelho escuro (cianose) com aspecto de mosaico. Após a liberação do clampeamento ocorreu o retorno progressivo para a coloração e aspecto iniciais, possibilitando uma avaliação macroscópica adequada da interrupção do

fluxo sanguíneo e do seu retorno durante a fase de reperfusão.

Foi realizada nefrectomia direita para que não houvesse compensação pelo rim contralateral. Em trabalhos anteriores já foi demonstrado que a nefrectomia unilateral determina recuperação mais rápida da falência renal, menor lesão isquêmica e maior produção de fatores humorais que estimulam a recuperação renal compensatória⁽⁵²⁾.

É importante a manutenção da temperatura em modelos de I/R renal porque a hipotermia protege o órgão e a hipertermia causa um grau de lesão maior. Sabe-se que o grau de lesão funcional, medida pela creatinina, apresenta uma correlação positiva com temperatura corporal, e que o dano estrutural, observado na histologia, apresenta piora com aumento da temperatura corporal durante o período de isquemia. Ambos efeitos já foram demonstrados em modelo experimental prévio⁽⁵⁴⁾. Os efeitos da variação da temperatura na gravidade da lesão renal após período isquêmico também já foi observada no passado por Delbridge *et al.* que observou que a temperatura do animal durante a fase isquêmica também afeta significativamente a gravidade da lesão⁽⁵⁵⁾.

Durante o experimento vários fatores podem alterar a temperatura. As soluções administradas são frias, perda de calor pela abertura da cavidade abdominal, respiração sem reinalação, sem umidificação e sem aquecimento do ar são fatores que promovem perda rápida de calor. A manutenção da temperatura foi realizada com a colocação de bolsas térmicas sob e sobre o animal e o controle da temperatura foi contínuo através de sensor retal, na tentativa de manter normotermia. Apesar disso, encontramos uma diferença estatística demonstrando que o Grupo S, entre T1 e T2, apresentou uma maior variação na temperatura do que os outros grupos. Porém, esse achado não influenciou os resultados porque a suscetibilidade renal à lesão isquêmica, apesar de ser influenciada pela temperatura, na ausência de isquemia renal não apresenta efeito adverso sobre a função e morfologia renais⁽⁵⁴⁾. De fato, a isquemia ocorreu entre T0 e T1 e na análise estatística esse período não apresentou diferença significativa entre os grupos ($p=0,22$). A ausência de alterações histológicas no grupo S, demonstra que esse achado não interferiu nos demais resultados encontrados.

Nesse experimento todos os ratos foram anestesiados com isoflurano. Já foi demonstrado que ratos que receberam anestésicos voláteis durante o período de I/R apresentaram níveis menores de creatinina sérica e menores graus de necrose renal. Mecanismo atribuído a diminuição da expressão da proteína ICAM-1 e da diminuição

da atividade da mieloperoxidase no córtex renal⁽⁵⁶⁾. O isoflurano também diminuiu a dano da lesão de I/R em ratos reduzindo a inflamação pela modulação do influxo de leucócitos (neutrófilos, macrófagos e NK1.1+) e do influxo precoce de linfócitos-T⁽⁵⁷⁾.

Estudos de I/R em ratos que apresentam valores de saturação de oxigênio, medida pela oximetria de pulso, são incomuns. Esse parâmetro não foi estudado, apesar de ser uma monitorização importante para evidenciar oxigenação adequada. Os animais foram mantidos em ventilação espontânea e sob monitorização visual constantes, tanto de amplitude quanto frequência respiratória. Em nenhum momento durante o experimento foram observadas dificuldades ventilatórias, evidenciando uma adequação da ventilação durante a anestesia.

5.2 Isquemia/Reperusão

Os valores encontrados de PAM revelaram diferença estatística na análise longitudinal dos grupos A e C, com níveis menores em T1. O instante T1 ocorreu 1 minuto após liberação do *clamp* da artéria renal esquerda e esse achado ocorre pela liberação de fatores humorais na síndrome pós-isquêmica.

