

Vera Lúcia Fernandes de Azevedo

NGAL como marcador precoce de lesão renal em
ratos submetidos à isquemia renal sob anestesia
geral balanceada

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

Prof^a Titular Norma Sueli Pinheiro Módolo

Orientadora

Botucatu – SP

2011

Dedicatória

Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.

Fernando Pessoa

*À minha família,
que sempre esteve ao meu lado pelos caminhos que percorri.*

*Ao meu pai e minha mãe,
por terem me apoiado pelos caminhos que escolhi.*

A vocês meu eterno amor.

Agradecimento Especial

Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.

Cora Coralina

A Profª Titular Norma Sueli Pinheiro Módolo

*orientadora e mestre e que ao longo desses anos de convivência
acadêmica se transformou em uma amiga.*

A você que sempre acreditou no nosso projeto, muito obrigada!

Agradecimentos

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

À FAPESP pelo auxílio financeiro para realização desse projeto, Processo FAPESP nº 2010/08562-0.

Aos Professores do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu por promoverem ensino de qualidade e terem despertado em mim a busca pelo conhecimento.

A Profª Drª Lidia Raquel de Carvalho pela análise estatística dessa pesquisa.

A Profª Drª Maria Aparecida Domingues pelo estudo histológico das lâminas.

À Neli Aparecida Pavan, Joana Jacirene Costa Teixeira, André Renato Passaroni, Sonia Maria Martins e Silva e Marcelo Donizetti, funcionários do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, que sempre se mostraram acessíveis e disponíveis e pelo muito que contribuíram no desenvolvimento desse projeto.

Aos funcionários do Laboratório Experimental de Anestesiologia, Cristiano Correa de Oliveira e Jurandir Antonio, meu muito obrigada.

Aos meus colegas de trabalho que contribuíram nessa jornada, em especial ao meu colega Dr. Paulo Sérgio Santana Santos, essa vitória é nossa!

A um amigo especial Dr. Gildásio Oliveira Júnior que faz da pesquisa científica sua maior missão.

A todos que contribuíram para a realização desse projeto.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Picnose.....	36
Figura 2	Carriorexex.....	37
Figura 3	Cariólise ou Cromatólise.....	38
Figura 4	<i>Boxplot</i> referente aos valores da NGAL (ng.mL ⁻¹) nos quatro momentos segundo os grupos.....	44
Figura 5	<i>Boxplot</i> referente aos valores da NGAL (ng.mL ⁻¹) momento quatro (M4) nos três grupos estudados.....	45
Figura 6	<i>Boxplot</i> referente à avaliação histológica da lesão celular, segundo o grupo.....	47
Figura 7	Mediana referentes aos escores da intensidade da lesão histológica, Grupo 3 (Controle) – grau zero de Park (aumento 200x).....	48
Figura 8	Mediana referentes aos escores da intensidade da lesão histológica, Grupo 1 – grau dois de Park (aumento 200x)	49
Figura 9	Mediana referente aos escores da intensidade da lesão histológica, Grupo 2 – grau três de Park (aumento 400x).	49
Figura 10	Curva-Receptor de operação característica (ROC) para NGAL plasmática.....	54
Figura 11	Concentrações médias de pNGAL em intervalo de tempo em vários pacientes com e sem LRA.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resumo dos atributos e momentos estudados.....	30
Tabela 2	Escores dos graus de lesão celular atribuídos aos exames histológicos.....	35
Tabela 3	Valores da média e desvio-padrão(DP) referentes ao peso (gramas) segundo o grupo.....	40
Tabela 4	Valores da média e desvio-padrão referentes à Temperatura (°C) segundo momentos e grupos.....	41
Tabela 5	Valores da média e desvio-padrão referentes à PAM (mmHg) segundo momentos e grupos.....	42
Tabela 6	Mediana, 1º quartil e 3º quartil, entre colchetes, referentes a NGAL(ng.mL ⁻¹) segundo momento e grupo.....	43
Tabela 7	Mediana, 1º e 3º quartis, entre colchetes, referentes aos escores da intensidade da lesão histológica segundo os grupos e lados (direito e esquerdo).....	46
Tabela 8	Resultados dos exames histológicos dos rins D e E dos grupos GI, GII e GIII.....	71
Tabela 9	Peso (gr), pressão arterial sistólica - PAS (mmHg), pressão arterial diastólica – PAD (mmHg), pressão arterial média - PAM (mmHg), temperatura – T (°C), pressão expirada de CO2 (ETCO2) e valores plasmáticos da lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos em ng.mL (NGAL) dos animais estudados nos diferentes momentos.....	72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Lesão Renal Aguda.....	14
1.2 Características biológicas da lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos.....	19
1.3 Lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos como biomarcador da lesão renal aguda.....	20
1.4 Evidências clínicas do uso da lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos.....	21
1.5 Hidratação.....	23
1.6 Anestesia.....	25
2 OBJETIVOS	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Grupos experimentais.....	28
3.2 Momentos estudados.....	29
3.3 Atributos estudados.....	31
3.4 Sequência experimental.....	31
3.5 Avaliação histológica.....	35
3.6 Análise estatística.....	39
4 RESULTADOS	40
4.1 Peso (P).....	40
4.2 Temperatura corporal dos animais (T).....	41
4.3 Pressão arterial média (PAM).....	42
4.4 Lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos (NGAL).....	43
4.5 Avaliação histológica.....	46
5 DISCUSSÃO	50
5.1 Modelo animal.....	50
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
7 CONCLUSÃO	63
8 REFERÊNCIAS	64
APÊNDICE	71

Azevedo VLF. NGAL como marcador precoce de lesão renal em ratos submetidos à isquemia renal sob anestesia geral balanceada. Botucatu, 2011. 76p. Tese (Doutorado em Anestesiologia), Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

Justificativa e Objetivo. A lesão renal aguda (LRA) caracterizada como redução abrupta da função renal tem incidência variável, dependendo dos critérios utilizados para sua definição. Atualmente, o mais empregado para avaliação de função renal é a dosagem de creatinina plasmática, porém, por sofrer interferência de vários fatores faz com que a mesma não seja o marcador ideal. Um novo biomarcador da função renal, a lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos (NGAL), tem sido estudado como um dos mais precoces e sensíveis marcadores de lesão de rins após isquemia/reperfusão ou lesão nefrotóxica, sendo facilmente identificada no sangue e na urina. A classificação RIFLE para LRA com a validação da NGAL é uma nova perspectiva para o diagnóstico precoce da LRA e instituição de medidas preventivas e protetoras em situações de risco. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a LRA por meio da dosagem plasmática da NGAL em ratos submetidos à isquemia renal sob anestesia geral balanceada e hidratados com Ringer lactato ou com hidroxietilamido e correlacionar a dosagem da NGAL plasmática com a lesão histológica renal. **Método.** Em trinta ratos *Wistar* machos (>350g) distribuídos aleatoriamente em três grupos de dez animais, induzidos com isoflurano a 4%, foi realizada intubação orotraqueal e colocados sob ventilação mecânica. Foram cateterizadas a artéria carótida esquerda e a veia jugular direita para monitorização e coletas sanguíneas. ETCO_2 , PAMI, T foram continuamente monitorizados (Datex, AS3). A manutenção foi realizada com isoflurano na concentração de 1% a 3% e remifentanil 0,05 a 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ em infusão contínua conforme o grupo pertencente: G1 (Anestesia geral balanceada + Ringer lactato + isquemia/reperfusão renal); G2 (Anestesia geral balanceada + hidroxietilamido