Na análise de contrastes encontramos diferença entre T0 e T1 e entre T0 e T2 com maiores valores pressóricos nos grupos S e CA comparados com A e C. A queda na PAM ativa mecanismos compensatórios na tentativa de manter a perfusão renal. Os mecanismos compensatórios ativados durante e após a síndrome isquêmica podem contribuir para a piora do quadro de LRA. Já foi descrito que o excesso na liberação de noradrenalina nos terminais nervosos induzida pela excesso de ativação dos nervos simpáticos renais é um possível fator causal no desenvolvimento e piora da LRA⁽⁵⁸⁾. Além disso, supressão de níveis elevados de noradrenalina na veia renal após a reperusão atenua a lesão renal de I/R, uma vez que quando é realizada a denervação renal ou bloqueio gangliônico a disfunção renal ocorre em menor intensidade. Este mecanismo é mediado por receptores α -1 adrenérgicos⁽⁵⁹⁾, enquanto que o bloqueio dos receptores β -1 adrenérgicos parecem não exercer influência sobre a gravidade da lesão⁽⁵²⁾. Embora a vasoconstrição seja relacionada com a diminuição do RFG e cause repercussão sobre os túbulos renais, não explica todo o tipo de dano ocasionado, pois os eventos iniciados pelo componente vascular podem ser continuados pelos mediadores

inflamatórios glomerulares e tubulares.

A evolução da lesão renal foi semelhante nos grupos submetidos a I/R ($A \approx C$), com progressivo aumento das variáveis funcionais e lesão histológica confirmando tal evidência. As variáveis NGALp, NGALu, IL-18, creatinina e ureia não revelaram efeito de interação, todos apresentando com $p > 0,05$. Apenas o biomarcador KIM-1 diferenciou os grupos, evidenciado grupo $A > C$, porém não podemos afirmar que o alopurinol piorou a LRA dado que os grupos S, CA apresentaram valores intermediários. Evidenciado que alopurinol não exerceu efeito protetor nem efeito danoso aos rins submetidos a I/R.

Os grupos S e CA, que somente foram submetidos à nefrectomia direita sem isquemia renal esquerda, apresentaram alterações nos valores da creatinina plasmática na análise longitudinal, porém a elevação foi, de uma maneira geral, menor que a encontrada nos grupos que sofreram I/R, evidenciando $C \approx A$, $C > (S \approx CA)$, $A > S$, e tendência de $A > CA$. Achado semelhante ocorreu com a ureia onde encontramos $(C \approx A) > S$, CA intermediário. Já nos biomarcadores novos não foi encontrado efeito de interação sendo todos os grupos S e CA semelhantes para as variáveis NGALp, NGALu, KIM-1 e IL-18. Achados que demonstram que o alopurinol *per se* não causa lesão renal.

A nefrectomia realizada a direita é considerada uma cirurgia de grande porte. Esse tipo de cirurgia submete as cobaias a um *stress* cirúrgico grande com consequente ativação intensa do sistema nervoso simpático e ativação de grande resposta inflamatória sistêmica. A ativação do sistema nervoso simpático, com indução de aumento na atividade nervosa simpática renal, a perda de fluidos no transoperatório juntamente com a resposta inflamatória sistêmica podem ter contribuído na elevação dos biomarcadores sem dano estrutural ou alteração da função renal.

Inicialmente postulou-se que o efeito protetor do alopurinol em tecido isquêmico seria mediado pela inibição da formação de EROs gerados durante *stress* oxidativo. Uma forma de quantificar o *stress* oxidativo *in vivo* é através da medida dos níveis de 8-isprostano. Wang *et al.* demonstraram que os níveis de 8-isoprostrano só aumentam significativamente após 60 minutos de isquemia, não sofrendo alterações significativas em isquemias de 15, 30 e 45 minutos⁽⁶⁰⁾. No mesmo estudo os autores compararam os níveis de 8-isprostano em ratos, 30 minutos após sofreram isquemia

renal por um período de 60 minutos, divididos em dois grupos, um que recebeu alopurinol na dose de 100 mg.kg^{-1} endovenoso e outro grupo não recebeu medicação alguma. Demonstraram que os níveis de 8-isoprostano foi menor no grupo que recebeu alopurinol ($p=0,022$), evidenciando uma diminuição no *stress* oxidativo com uso de alopurinol. Estudo posterior de Keel *et al.*, encontrou achados semelhantes⁽⁶¹⁾, e formulou-se a hipótese que o alopurinol exerce efeito protetor em isquemias com tempo de duração maiores que 60 minutos.