(HES) + isquemia/reperfusão renal) e G3 - Controle (Anestesia geral balanceada + Ringer lactato, sem isquemia renal). Todos os animais foram submetidos à nefrectomia direita. Os animais do G1 e G2 foram submetidos à isquemia renal por 30 minutos e reperfusão por 30 minutos. Os animais do G3 foram utilizados para controle do experimento. Os valores plasmáticos da NGAL foram determinados no **M1** - após a cateterização arterial e venosa, no **M2** - após 30 minutos de clampeamento da artéria renal, no **M3** - após 30 minutos de reperfusão renal. Doze horas após o início do experimento os animais retornaram ao laboratório e foram anestesiados com isoflurano para coleta de uma nova amostra sanguínea **M4** e nefrectomia esquerda, para análise histológica, com o emprego de uma escala para avaliação de necrose tubular (0 = sem lesão a 5 = lesão máxima). **Resultados.** Houve um aumento sequencial dos valores da NGAL plasmática (pNGAL) a partir do momento um (M1) nos três grupos, sendo que apenas no momento quatro (M4) ao final do experimento nos grupos 1 e 2 a mediana da NGAL (400 ng.mL^{-1}) alcançou níveis em torno de 60 vezes do valor inicial. Nos animais do grupo 3 (G Controle) que não sofreram isquemia/reperfusão renal apesar do aumento da pNGAL (mediana de $75,37 \text{ ng.mL}^{-1}$) os valores da mesma permaneceram abaixo do considerado normal de 150 ng.mL^{-1} . Quando se comparou as dosagens da pNGAL entre os animais do G1 hidratados com RL e os animais do G2 hidratados com HES não houve diferença estatística entre esses dois grupos demonstrando a não interferência da solução de hidratação no aumento do marcador renal e sim apenas o clampeamento da artéria renal esquerda como fator determinante da lesão isquêmica, fato esse comprovado pelos valores normais da pNGAL no grupo 3 (Controle). Quando se comparou os grupos G1 e G3 no M4 a mediana da pNGAL foi de 400 ng.mL^{-1} e $75,37 \text{ ng.mL}^{-1}$, respectivamente, sendo a diferença estatisticamente significativa quando os animais de ambos os grupos foram hidratados com RL e o que os diferenciou foi a ausência de isquemia renal no grupo G3 (Controle). O grupo G1 (2[1;4]) apresentou escore de lesão moderada, G2 (3[3;4]) escore de lesão moderada a grave e grupo G3 (Controle) que não sofreram I/R não apresentaram nenhuma alteração histológica do rim esquerdo. No grupo 1 -

G1 (2[1,4]) e 2 - G2 (3[3,4]) onde os escores de lesão histológica renal apresentaram medianas elevadas, houve correspondência com valores elevados de pNGAL, comprovando-a como marcador precoce de LRA e correlacionando esses valores com o grau de lesão histológica. **Conclusões.** O resultado deste estudo em ratos submetidos à anestesia geral balanceada demonstra o aumento precoce da pNGAL em condições de isquemia/reperfusão renal, independente da solução de hidratação utilizada (RL ou HES). O aumento da pNGAL se correlacionou com graus variáveis de lesão renal nos grupos 1 e 2 e ausência de lesão no grupo 3 alterações essas comprovadas pela avaliação histológica.

Palavras-chave: lesão renal aguda (LRA), biomarcador, NGAL, isquemia / reperfusão renal, anestesia geral balanceada, Ringer lactato, hidroxietilamido.

Azevedo VLF. NGAL as an early marker of renal injury in rats submitted to renal ischemia under general balanced anesthesia. Botucatu, 2011. 76p. Thesis (PhD degree in Anesthesiology), Botucatu Medical School, UNESP, Univ Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

ABSTRACT

Background and objective. Acute renal injury (ARI), characterized by abrupt renal function decline, has variable incidence, depending on the criteria used for its definition. Presently, the criterion most often used for kidney function evaluation is plasma creatinine dosing; however, because it suffers interference, it is not an ideal marker. A new renal function biomarker, neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) has been studied as one of the earliest and most sensitive kidney injury marker following ischemia/reperfusion or nephrotoxic injury, and it is easily identified in blood and urine. The RIFLE classification for ARI with NGAL validation is a new perspective for early ARI diagnosis and institution of preventive and protective measures in risk situations. This study aimed at evaluating ARI by means of NGAL plasma dosing in rats submitted to renal ischemia under general balanced anesthesia and hydrated with ringer lactate or hydroxyethylamide and at correlating plasma NGAL dosing with histological renal injury. **Method.** Thirty male *Wistar* rats (>350g) were used. They were randomly distributed into three groups with ten animals each and induced by 4% isoflurane. Orotracheal intubation was performed and the animals were placed under mechanical ventilation. The left carotid artery and the right jugular vein were catheterized for monitorization and blood collection. $ETCO_2$, PAMI, T were continuously monitorized (Datex, AS3). Maintenance was performed by 1% to 3% isoflurane and 0.05 remifentanil at $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ in continuous infusion according to the group to which the animals belonged: G1 (General balanced anesthesia + Ringer lactate + renal ischemia/reperfusion); G2 (General balanced anesthesia + hydroxyethylamide (HES) + renal ischemia/reperfusion) and G3 - Control (General balanced anesthesia +

Ringer lactate, without renal ischemia). All the animals were submitted to right nephrectomy. The animals in G1 and G2 were submitted to renal ischemia for 30 minutes and reperfusion for 30 minutes. Those in G3 were used for experiment control. NGAL plasma values were determined at **M1** - after arterial and venous characterization, at **M2** - 30 minutes after clamping the renal artery, at **M3** - after 30 minutes of renal reperfusion. Twelve hours after commencing the experiment, the animals returned to the laboratory and were anesthetized by isoflurane for collection of a new blood sample **M4** and left nephrectomy, for histological analysis, by using a scale for tubular necrosis evaluation (0 = without injury to 5 = maximum injury). **Results.** There was a sequential increase in plasma NGAL (pNGAL) levels from moment one (M1) in the three groups, and the NGAL median (400 ng.mL^{-1}) reached levels of approximately sixtyfold the initial value only at moment four (M4), at the end of the experiment. In the animals in Group 3 (control G), which did not suffer renal ischemia/reperfusion, its values remained below normal figures of 150 ng.mL^{-1} despite the NGAL p (median of 75.37 ng.mL^{-1}). When comparing pNGAL dosing among G1 animals hydrated with RL and G2 animals hydrated with HES, no statistical difference was found between these two groups, thus showing the non-interference of the hydration solution in the renal marker increase, but only in the clamping of the left renal artery as a determinant factor of ischemic injury, a fact that was confirmed by the normal values of pNGAL in Group 3 (Control). When Groups G1 and G3 were compared at M4, the pNGAL median was 400 ng.mL^{-1} and 75.37 ng.mL^{-1} , and the difference was statistically significant when the animals in both groups were hydrated with RL, and what differentiated them was the absence of renal ischemia in Group G3 (Control). Group G1 (2[1;4]) showed a moderate injury score; G2 (3[3;4]) showed a score ranging from moderate to severe, and Group G3 (Control), which did not suffer I/R, did not show any histological alteration in the left kidney. In Group 1 - G1(2[1;4]) and 2 - G2 (3[3;4]), where renal histological injury scores showed high medians, there was a correspondence with high pNGAL values, thus confirming it as an early ARI marker and correlating these values with the level of histological injury. **Conclusions.** The

result in this study on rats submitted to general balanced anesthesia showed the early pNGAL increase in renal ischemia/reperfusion conditions, regardless of the hydration solution used (RL or HES). pNGAL increase correlated with variable levels of renal injury in Groups 1 and 2 and the absence of injury in Group 3, which was confirmed by histological evaluation.

Key words: Acute Renal Injury (ARI), biomarker, NGAL, renal ischemia /reperfusion, general balanced anesthesia, Ringer lactate, hydroxyethylamide.

1 Introdução

1.1 LESÃO RENAL AGUDA

A lesão renal aguda (LRA) caracterizada como redução abrupta da função renal tem incidência variável, dependendo dos critérios utilizados para sua definição¹⁻⁴. A LRA é relativamente comum entre pacientes internados, sobretudo em doentes críticos admitidos nas unidades de terapia intensiva. As causas são diversas, sendo as principais a sepse, a cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea (CEC) e a exposição a contrastes. Uma limitação importante dos estudos da LRA tem sido a falta de definição uniforme da mesma.

Na literatura, inúmeras definições são usadas para LRA⁵. Variáveis usadas para definir LRA incluem alterações absolutas da creatinina sérica (CrS), variações percentuais da CrS, níveis de uréia ou alguma combinação das opções acima. Essa falta de consenso dificulta a realização de estudos comparativos⁵.

Apesar dos avanços terapêuticos sua ocorrência está associada a altos índices de morbimortalidade¹⁻⁴. A mortalidade permanece entre 20% a 40% para todos os casos de LRA. Para pacientes que necessitam de terapia de substituição renal (TSR), a taxa de mortalidade é consistentemente relatada na faixa de 50% a 70%⁵. Reconhecendo as limitações e divergências sobre LRA, o grupo de trabalho multinacional de Iniciativa de Qualidade de Diálise Aguda (ADQI) propôs um consenso sobre definição de LRA²⁻⁵.

A partir desse consenso publicado por Bellomo et al., 2004³, foi criado o critério *RIFLE*, o qual definiu a LRA baseado na creatinina plasmática e/ou débito urinário³⁻⁴. O propósito desse consenso foi universalizar e padronizar os parâmetros dos estudos envolvendo LRA, além de estratificar a

insuficiência renal, permitindo assim a identificação dos graus variáveis do comprometimento renal.

Esse consenso define a LRA com base nas alterações da creatinina sérica e/ou débito urinário. Além disso, o modelo estratifica a gravidade da LRA com base na classificação denominada *RIFLE* acrônimo para R - (*Risk*) risco de disfunção renal, I - (*Injury*) lesão renal, F - (*Failure*) falência da função renal, L - (*Loss*) perda da função renal por um período maior que quatro semanas e E - (*End-stage*) estágio final da doença renal ou seja doença há mais de três meses. Os estudos têm demonstrado a utilidade desse sistema de classificação na previsão de resultados em específicas populações, incluindo pacientes pós-cirurgia cardíaca e pacientes em unidades de terapia intensiva (UTI).

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

- Risco – aumento de 1,5 vezes da creatinina sérica em relação à creatinina basal e/ou débito urinário de $0,5 \text{ mL.kg}^{-1}\text{h}^{-1}$ por 6 horas.
- Lesão – aumento de 2 vezes da creatinina sérica em relação a creatinina basal e ou débito urinário de $0,5 \text{ mL.kg}^{-1}\text{h}^{-1}$ por 12 horas.
- Falência – aumento de 3 vezes da creatinina sérica em relação a creatinina basal e ou débito urinário de $0,3 \text{ mL.kg}^{-1}\text{h}^{-1}$ por 24 horas (oligúria) ou por 12 horas (anúria) ou valores de creatinina acima de $4,0 \text{ mg.dL}^{-1}$.
- Perda renal – falência renal aguda persistente por mais de 4 semanas.
- Estágio final da doença renal – falência renal por mais de 3 meses.

Mais recentemente, o grupo ADQI publicou uma validação no qual avaliaram retrospectivamente os critérios RIFLE em uma população heterogênea de mais de 20.000 pacientes hospitalizados⁵⁻⁶. Depois do ajuste para condições de comorbidade, os autores encontraram uma relação quase linear entre mortalidade e os estágios progressivos de LRA. Em comparação com pacientes sem LRA, o *odds ratio* (risco relativo) para mortalidade hospitalar nos grupos de risco, lesão e falência renal foram 2,5, 5,4 e 10,1 respectivamente⁵⁻⁶.

Apesar de suas limitações, a utilização de modelos animais é essencial para melhorar o entendimento da LRA em humanos. Estudos experimentais em animais têm elucidado a patogênese da LRA, mas essas descobertas não são traduzidas em aplicabilidade clínica devido, principalmente, à dificuldade de obtenção de um marcador precoce de lesão renal. Atualmente o mais utilizado para avaliação de função renal é a dosagem de creatinina sérica, porém é um marcador insensível, particularmente no início da lesão renal aguda quando as intervenções precoces poderiam ter o máximo impacto, além de que a creatinina pode sofrer interferências de vários fatores como: idade, sexo, massa e metabolismo muscular, grau de hidratação, além do que seu valor pode não sofrer qualquer alteração até que ocorra uma perda maior que 50% da função renal^{1,4,7}, e, também, em condições de baixa filtração glomerular a quantidade de creatinina produzida pela secreção tubular pode superestimar a função renal, por essas razões a creatinina não funciona como marcador ideal da função renal. A utilização da dosagem de creatinina como marcador da função renal exige medidas seriadas e sua elevação não é critério isolado para LRA, porém está associado com alta mortalidade, declínio funcional, aumento de custo de tratamento e hospitalização prolongada. A creatinina não apresenta alta especificidade e sensibilidade, valor preditivo positivo e negativo em relação ao diagnóstico e prognóstico¹⁻¹⁵.

Estudos em animais têm demonstrado que a LRA pode ser prevenida ou tratada desde que medidas sejam tomadas precocemente, antes mesmo que ocorra elevação da creatinina sérica.

Para que ocorra uma evolução favorável da LRA, além do reconhecimento precoce da doença, é necessário identificar o tipo de lesão, se pré-renal, renal ou pós-renal; a etiologia da mesma se por isquemia, toxinas ou sepse e, ainda, estratificar a gravidade da lesão^{1,4}.

A limitação do uso da creatinina como biomarcador da função renal motivou a busca e a validação de novos marcadores mais sensíveis e específicos capazes de diagnosticar a lesão renal aguda mais precocemente, sendo os principais: a interleucina 18 (IL-18), molécula de lesão renal-1 (KIM-1), N-acetil-β-glucosaminidase (NAG), glutationa-S-transferase (GST) e lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos (NGAL). Isolados ou em conjunto esses marcadores contribuem para a detecção precoce da lesão renal aguda^{1-7,15}.

O novo marcador, a NGAL (lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos) é uma proteína normalmente presente em vários tecidos humanos como rins, pulmões, estômago e cólon, porém em níveis muito baixos. Em condições de lesão epitelial ocorre uma elevação de seus valores em torno de dez vezes no plasma e de cem vezes na urina¹, se correlacionado com valores elevados da creatinina^{1,6}. Recentemente em estudos experimentais em animais foi identificado o NGAL como um dos mais precoces e sensíveis marcadores de rins após isquemia ou lesão nefrotóxica, sendo facilmente identificada no sangue e na urina. Essas descobertas têm sido extrapoladas para estudos na espécie humana para avaliar a NGAL como o novo biomarcador da LRA.

Tem sido demonstrado que a NGAL aumenta de forma significativa em pacientes com lesão renal aguda, mas não nos correspondentes controles¹⁶.

A dosagem da NGAL pelo método de ELISA identifica seu aumento antes mesmo do desenvolvimento da LRA, sendo então a NGAL plasmática e urinária um biomarcador sensível, específico e altamente preditivo de LRA¹⁷⁻¹⁹. Estudos apontam seu uso com sucesso, sendo detectado precocemente após lesão de nefrons distais em estudos animais e em vários tipos de doenças em seres humanos como: sepse, nefropatia iatrogênica (pelo uso de radiocontraste ou medicamentos), cirurgia cardíaca, vasculites e doenças do colágeno. Em todas essas situações, a detecção precoce da lesão renal aguda parece ser o objetivo fundamental para tornar mais favorável o curso dessas doenças^{1-3,5-14}. Sua concentração aumenta proporcionalmente a gravidade e duração da lesão renal e diminui com a sua atenuação. Pode ser dosada no plasma e urina. A NGAL é secretada na urina no nível da alça ascendente de Henle e dos ductos coletores. Nesse locais exerce a função de defesa do hospedeiro por quelação de complexos ferro-sideróforos levando à diminuição do crescimento microbiano ou mediando o dano oxidativo²⁰⁻²¹. Em alguns segmentos do néfron, a NGAL também pode reciclar o ferro por endocitose²²⁻²³. O aumento da NGAL urinária se expressa em proporção ao grau de lesão aguda⁸, também se altera na doença renal crônica progressiva, mas não na falência renal estável^{8,15,22-23}.