Rhoden *et al.* realizaram estudo de I/R em modelo animal testando alopurinol como fator protetor. Nesse estudo os ratos foram nefrectomizados a direita 7 dias antes dos procedimentos de isquemia. Entre os grupos que sofreram isquemia, um recebeu alopurinol intraperitoneal na dose de 50 mg.mL^{-1} , 5 horas e 1 hora antes da isquemia, e o outro grupo serviu como controle. No grupo pré-tratado com alopurinol o aumento na creatinina sérica foi atenuado, bem como o *clearance* de creatinina 24 e 96 horas após reperusão. Nesse mesmo estudo foi medida de maneira indireta o índice de peroxidação de lipídeos com os resultados expresso pelos níveis de malondialdeído. Também encontraram uma diminuição dos índices de peroxidação de lipídeos nos grupos pré-tratados com alopurinol, indicando efeito protetor do alopurinol por diminuir a lesão das proteínas e dos lipídeos celulares⁽⁴⁵⁾.

Em outro modelo animal de rim único, os autores submeteram ratos a 15, 30 e 60 minutos de isquemia renal esquerda e realizaram medidas de NGALu após 30, 45 e 60 minutos de reperusão, divididos em dois grupos, um pré tratado com alopurinol endovenoso e outro sem tratamento algum. Encontraram, em ratos pré-tratados com alopurinol, aumentos menores valores de NGALu em isquemias maiores de 30 minutos em todos os tempos de reperusão⁽⁵³⁾.

Nos quatro estudos citados, podemos destacar que a via de administração do alopurinol foi diferente (endovenosa em 3 e intraperitoneal em 1) da utilizada no modelo dessa pesquisa (gavagem - via oral). Apesar dessa diferença acredita-se que o alopurinol dado por via oral não apresenta diminuição na sua eficácia já que apresenta uma biodisponibilidade de 80% com picos entre 60 e 90 minutos⁽⁴³⁾ e nesse modelo experimental o alopurinol foi administrado 60 minutos antes do animal receber anestesia.

A análise histológica demonstrou ausência de lesão nos rins direitos de todos os grupos. Essa avaliação histológica serviu como controle do rim contralateral, aumentando a confiabilidade da avaliação histológica.

A análise histológica das lâminas dos rins esquerdos, utilizando o escore de lesão proposto por Park *et al.* em 2008 para a avaliação da necrose tubular, demonstrou que os animais pertencentes aos grupos S e CA não apresentaram lesão, e estão de acordo com outros trabalhos na literatura⁽⁴⁵⁾. Já nos grupos C e A, 100% dos indivíduos apresentaram lesões de graus variados com medianas de 3,5 e 4 respectivamente, maiores em relação aos grupos S e CA, porém semelhantes entre si. Evidenciado que, semelhante aos achados funcionais, do ponto de vista histológico, o alopurinol não exerceu efeito protetor nem efeito danoso para os rins submetidos a I/R.

No trabalho de Rhoden *et al.* citado anteriormente, os autores encontraram lesão renal em todos os animais que sofreram isquemia. O grau de lesão 24 horas após a reperusão foi similar nos dois grupos. No entanto, a análise histológica realizada 8 dias após a reperusão mostrou atrofia tubular e fibrose intersticial em ambos os grupos, porém, nesse momento, o grupo pré-tratado com alopurinol diferenciou-se apresentando efeito protetor⁽⁴⁵⁾. Este estudo sugere que o efeito protetor do alopurinol, medido pelo grau de lesão histológica, só seria evidenciado após transcorridos 8 dias.

Na presente pesquisa, foram avaliados a função, a histologia renal e os biomarcadores novos em ratos submetidos a lesão de I/R renal anestesiados com isoflurano e o objetivo foi avaliar se o alopurinol exerce efeito protetor sobre os rins submetidas a esse estímulo. Segundo os dados encontrados nesse modelo, não houve benefício na utilização de alopurinol na dose de 100 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ sobre os efeitos da lesão de I/R. Conclusão divergente dos outros trabalhos citados que sugerem que o uso de alopurinol pode diminuir a formação de EROs e grau de lesão renal.

Utilizando os critérios de RIFLE e AKIN percebeu-se uma piora em todos os grupos, porém foi mais intensa nos grupos A e C com 75% dos indivíduos encontrando-se na classe R/3 em M2 e discreta nos grupos S e CA com cerca de 80% dos indivíduos encontrando-se nas classes R/1 e normal nesse mesmo momento. Para que pudéssemos testar estatisticamente se existe correlação dos níveis de biomarcadores com o grau de gravidade nos critérios de RIFLE/AKIN necessariamente deveríamos ter uma amostra de tamanho maior. Contudo os resultados podem ser valorizados do ponto de vista

clínico.