Depleção de volume ou uso de diuréticos não aumentam os níveis urinários da NGAL em camundongos²⁴, mais uma vez refletindo a especificidade da NGAL para dano tubular em curso. Essas observações sugerem que não só a NGAL urinária detecta a LRA, mas também que seu grau de expressão pode distinguir entre lesão renal aguda pré-renal, azotemia, e doença renal crônica. Além disso, como a NGAL é detectável antes da elevação da creatinina sérica^{8,25-26}, a mesma pode ser usada para diagnosticar LRA na fase inicial mesmo quando alterações da dosagem de creatinina sérica estão ausentes ou incipientes.

A NGAL, dentre outros, surge como um marcador de lesão renal subclínica que precede a lesão renal instalada, sinalizando para a

possibilidade de ser usada como um marcador em tempo real da função renal¹³.

A classificação RIFLE para LRA com a validação da NGAL é uma nova perspectiva para o diagnóstico precoce da LRA e instituição de medidas preventivas e protetoras em situações de risco.

1.2 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DA LIPOCALINA ASSOCIADA À GELATINASE DOS NEUTRÓFILOS

A NGAL é uma proteína de 25 kDa pertencente à superfamília das lipocalinas que compreende um grupo de 20 pequenas proteínas extracelulares que são definidas baseadas em suas estruturas tridimensionais que as torna capazes de se ligarem a várias moléculas¹³. Tem sua expressão gênica iniciada após evento lesivo, aparecendo em precursores granulocíticos e tecidos epiteliais ativados da traquéia, pulmões, estômago, cólon e, principalmente, dos rins. Atravessa livremente a membrana glomerular sendo parcialmente reabsorvida por endocitose no túbulo proximal. Tem papel bioquímico importante exercendo diversas funções. Possui capacidade de se ligar a moléculas hidrofóbicas ou lipofílicas, como carreadoras dessas moléculas através de barreiras fisiológicas participando do movimento transmembrana de algumas delas, por meio da ligação a receptores específicos de membrana e de superfícies e formação de complexos com macromoléculas solúveis. A configuração específica das lipocalinas as torna eficiente transportador para diversas substâncias como os retinóides, ácidos aracodônicos, prostaglandinas, ácidos graxos, ferormônios, esteróides e ferro. Têm no metabolismo desse último, importante função na defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas, na medida em que sequestram o íon não disponibilizando-o para a síntese do heme. Também estão implicadas na regulação de células homeostáticas e modulação da resposta imune. Estudos mostram que a administração de NGAL em ratos com lesão renal inicial protege o rim, preserva a integridade tubular e minimiza a azotemia^{8,13}.

1.3 LIPOCALINA ASSOCIADA À GELATINASE DOS NEUTRÓFILOS COMO BIOMARCADOR DA LESÃO RENAL AGUDA

Um biomarcador renal deve possuir características específicas que o aproxime de um marcador ideal. Deve ter alta sensibilidade, facilmente mensurável e quantificado, ser um método não invasivo, ser específico para LRA, permitir estratificação de risco (LRA, TSR e morte), não sofrer alterações séricas em doenças extrarrenais e ser livremente filtrado e não reabsorvido/secretado pelos túbulos¹⁴. A NGAL tem-se mostrado um promissor biomarcador por preencher satisfatoriamente essas características em diversos cenários relacionados à doença renal aguda, tais como pós-operatório de cirurgia cardíaca, sepse/choque séptico, infecções específicas, nefropatia por contraste, nefrotoxicidade por fármacos, vasculites anticorpo anticitoplasma de neutrófilo positivo (ANCA+) e lúpus eritematoso sistêmico (LES)⁸⁻¹⁴.

A NGAL é estável na urina e livremente filtrada pelos glomérulos e está relacionada à resposta imune com maior expressão no tecido renal, aumentando de 67,9 a 137,4 vezes após 6 e 36 horas da lesão renal¹³.

No desenvolvimento de biomarcadores, faz-se necessária a padronização de conceitos e definições para que haja uniformidade na interpretação dos estudos. Com tal intuito, o *Acute Quality Initiative Group* recomenda o uso dos critérios RIFLE para definição da LRA e sua estratificação. Avalia o risco de lesão, a lesão já estabelecida, a falência renal, a perda da função e o estágio terminal da doença renal. Quando todos os protocolos de pesquisa utilizam os mesmos critérios diagnósticos, a comparação entre os estudos se dá de maneira mais homogênea e fidedigna, oferecendo conclusões mais precisas²⁷.

No tecido humano saudável a NGAL pode não ser detectada ou se manifestar apenas em traços²⁸. No rim saudável quantidade mínima de NGAL está presente no epitélio dos túbulos distais e, em ductos coletores medulares. Em contrapartida, em quase 50% das lesões renais isquêmicas e

nefrotóxicas nos túbulos corticais os valores da NGAL ficam mais elevados. No néfron distal, NGAL mRNA é *“up regulated”* dentro de algumas horas após variados estímulos lesivos. A NGAL é secretada na urina e detectada no plasma devido a reabsorção tubular. É filtrada e parcialmente reabsorvida por endocitose nos túbulos proximais via receptores megalina e outros²². Além disso, a NGAL se expressa, embora com limitação, em numerosos tipos de células epiteliais ativadas em resposta à lesão.

1.4 EVIDÊNCIAS CLÍNICAS DO USO DA LIPOCALINA ASSOCIADA À GELATINASE DOS NEUTRÓFILOS

A dosagem da NGAL na admissão do paciente em UTI após cirurgia cardíaca mostrou sua capacidade de identificar e estratificar pacientes com lesão renal aguda, independentemente do perfil de risco perioperatório e do procedimento executado. Em estudo no qual 71 crianças foram submetidas à correção de cardiopatia congênita, a NGAL urinária e plasmática mostrou-se de alto valor preditivo para LRA. Nesse estudo, o diagnóstico clínico, baseado na creatinina aconteceu após 24-48 horas⁸. Em adultos, os dados não foram tão concretos. Possíveis razões para essa discrepância entre as populações infantil e adulta podem ser a influência de comorbidades em adultos, as limitações típicas da creatinina ou do débito urinário, ambos utilizados como método de auxílio diagnóstico. Além disso, coletas da NGAL realizadas em momentos diferentes entre os estudos podem ter contribuído para as divergências. Ainda assim, o aumento da NGAL plasmática foi proporcional ao grau de gravidade e duração da LRA, sendo considerado o mais forte fator independente de risco para desenvolvimento de LRA na UTI^{26,29-30}.

Em estudo de Bagshaw et al., 2008³¹, a sepse contribuiu de maneira importante para o desenvolvimento de LRA em mais de 50% dos pacientes gravemente enfermos. A utilização de um marcador precoce de lesão renal aguda propiciaria a tomada de decisões precoces em relação às condutas tão logo quanto fosse estabelecido o possível risco. Diferentemente da cirurgia cardíaca, em que se conhece o momento da lesão, na sepse/choque séptico

este tempo é normalmente desconhecido dificultando a detecção e abordagem precoce. Ainda assim, em estudo envolvendo pacientes adultos sépticos e não sépticos, a NGAL urinária e plasmática mostrou associação significativa com piora da LRA e início da terapia de substituição renal³¹.

A NGAL plasmática mostrou discreta relação com a progressão da LRA e início da TSR. Embora a NGAL urinária tenha mostrado relação frágil com esses resultados, os picos urinários mostraram-se melhores como preditores de progressão da LRA em pacientes não sépticos. De maneira geral, a NGAL permitiu diagnóstico de LRA 48 horas antes dos métodos convencionais padronizados em consensos como RIFLE¹².

Em 661 pacientes com suspeita de sepse em sala de urgência, a NGAL foi considerada como um bom marcador preditivo para diagnóstico e prognóstico de LRA³². Concentrações plasmáticas $>150 \text{ ng.mL}^{-1}$ apresentaram 96% de sensibilidade e 51% de especificidade para detecção de LRA nas primeiras 72 horas de acompanhamento³².

Martensson et al., 2010³³, selecionaram pacientes com resposta inflamatória por diversas causas, dentre elas a síndrome de resposta inflamatória sistêmica, a sepse e o choque séptico com e sem LRA e a NGAL plasmática e urinária mostraram-se como bons preditores de LRA também nesse contexto.

A utilização de contraste pode provocar toxicidade tubular causando hipóxia tecidual e é responsável pela maioria dos casos de lesão renal aguda. Dados apontam que 5% a 10% dos pacientes expostos ao contraste necessitam de TSR temporária. A NGAL, em alguns estudos, mostrou-se capaz de predizer essa morbidade com sensibilidade de 73% e especificidade de 100% dentro de 2 a 4 horas após a exposição ao contraste³⁴⁻³⁵.

Outro estudo envolvendo pacientes com vasculites ANCA+, onde o acometimento renal frequentemente evolui para doença renal em estágio terminal (DRET), observaram-se níveis mais elevados de NGAL plasmática

em pacientes com doença em atividade do que quando em períodos de remissão. Tal achado pode ser utilizado para prever recidivas da doença³⁶⁻³⁷.

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) afeta os rins de crianças com maior frequência e mais precocemente do que em adultos. Em tais pacientes, os níveis de NGAL foram duas vezes maiores do que os encontrados em portadores de artrite idiopática juvenil. Valores de NGAL correlacionam-se bem com doença renal, mas não com atividade extrarrenal do LES. Em outro estudo, níveis elevados de NGAL foram encontrados mais de três meses antes da piora da nefrite lúpica³⁸⁻³⁹.

Em metanálise envolvendo 2.538 pacientes constatou-se que a sensibilidade e especificidade da NGAL para LRA apresentou variação entre 75% e 95% em doentes críticos ou após exposição a contraste. No referido estudo¹⁷, a NGAL mostrou excelente valor preditivo para LRA (AUC-ROC = 0,8) e para início da TSR (AUC-ROC = 0,78). O ponto de corte da NGAL variou conforme a etiologia da insuficiência renal, mas de maneira geral ficou acima de 150 ng.mL⁻¹.

1.5 HIDRATAÇÃO

A hipovolemia perioperatória deve ser rapidamente corrigida por expansão volêmica com fluidos endovenosos durante e após a cirurgia. A escolha do melhor fluido a ser utilizado, se cristalóides ou colóides para expansão do volume intravascular ainda permanece controverso e ambos apresentam vantagens e desvantagens.

Estudo multicêntrico sobre reposição volêmica em pacientes críticos não encontrou diferenças entre albumina e cloreto de sódio a 0,9% em termos de risco de LRA. Os efeitos renais de diferentes colóides ainda não foram totalmente elucidados. Albumina e gelatina parecem seguras em pacientes com função renal normal⁴⁰.

Os cristalóides são os fluidos mais frequentemente utilizados na reposição e ressuscitação volêmica, principalmente o Ringer lactato e o soro

fisiológico. Devido ao pequeno tamanho de suas moléculas, as soluções cristalóides cruzam livremente e rapidamente o endotélio vascular, equilibrando-se em poucos minutos com o líquido extravascular. Essa mobilidade transmembrana pode levar a rápido acúmulo de líquidos no espaço intersticial e o extravasamento do fluido para o extravascular, fazendo com que seus efeitos hemodinâmicos máximos ocorram imediatamente após a infusão, e perdurem por pouco tempo, não produzindo efeitos duradouros sobre o sistema cardiovascular e exigindo novas infusões para a manutenção do efeito hemodinâmico inicial. Alguns estudos demonstram que menos de 20% do Ringer lactato permanecem no espaço intravascular cerca de duas horas após o término da sua infusão. As soluções cristalóides são seguras, atóxicas, não reagentes, baratas e prontamente disponíveis. As complicações descritas com o uso dos cristalóides incluem as relacionadas à ressuscitação incompleta, ao acúmulo de líquido no espaço intersticial e a diminuição da pressão coloidosmótica devido à diluição das proteínas plasmáticas. Em pacientes com choque hemorrágico, a reposição volêmica com cristalóides pode levar a diluição das proteínas da cascata de coagulação, contribuindo para os distúrbios hemorrágicos.

A solução de Ringer lactato (RL) tem sido exaustivamente estudada para determinar seu papel na disfunção imune induzida pela hemorragia, na inflamação e na lesão endotelial. Apesar dos efeitos deletérios imputados ao Ringer lactato, ainda é a solução de escolha para reposição volêmica na maioria dos estudos clínicos e experimentais ⁴¹.

O hidroxietilamido (HES) é molécula sintética semelhante ao glicogênio. Essas soluções contêm partículas de diversos pesos moleculares, resultando em misturas heterogêneas, mas que são designadas por seu peso molecular médio. O hetamido foi produzido a partir de uma modificação da amilopectina submetida à hidroxilação, o que permite uma maior resistência à degradação pela amilase, aumentando sua meia-vida no plasma. O aumento do volume intravascular é maior do que a quantidade da solução infundida, devido à maior pressão coloidosmótica do colóide o que provoca o

deslocamento do líquido intersticial para o espaço intravascular. Sua permanência no intravascular é muito mais duradoura que a dos cristalóides, podendo perdurar por até 24 horas. Novas modificações na fórmula do hetamido levaram ao aparecimento do pentamido, sendo o HES (130/0,4) um exemplo desses. É uma solução com peso molecular mais baixo, com partículas menores e mais homogêneas. Essas mudanças levam a uma excreção mais rápida e com a geração de maior pressão coloidosmótica, levando a aumento proporcionalmente maior da volemia (cerca de 1,5 vezes o volume infundido) maximizando o seu efeito de expansor plasmático. Entretanto, há menor duração do efeito hemodinâmico, ou seja, em torno de 12 horas. O principal problema potencialmente relacionado com a infusão de hetamido é o desenvolvimento de coagulopatia, porém, essas modificações no tamanho das moléculas minimizaram esses riscos. A anafilaxia é um fenômeno raro.

A segurança de soluções de hidroxietilamido (HES) na insuficiência renal estabelecida não foi completamente esclarecida. Evidências recentes sugerem que HES está associada com a maior incidência de LRA que o RL em pacientes críticos com sepse grave. O HES apresenta algumas vantagens, como redução de isquemia esplênica da resposta inflamatória e diminuição da quebra de barreira endotelial, restauração do balanço entre proteínas anti-apoptose e pró-apoptose e correção do desequilíbrio dos linfócitos T1/T2 sem provocar coagulopatia⁴¹⁻⁴².

Portanto, a composição ideal de fluido e a taxa ideal de infusão não foram determinados e deve ser individualizada.

1.6 ANESTESIA

A disfunção renal secundária à isquemia e reperfusão (I/R) é uma grande preocupação em pacientes anestesiados submetidos à cirurgia envolvendo o rim ou a aorta, e esse risco é maior em pacientes com insuficiência renal prévia. Vários estudos já demonstraram o benefício dos

anestésicos no coração em situações de I/R pela ativação da adenosina trifosfato (ATP) canal de potássio dependente de ATP.

O efeito protetor dos anestésicos voláteis contra o dano por I/R foi demonstrado no coração, pulmão e cérebro, porém, os mecanismos responsáveis por tal proteção não estão completamente elucidados. O efeito protetor exercido por meio da ativação dos canais de potássio dependentes de ATP ou de efeitos anti-inflamatórios tem sido demonstrado em modelos de coração e de lesão pulmonar.