O diagnóstico de LRA utilizando os critérios de AKIN e RIFLE são limitados, uma vez que creatinina e DU refletem indiretamente que o dano renal já ocorreu. Tentando caracterizar os vários aspectos da doença, identificar indivíduos em risco e introduzir terapêuticas pré-clínicas o décimo consenso do ADQI sugeriu o uso dos novos biomarcadores no diagnóstico e estratificação de risco dos pacientes em 4 subgrupos (**Figura 16**)⁽⁶²⁾ e recomendam a modificação dos critérios de AKIN/RIFLE para incorporar o uso de biomarcadores de lesão renal (**Figura 17**)⁽⁶²⁾.

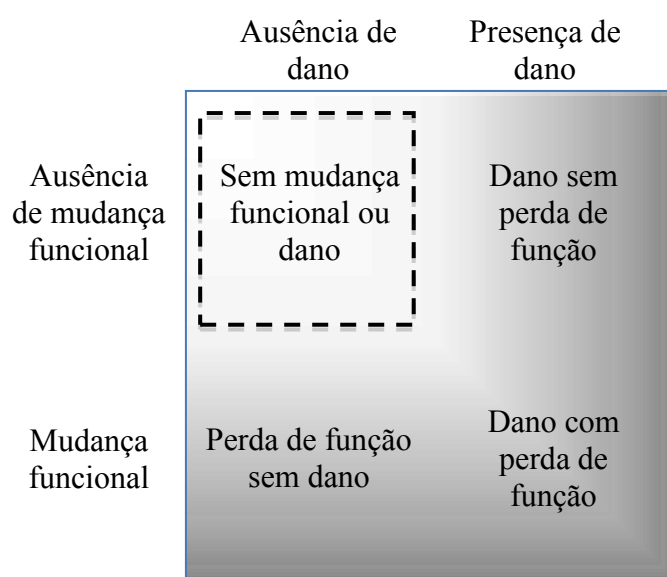


Figura 16 - Novo espectro de LRA: combinação de marcadores funcionais e de dano. Adaptado de McCullough⁽⁶²⁾.

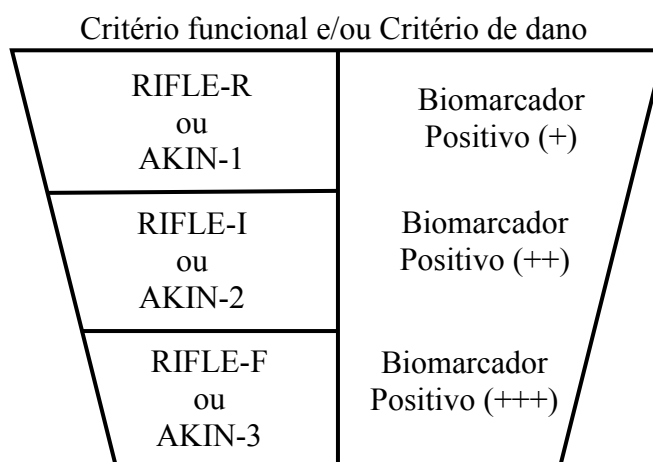


Figura 17 - Novos critérios para o diagnóstico de LRA. Adaptado de McCullough⁽⁶²⁾.

O novo critério proposto (Figura 17) necessita de refinamento para determinar

qual biomarcador e quais os valores limiares devem ser utilizados para estadiamento inicial. Baseados em nosso conhecimento atual o estadiamento de LRA utilizando apenas os biomarcadores ainda não pode ser justificado. Poderemos utilizá-los com essa finalidade quando tivermos uma melhor compreensão do padrão de elevação e desfechos clínicos associados com o nível de biomarcadores. Apesar da recomendação de uso dos biomarcadores como critério diagnóstico o consenso reconhece que atualmente a creatinina e o DU continuam sendo os melhores marcadores biológicos de LRA e não devem ser descartados.