Lee et al., 2004⁴³, mostraram que três (halotano, isoflurano e sevoflurano), dos quatro anestésicos voláteis estudados tiveram um significativo efeito protetor renal em modelo de I/R, enquanto o desflurano não demonstrou essa propriedade. Diferentemente do efeito anestésico de proteção no coração, o efeito protetor renal existia apenas se a exposição ao anestésico fosse mantida durante o período de reperfusão. Outro dado interessante do estudo foi que os efeitos protetores renais dos anestésicos não se correlacionaram com os efeitos sobre o fluxo sanguíneo renal. Os autores sugerem que os anestésicos voláteis protegem os rins da lesão por I/R por redução dos processos necróticos e inflamatórios.

O isoflurano é um anestésico volátil de rápido início de ação e despertar e de fácil titulação. Assim como os demais anestésicos voláteis são primariamente eliminados pelos pulmões e com pouco acúmulo em pacientes com disfunção renal e hepática, com tempo de despertar curto e previsível⁴⁴.

O remifentanil é um opioide de ação ultracurta que age como agonista de receptor mu sendo 250 vezes mais potente que a morfina, e se caracteriza por rápido início e término de ação. É metabolizado por esterases plasmáticas não específicas em remifentanil ácido que possui pequena atividade farmacológica sendo então eliminado pelos rins⁴⁴⁻⁴⁵.

2 *Objetivos*

- **Primário:** avaliar a lesão renal aguda por meio da dosagem plasmática da NGAL em ratos submetidos à isquemia renal sob anestesia geral balanceada e hidratados com Ringer lactato ou com hidroxietilamido.
- **Secundário:** correlacionar a dosagem da NGAL plasmática com a lesão histológica renal.

3 *Material e Métodos*

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

3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

O experimento foi realizado no Laboratório Experimental de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em três grupos de dez animais. Todos foram induzidos por via inalatória com isoflurano em concentração inspirada de 4% e fluxo de oxigênio de 3 a 4 litros por minuto durante 5 minutos e mantidos conforme o grupo pertencente como descrito abaixo:

Grupo 1 (G1): Anestesia geral balanceada + **Ringer lactato** + isquemia renal

Grupo 2 (G2): Anestesia geral balanceada + hidroxietilamido (**HES**) + isquemia renal

Grupo 3 (G Controle): Anestesia geral balanceada + Ringer lactato, sem isquemia renal

Grupo Ringer lactato (G1) (n=10) - manutenção com isoflurano nas concentrações inspiradas entre 1% a 3% e remifentanil 0,05 a 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ em bomba de infusão. Hidratação com solução de Ringer lactato 5 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ em bomba de infusão. Após cada coleta de amostra sanguínea de 1,5 mL foi

realizada reposição com Ringer lactato no volume de 3 mL em *bolus* de 0,5 mL.

Grupo HES (G2) (n=10) - manutenção com isoflurano nas concentrações inspiradas entre 1% a 3% e remifentanil 0,05 a 0,1 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ em bomba de infusão. Hidratação com solução de hidroxietilamido (HES) (Voluven® 6%) 2 $\text{mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em bomba de infusão. Após cada coleta de amostra sanguínea de 1,5 mL foi realizada reposição com HES no volume de 1,5 mL em *bolus* de 0,5 mL.

Grupo Controle (G3) (n=10) - manutenção com isoflurano nas concentrações inspiradas entre 1% a 3% e remifentanil 0,05 a 0,1 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ em bomba de infusão. Hidratação com solução de Ringer lactato 5 $\text{mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em bomba de infusão. Após cada coleta de amostra sanguínea de 1,5 mL foi realizada reposição com Ringer lactato no volume de 3 mL em *bolus* de 0,5 mL.

Nos animais dos grupos **G1 e G2** foram realizadas laparotomia mediana e nefrectomia à direita, seguida de isquemia renal esquerda por meio do clampeamento da artéria renal esquerda por período correspondente a 30 minutos, quando a mesma foi desclampeada. Após 30 minutos de reperfusão, os fármacos foram suspensos e os animais despertos. Após 12 horas foi realizada reabertura da laparotomia e nefrectomia esquerda.

Nos animais do grupo **G3** foram realizadas laparotomia mediana e nefrectomia à direita. Suspensão dos fármacos e despertar dos animais. Após 12 horas, foi realizada reabertura da laparotomia e nefrectomia esquerda.

3.2 MOMENTOS ESTUDADOS

Momento 0 (M0): monitorização inicial

Momento 1 (M1): após a cateterização arterial e venosa

Momento 2 (M2): após 30 minutos de clampeamento da artéria renal esquerda

Momento 3 (M3): após 30 minutos de reperfusão renal

Momento 4 (M4): doze horas após o início do experimento

Cada animal possuía um protocolo individual onde eram anotados os atributos de interesse do experimento (ANEXO 1).

A monitoração da pressão arterial média, da capnometria e da temperatura retal permitiu o controle e manutenção do experimento. As monitorizações foram contínuas a partir do momento inicial (M0) por ocasião da cateterização da artéria carótida direita, durante todo o experimento até o despertar do animal, no primeiro dia do experimento, porém, foram registradas para a análise estatística imediatamente antes de cada coleta de amostra sanguínea.

Nos animais dos grupos G1 e G2 foram coletadas as amostras para dosagem da NGAL plasmática, após a cateterização da artéria carótida esquerda, considerado o momento um (M1); após 30 minutos de clampeamento da artéria renal esquerda, o momento dois (M2); após 30 minutos de reperfusão renal, o momento três (M3); e imediatamente antes do sacrifício do animal o momento quatro (M4), conforme demonstrado na tabela 1.

Nos animais do G3 (G Controle) essas coletas aconteceram no início do experimento (M1), 30 minutos após a primeira coleta (M2), 30 minutos após a segunda coleta (M3) e imediatamente antes do sacrifício do animal considerado o momento quatro (M4).

Tabela 1 - Resumo dos atributos e momentos estudados

Momentos	PAM/T	NGAL	HISTOLOGIA RENAL
M0 (início do experimento)	X		
M1 (estabilização)	X	X	
M2 (isquemia)	X	X	
M3 (reperfusão)	X	X	
M4 (final do experimento)		X	X

X-atributo presente

3.3 ATRIBUTOS ESTUDADOS

Os atributos estudados em cada animal dos três grupos de estudo foram os seguintes:

- Pressão arterial média (PAM)
- Temperatura retal (T)
- Dosagem de NGAL plasmática
- Avaliação histológica renal

3.4 SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL

Na véspera do experimento os animais foram transportados do biotério e acondicionados em gaiolas com dieta liberada para ingerir água e alimentos. Foram mantidos em jejum para sólidos por 12 horas antes do experimento. No início do experimento os animais foram pesados e anestesiados em uma campânula, com vapor de isoflurano a 4% e oxigênio a 100%, com fluxo de 3 a 4 litros por minuto durante cinco minutos e transferidos para uma prancha inclinada em 40 graus, onde foi realizada a intubação traqueal. Foram transferidos para uma mesa operatória e conectados ao ventilador (*683 Rodent Ventilator®*, *Harvard Apparatus Inc. - EUA*) com frequência ventilatória de 60 a 70 incursões por minuto (ipm) e volume corrente de aproximadamente 10 mL.kg⁻¹ de peso do animal. Os animais foram mantidos sob ventilação artificial com fração inspirada de oxigênio 100%, com fluxo de 2 a 3 litros por minuto e isoflurano na concentração de 1% a 3%. O ajuste da ventilação foi auxiliado pela capnometria e capnografia. Alterações do capnograma, que indicassem obstrução do tubo traqueal, eram prontamente corrigidas com manobras de aspiração e limpeza, até a obtenção de uma ventilação adequada.

Os animais foram mantidos sobre e sob bolsas térmicas pré-aquecidas para a manutenção da temperatura retal em aproximadamente

37°C. Foi então instalado um sensor de termômetro digital para a medida da temperatura retal.