Em revisão da literatura recente, o diagnóstico de LRA utilizando os biomarcadores novos em população pediátrica, apresentou uma AUROC variando entre 0,44 a 1,00. Já o valor preditivo positivo (VPP) variou entre 27% e 100% enquanto o valor preditivo negativo (VPN) variou entre 10% e 100%. Já em pós-operatório de cirurgia cardíaca em adultos, a AUROC variou entre 0,27 e 0,98. Já o VPP e o VPN variaram entre 4% a 100% e 61% a 100% respectivamente. Os biomarcadores avaliados no contexto de pacientes atendidos na emergência apresentou AUROC variando entre 0,59 e 0,95. Nesse mesmo contexto o VPP e o VPN variaram entre 4% a 90% e 84% a 99,5% respectivamente. Em paciente internado em unidade de tratamento intensivo a AUROC variou entre 0,35 e 0,99 e o VPP e o VPN variaram entre 1% a 100% e 50% a 100% respectivamente⁽⁶³⁾.

Em relação a utilidade diagnóstica dos novos biomarcadores, percebe-se que existe uma grande diversidade de resultados, abrangendo desde estudos notoriamente negativos a estudos extremamente otimistas. Os primeiros estudos clínicos dos biomarcadores novos mostraram resultados promissores com altos valores preditivos em populações homogêneas nas quais a agressão ao rim era aguda, única e facilmente identificável como circulação extracorpórea ou uso de contraste intravenoso. A maioria dos biomarcadores não está associada apenas com dano renal, mas também com outras condições que podem levar a LRA. Por isso, em populações mais heterogêneas, com causas multifatoriais de LRA, a performance para diagnosticar o dano renal de maneira precoce tem sido equivalente a avaliação clínica e exames de laboratório padrão. De fato, pacientes pediátricos sépticos apresentam níveis maiores de NGALu e de IL-18 do que pacientes não sépticos, indicando que a associação entre NGALu/IL-18 e LRA em pacientes sépticos pode significar mais a associação entre a gravidade da doença que

simplesmente dano renal real⁽⁶⁴⁻⁶⁶⁾

Não existe dúvida que existe uma zona de intersecção onde LRA funcional e histológica coexistem em diversos graus. Em trabalho recente foi demonstrado que mesmo em casos de LRA transitória, como na depleção de volume, os marcadores de dano tubular podem estar presentes, demonstrando que LRA funcional e intrínseca são gradações de um espectro evolutivo de LRA⁽⁶⁷⁾. De fato, em estudo prospectivo realizado por Singer *et al.*, empregou-se NGALu na tentativa de distinguir entre LRA pré-renal e renal baseado na responsividade a reposição de fluidos, sendo obtido sucesso no diagnóstico diferencial em apenas 25% dos pacientes⁽⁶⁸⁾.

Deve-se avaliar com cautela a recomendação do décimo ADQI, pois a maioria dos estudos relata valores alterados dos biomarcadores em pacientes com LRA, porém existe uma sobreposição de valores substancial entre pacientes com lesão e sem lesão, dificultando a discriminação em um paciente individualizado. Para diagnóstico de LRA sub clínica já foi demonstrado que a habilidade discriminatória da NGALu é menor conforme diminui a classe do RIFLE⁽⁶⁹⁾. Além disso, estudos partem da premissa que um aumento nos níveis dos biomarcadores sem aumento na creatinina sérica indica LRA, dessa forma aumentam a sensibilidade as custas de especificidade e VPP.

Em condições de pesquisa o uso de biomarcadores altamente sensíveis são ideais para diagnosticar dano renal. Porém, em situações nas quais o momento da agressão renal é desconhecido, são necessárias múltiplas amostras, as quais todas apresentam o potencial de ser falso-positivas e podem levar a decisões clínicas equivocadas. Na prática clínica, nós precisamos definir qual o grau de dano subclínico, detectado pelo aumento somente nos níveis dos biomarcadores, serão utilizados. Para definir esse ponto de corte estudos demonstrando a relação entre o aumento dos biomarcadores e o desfecho a longo prazo são necessários.

Existe consenso de que a maioria dos biomarcadores de lesão renal que estão surgindo são capazes de detectar a LRA de maneira precoce em relação a creatinina, porém o padrão de elevação em relação ao dano renal não é completamente compreendido. A utilização de biomarcadores deve ser diferenciado para situações clínicas distintas, já que a performance é dependente da situação clínica do paciente. Uma vez que todos os parâmetros utilizados para prever e diagnosticar LRA têm suas limitações e que os biomarcadores apresentam performance variável, as informações de

microscopia urinária, bioquímica e biomarcadores utilizados em conjunto são a melhor alternativa para nos ajudar a prever a LRA e sua intensidade.