A seguir foi realizada infiltração da região cervical e mediana do abdome com bupivacaina a 0,125% na dose de 2 mg.kg⁻¹. Logo após foi realizada incisão cervical mediana, e sob visão direta, as punções:

- 1) da veia jugular direita com venocatch 24 GA – para a infusão de líquidos e fármacos, por bomba de infusão (*ANNE*® – *Abbott Laboratories*, EUA)
- 2) da artéria carótida esquerda com *venocatch* 24 GA - para a monitorização cardiovascular e coleta de amostras sanguíneas.

Iniciada a infusão contínua de remifentanil nas doses de 0,05 a 0,1 µg.kg⁻¹min⁻¹ utilizando a bomba de infusão.

Foram monitoradas a pressão arterial média, sistólica e diastólica, a frequência cardíaca, a concentração do gás carbônico no final da expiração e a temperatura retal, por sensores conectados ao monitor *Datex-Ohmeda modelo AS3 (Engstron - Finlândia)*. Os valores das variáveis monitoradas, para o controle e o ajuste da anestesia foram anotados nos diversos tempos considerados: momento zero (M0), momento um (M1), momento dois (M2) e momento três (M3).

Após o momento zero (M0), quando os animais já se encontravam monitorizados, iniciaram-se as coletas sanguíneas para dosagem da NGAL plasmática (pNGAL) nos momentos descritos a seguir:

Momento um (M1): primeira coleta, logo após a cateterização arterial e venosa, foi coletado 1,5 mL de sangue arterial para dosagens de pNGAL seguida de reposição com Ringer lactato no volume de 3 mL em *bolus* de 0,5 mL por via venosa para os animais do G1; HES no volume de 1,5 mL em *bolus* de 0,5 mL por via venosa para os animais do G2; Ringer lactato no volume de 3 mL em *bolus* de 0,5 mL por via venosa para os animais do G3.

Nos animais dos grupos G1 e G2 foram feitas laparotomias mediana para realização dos procedimentos sobre os rins, seguida da nefrectomia direita para prevenir uma possível compensação, pelo rim direito, da isquemia renal esquerda. Este procedimento fez parte do modelo de isquemia renal estudado e foram feitos em todos os animais desses dois grupos.

Nos animais do grupo G3 (Controle) foram realizadas laparotomias mediana para realização da nefrectomia direita. A seguir foi realizado o fechamento da laparotomia. Este procedimento faz parte do modelo experimental para estudo de grupo controle de isquemia renal.

Em pesquisas anteriores realizadas neste laboratório de pesquisa, aproximadamente 250 rins obtidos de nefrectomia à direita foram submetidos aos exames histológicos e se mostraram normais.

Realizado clampeamento da artéria renal esquerda por um período de 30 minutos (período de isquemia) e fechamento da incisão cirúrgica nos animais dos grupos G1 e G2. Após os 30 minutos de clampeamento foi realizada segunda coleta (M2).

Momento dois (M2): foi coletado 1,5 mL de sangue arterial para dosagens de pNGAL, seguida de reposição com Ringer lactato no volume de 3 mL em *bolus* de 0,5 mL por via venosa para os animais do G1; HES no volume de 1,5 mL em *bolus* de 0,5 mL por via venosa, nos animais do G2. Nos animais do G3 (G Controle) após 30 minutos da primeira coleta foi realizada a segunda coleta de 1,5 mL de sangue arterial para dosagens de pNGAL seguida de reposição com Ringer lactato no volume de 3 mL em *bolus* de 0,5 mL por via venosa.

Após a segunda coleta foi realizada a reabertura da incisão cirúrgica. Nos animais dos grupos 1 e 2 o *clamp* vascular atraumático foi liberado. Observou-se a mudança da coloração do rim antes, durante e após o clampeamento. Realizou-se o fechamento da laparotomia e aguardou-se um período de 30 minutos de reperfusão, momento em que foi realizada a terceira coleta.

Momento três (M3): nesse momento foi coletado 1,5 mL de sangue arterial para dosagens de pNGAL, seguida de reposição com Ringer lactato no volume de 3 mL em *bolus* de 0,5 mL por via venosa, nos animais do G1; HES no volume de 1,5 mL em *bolus* de 0,5 mL por via venosa, nos animais do G2. Nos animais do G3 (G Controle) após a segunda coleta aguardou-se um período de 30 minutos quando foi realizada a terceira coleta de 1,5 mL de sangue arterial para dosagens de pNGAL, seguida de reposição com Ringer lactato no volume de 3 mL em *bolus* de 0,5 mL por via venosa. A seguir ocorreu o fechamento da incisão cervical (após a retirada dos cateteres), em um único plano. Foi então interrompida a administração do anestésico inalatório.

Após o encerramento da administração do agente anestésico o animal foi desperto e realizadas a extubação e a transferência do animal para a gaiola, com a liberação de água e de alimentação.

Doze horas após o início do experimento, considerado o momento quatro (M4), os animais retornaram ao laboratório, onde foram anestesiados com isoflurano a 4% durante 5 minutos através de uma tenda. Foi realizada a reabertura da sutura abdominal e a nefrectomia esquerda e coleta de sangue, por punção intracardíaca, para as dosagens de pNGAL.

A seguir os animais foram sacrificados com sobredose de pentobarbital sódico por via intracardíaca.

As amostras sanguíneas coletadas para dosagem da NGAL plasmática foram centrifugadas e armazenado o sobrenadante em freezer a 80C° negativo para posterior medição. Para a dosagem da NGAL plasmática foi utilizado o método ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), teste imunoenzimático que permite a detecção quantitativa de anticorpos específicos no plasma (interação antígeno – anticorpo). O kit utilizado foi o *NGAL RAPID ELISA KIT (037)*.

3.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Os rins dos animais foram retirados e colocados em solução de Duboscq-Brasil separadamente em dois frascos e identificados como rim direito e esquerdo durante 24 horas, sendo, a seguir, armazenados em álcool 80%, 150 mL; ácido pícrico, 2,4 g; formalina 40%, 60 mL; ácido acético glacial, 12,5 mL para posterior avaliação histológica.

A solução de Duboscq-Brasil foi utilizada para preservar e fixar as estruturas renais e aumentar a fidedignidade da análise histológica. O corante utilizado para a análise histológica foi a hematoxilina-eosina e os cortes foram verificados sob diversos aumentos na microscopia óptica. Após o preparo das lâminas dos rins, com fixação em parafina, essas foram avaliadas quanto à porcentagem de necrose tubular e classificadas de acordo com escore descrito por Park et al., 2008⁴⁶, conforme tabela 2.

Tabela 2 - Escores dos graus de lesão celular atribuídos aos exames histológicos

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

Adaptada de Park et al., 2008

Os seguintes graus de lesão foram definidos:

Grau 0 = nenhuma lesão

Grau 1 (lesão leve) = menos de 10% de necrose de células tubulares

Grau 2 (lesão leve a moderada) = 10% a 25% de necrose de células tubulares

Grau 3 (lesão moderada a grave) = 25% a 50% de necrose de células tubulares

Grau 4 (lesão grave) = 50% a 75% de necrose de células tubulares

Grau 5 (lesão grave a muito grave) = mais de 75% de células tubulares

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

Os critérios microscópicos utilizados para graduar a necrose das células tubulares foram os seguintes: picnose nuclear, cariorexe e cariólise ou cromatólise (rompimento de membranas celulares)⁴⁷.

Picnose: alteração degenerativa do núcleo da célula que apresenta volume reduzido (diminui até menos de 6 micras de diâmetro) e torna-se hiperconrado, tendo sua cromatina condensada. A picnose é um processo que indica a necrose do tecido e, eventualmente, pode ocorrer a fragmentação do núcleo picnótico (núcleo celular cuja cromatina está condensada devido a um processo patológico) (Figura 1).