6 Considerações Finais

A creatinina sérica e o DU continuam sendo os melhores marcadores biológicos para LRA.

Estudos clínicos futuros devem ter como objetivo testar se as decisões clínicas baseadas no diagnóstico precoce de LRA com os biomarcadores novos se traduz em tratamento efetivo e benefícios clínicos.

7 Conclusão

O alopurinol na dose de $100 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, nas condições metodológicas deste experimento, não exerceu efeito protetor ou danoso ao rim sobre os efeitos da lesão de I/R.

Houve lesão funcional comprovada por aumento da ureia, creatinina em todos os grupos, porém nos grupos C e A o aumento foi mais intenso.

Os biomarcadores NGALu, NGALp, KIM-1 e IL-18 não foram específicos o suficiente para discriminar os grupos de maneira adequada.

Não houve diferença no grau de lesão histológica entre os grupos C e A.

8 Referências

1. Venkataraman R. Can we prevent acute kidney injury? *Crit Care Med.* 2008 Apr;36(4 Suppl):S166-71.
2. Lameire NH, Vanholder R. Pathophysiology of ischaemic acute renal failure. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2004 Mar;18(1):21-36.
3. Liano F, Pascual J. Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study. Madrid Acute Renal Failure Study Group. *Kidney Int.* 1996 Sep;50(3):811-8.
4. Brivet FG, Kleinknecht DJ, Loirat P, Landais PJ. Acute renal failure in intensive care units--causes, outcome, and prognostic factors of hospital mortality; a prospective, multicenter study. French Study Group on Acute Renal Failure. *Crit Care Med.* 1996 Feb;24(2):192-8.
5. Mehta RL. Outcomes research in acute renal failure. *Semin Nephrol.* 2003 May;23(3):283-94.
6. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA.* 2005 Aug 17;294(7):813-8.
7. Kellum JA, Mehta RL, Angus DC, Palevsky P, Ronco C. The first international consensus conference on continuous renal replacement therapy. *Kidney Int.* 2002 Nov;62(5):1855-63.
8. Bellomo R, Kellum JA, Mehta R, Palevsky PM, Ronco C. Acute Dialysis Quality Initiative II: the Vicenza conference. *Curr Opin Crit Care.* 2002 Dec;8(6):505-8.
9. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. 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 Aug;8(4):R204-12.
10. Mosier MJ, Pham TN, Klein MB, Gibran NS, Arnoldo BD, Gamelli RL, et al. Early acute kidney injury predicts progressive renal dysfunction and higher mortality in severely burned adults. *J Burn Care Res.* Jan-Feb;31(1):83-92.
11. Hoste EA, Clermont G, Kersten A, Venkataraman R, Angus DC, De Bacquer D, et al. RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis. *Crit Care.* 2006;10(3):R73.
12. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care.* 2007;11(2):R31.
13. Blantz RC. Pathophysiology of pre-renal azotemia. *Kidney Int.* 1998 Feb;53(2):512-23.

14. Mahon P, Shorten G. Perioperative acute renal failure. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2006 Jun;19(3):332-8.
15. Rascusen LC. The Morphologic basis of acute renal failure. In: WF MBF, editor. *Acute Renal Failure - A Companion to Brenner and Rector's The Kidney*. Philadelphia: Saunders; 2001. p. 1-12.
16. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *N Engl J Med*. 1996 May 30;334(22):1448-60.
17. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Jun;17(6):1503-20.
18. Daugharty TM, Brenner BM. Reversible hemodynamic defect in glomerular filtration rate after ischemic injury. *Am J Physiol*. 1975 May;228(5):1436-9.
19. Lieberthal W. Biology of acute renal failure: therapeutic implication. *Kidney International*. 1997 (52):1102-15.
20. Brezis M, Rosen S. Hypoxia of the renal medulla--its implications for disease. *N Engl J Med*. 1995 Mar 9;332(10):647-55.
21. Friedewald JJ, Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney Int*. 2004 Aug;66(2):486-91.
22. Traynor J, Mactier R, Geddes CC, Fox JG. How to measure renal function in clinical practice. *BMJ*. 2006 Oct 7;333(7571):733-7.
23. Herget-Rosenthal S, Marggraf G, Husing J, Goring F, Pietruck F, Janssen O, et al. Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int*. 2004 Sep;66(3):1115-22.
24. Nguyen MT, Devarajan P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Pediatr Nephrol*. 2008 Dec;23(12):2151-7.
25. Schrier RW. Need to intervene in established acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Oct;15(10):2756-8.
26. 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.
27. Tsigou E, Psallida V, Demponeras C, Boutzouka E, Baltopoulos G. Role of new biomarkers: functional and structural damage. *Crit Care Res Pract*. 2013;2013:361078.
28. Makris K, Kafkas N. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in acute kidney injury. *Adv Clin Chem*. 2012;58:141-91.
29. 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 Apr 2-8;365(9466):1231-8.
30. 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 Oct;14(10):2534-43.

31. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A. 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 Dec;54(6):1012-24.
32. Fadel FI, Abdel Rahman AM, Mohamed MF, Habib SA, Ibrahim MH, Sleem ZS, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early biomarker for prediction of acute kidney injury after cardio-pulmonary bypass in pediatric cardiac surgery. *Arch Med Sci*. 2012 May 9;8(2):250-5.
33. 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 Sep;105(3):485-91.
34. Liu S, Che M, Xue S, Xie B, Zhu M, Lu R, et al. Urinary L-FABP and its combination with urinary NGAL in early diagnosis of acute kidney injury after cardiac surgery in adult patients. *Biomarkers*. 2013 Feb;18(1):95-101.
35. Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, Wei H, Hession CA, Cate RL, et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem*. 1998 Feb 13;273(7):4135-42.
36. Obermuller N, Geiger H, Weipert C, Urbschat A. Current developments in early diagnosis of acute kidney injury. *Int Urol Nephrol*. 2013 May 15.
37. Zhang Z, Humphreys BD, Bonventre JV. Shedding of the urinary biomarker kidney injury molecule-1 (KIM-1) is regulated by MAP kinases and juxtamembrane region. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Oct;18(10):2704-14.
38. Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 Nov;24(11):3265-8.
39. Maisel AS, Katz N, Hillege HL, Shaw A, Zanco P, Bellomo R, et al. Biomarkers in kidney and heart disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Jan;26(1):62-74.
40. Parikh CR, Jani A, Melnikov VY, Faubel S, Edelstein CL. Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis. *Am J Kidney Dis*. 2004 Mar;43(3):405-14.
41. Leslie JA, Meldrum KK. The role of interleukin-18 in renal injury. *J Surg Res*. 2008 Mar;145(1):170-5.
42. Parikh CR, Abraham E, Ancukiewicz M, Edelstein CL. Urine IL-18 is an early diagnostic marker for acute kidney injury and predicts mortality in the intensive care unit. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Oct;16(10):3046-52.
43. Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman*. 12 ed: McGraw Hill; 2012. 2112 p.
44. Day RO, Graham GG, Hicks M, McLachlan AJ, Stocker SL, Williams KM. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of allopurinol and oxypurinol. *Clin Pharmacokinet*. 2007;46(8):623-44.

45. Rhoden E, Teloken C, Lucas M, Rhoden C, Mauri M, Zettler C, et al. Protective effect of allopurinol in the renal ischemia--reperfusion in uninephrectomized rats. *Gen Pharmacol*. 2000 Oct;35(4):189-93.
46. Lee BE, Toledo AH, Anaya-Prado R, Roach RR, Toledo-Pereyra LH. Allopurinol, xanthine oxidase, and cardiac ischemia. *J Investig Med*. 2009 Dec;57(8):902-9.
47. Kinugasa Y, Ogino K, Furuse Y, Shiomi T, Tsutsui H, Yamamoto T, et al. Allopurinol improves cardiac dysfunction after ischemia-reperfusion via reduction of oxidative stress in isolated perfused rat hearts. *Circ J*. 2003 Sep;67(9):781-7.
48. Fujita T. [Formation and removal of reactive oxygen species, lipid peroxides and free radicals, and their biological effects]. *Yakugaku Zasshi*. 2002 Mar;122(3):203-18.
49. Guidance for Industry – Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers Silver Spring2005 [updated 18/10/2013; cited 2011 20/08/2011]. Available from: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/02d-0492-gdl0002.pdf>.
50. 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 Feb;143(2):243-51.
51. Tanaka R, Tsutsui H, Ohkita M, Takaoka M, Yukimura T, Matsumura Y. Sex differences in ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury are dependent on the renal sympathetic nervous system. *Eur J Pharmacol*. 2013 Aug 15;714(1-3):397-404.
52. Modolo NS, Castiglia YM, Ganem EM, Braz JR, Vianna PT, Vane LA. Acute renal ischemia model in dogs: effects of metoprolol. *Ren Fail*. 2001 Jan;23(1):1-10.
53. Woodson B, Wang L, Mandava S, Lee BR. Urinary Cystatin C and NGAL as Early Biomarkers for Assessment of Renal Ischemia-Reperfusion Injury: A Serum Marker to Replace Creatinine? *J Endourol*. 2013 Sep 25.
54. 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.
55. 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 Dec;39(10):2983-5.
56. Lee HT, Ota-Setlik A, Fu Y, Nasr SH, Emala CW. Differential protective effects of volatile anesthetics against renal ischemia-reperfusion injury in vivo. *Anesthesiology*. 2004 Dec;101(6):1313-24.
57. Lee HT, Kim M, Kim M, Kim N, Billings FTt, D'Agati VD, et al. Isoflurane protects against renal ischemia and reperfusion injury and modulates leukocyte infiltration in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Sep;293(3):F713-22.
58. Fujii T, Kurata H, Takaoka M, Muraoka T, Fujisawa Y, Shokoji T, et al. The role of renal sympathetic nervous system in the pathogenesis of ischemic acute renal failure. *Eur J Pharmacol*. 2003 Nov 28;481(2-3):241-8.

59. Fujii T, Sugiura T, Ohkita M, Kobuchi S, Takaoka M, Matsumura Y. Selective antagonism of the postsynaptic alpha(1)-adrenoceptor is protective against ischemic acute renal failure in rats. *Eur J Pharmacol.* 2007 Nov 28;574(2-3):185-91.
60. Wang Z, Colli JL, Keel C, Bailey K, Grossman L, Majid D, et al. Isoprostane: quantitation of renal ischemia and reperfusion injury after renal artery clamping in an animal model. *J Endourol.* 2012 Jan;26(1):21-5.
61. Keel CE, Wang Z, Colli J, Grossman L, Majid D, Lee BR. Protective effects of reducing renal ischemia-reperfusion injury during renal hilar clamping: use of allopurinol as a nephroprotective agent. *Urology.* 2013 Jan;81(1):210 e5-10.
62. McCullough PA, Shaw AD, Haase M, Bouchard J, Waikar SS, Siew ED, et al. Diagnosis of acute kidney injury using functional and injury biomarkers: workgroup statements from the tenth Acute Dialysis Quality Initiative Consensus Conference. *Contrib Nephrol.* 2013;182:13-29.
63. Vanmassenhove J, Vanholder R, Nagler E, Van Biesen W. Urinary and serum biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury: an in-depth review of the literature. *Nephrol Dial Transplant.* 2013 Feb;28(2):254-73.
64. Washburn KK, Zappitelli M, Arikan AA, Loftis L, Yalavarthy R, Parikh CR, et al. Urinary interleukin-18 is an acute kidney injury biomarker in critically ill children. *Nephrol Dial Transplant.* 2008 Feb;23(2):566-72.
65. Wheeler DS, Devarajan P, Ma Q, Harmon K, Monaco M, Cvijanovich N, et al. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of acute kidney injury in critically ill children with septic shock. *Crit Care Med.* 2008 Apr;36(4):1297-303.
66. Zappitelli M, Washburn KK, Arikan AA, Loftis L, Ma Q, Devarajan P, et al. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early marker of acute kidney injury in critically ill children: a prospective cohort study. *Crit Care.* 2007;11(4):R84.
67. Nejat M, Pickering JW, Devarajan P, Bonventre JV, Edelstein CL, Walker RJ, et al. Some biomarkers of acute kidney injury are increased in pre-renal acute injury. *Kidney Int.* 2012 Jun;81(12):1254-62.
68. Singer E, Elger A, Elitok S, Kettritz R, Nickolas TL, Barasch J, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin distinguishes pre-renal from intrinsic renal failure and predicts outcomes. *Kidney Int.* 2011 Aug;80(4):405-14.
69. 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 Nov;24(11):3349-54.