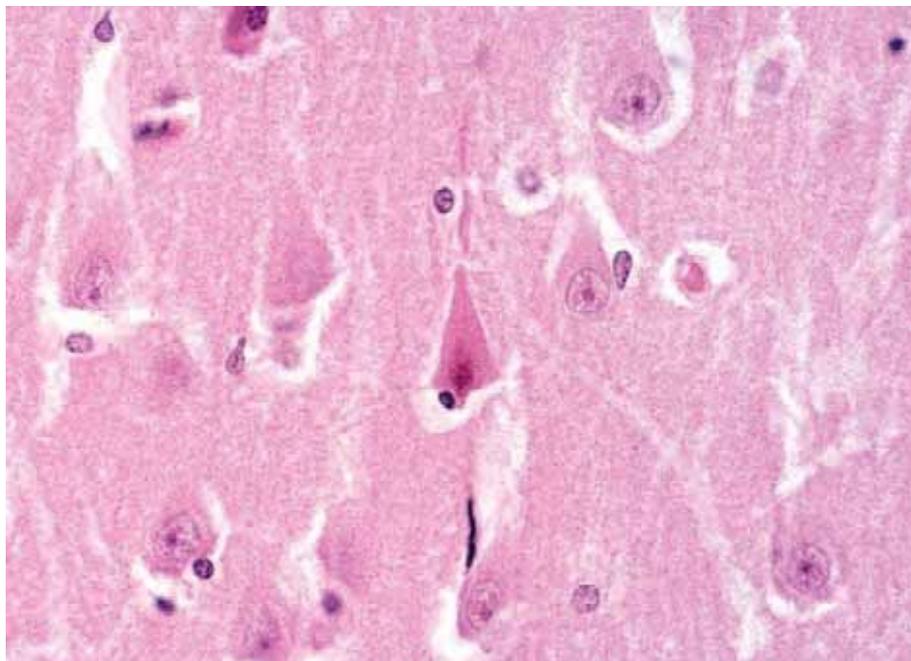


Figura 1 – Picnose nuclear

Cariorrexe: fragmentação do núcleo picnótico. A cromatina adquire distribuição irregular, podendo se acumular em grânulos na membrana nuclear. Ocorre perda dos limites nucleares (Figura 2).

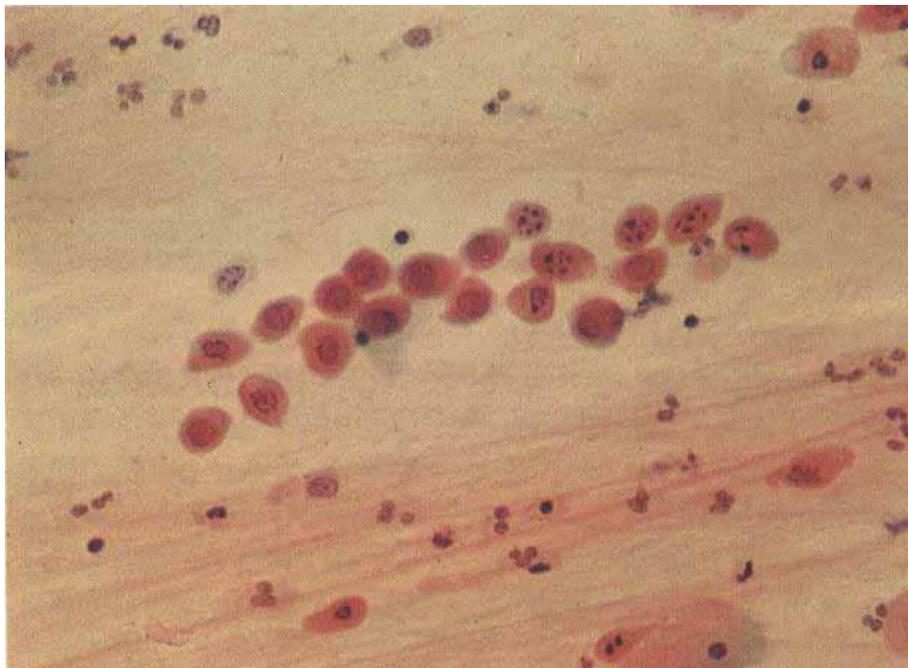


Figura 2 – Cariorrexe

Cariólise ou Cromatólise: destruição, por dissolução, do núcleo da célula. Ocorre a dissolução da cromatina e a perda da coloração do núcleo, o qual desaparece completamente (Figura 3).

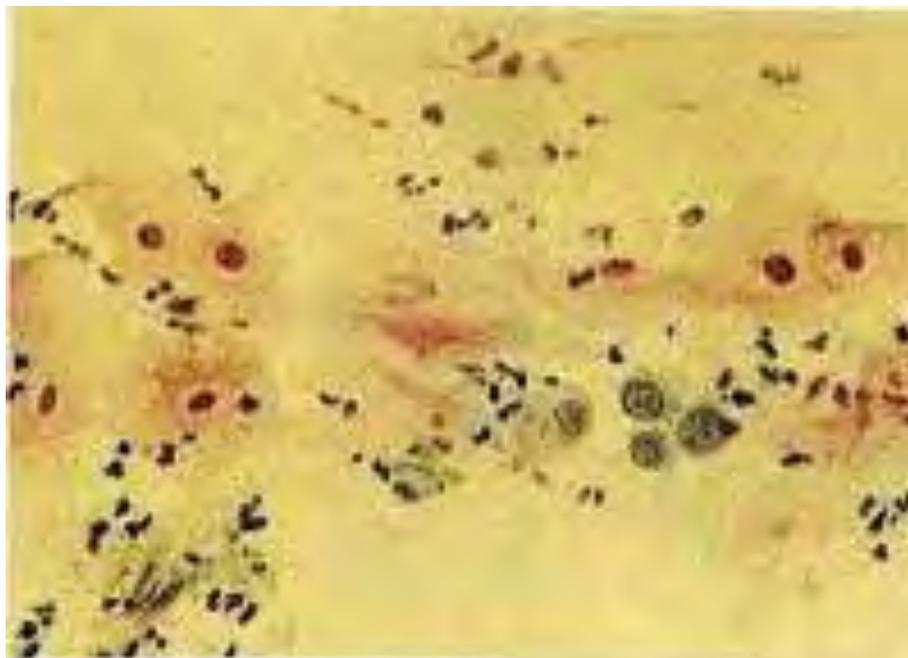


Figura 3 - Cariólise ou Cromatólise

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

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

Para as variáveis PAM, ETCO_2 e temperatura – uma vez que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias – foram realizadas análises de perfil, seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas entre as médias.

Para a variável NGAL, como a variabilidade foi muito grande entre os momentos, foi utilizado o teste de Friedmann, seguido do teste de Dunn para comparações entre os momentos e o teste de Mann Whitney para comparação entre os grupos em cada momento.

Para as variáveis da análise histológica foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

Os dados foram expressos como médias e desvio padrão (DP) ou medianas e quartis. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4 Resultados

4.1 PESO

Tabela 3 - Valores da média e desvio padrão (DP) referentes ao peso (gramas) segundo o grupo

Grupo	Peso (DP)
G1	477,0 ± 24,5 A
G2	437,0 ± 55,2 AB
G3	435,0 ± 24,2 B

Letras maiúsculas comparam médias dos grupos

Comentários: os valores do peso (gramas) apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos G1, G2 e G3 ($p=0,03$).

4.2 TEMPERATURA CORPORAL DOS ANIMAIS (T)

Tabela 4 - Valores da média e desvio padrão referentes à Temperatura (°C) segundo momentos e grupos

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

Não houve efeito de grupo ($p=0,07$), momento ($p=0,54$) e nem da interação grupo X momento ($p=0,25$)

Comentários: os valores da temperatura retal (T) não apresentaram diferenças entre os grupos nos momentos estudados

4.3 PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM)

Tabela 5 - Valores da média e desvio padrão referentes à PAM (mmHg) segundo momentos e grupos

Grupos	Momentos				Media geral dos grupos
	M0	M1	M2	M3	
G1	114,6 ± 14,3	107,1 ± 19,3	102,2 ± 13,2	101,8 ± 18,6	106,4 ± 16,8A
G2	95,5 ± 28,9	94,9 ± 20,2	95,0 ± 15,2	96,0 ± 11,7	95,4 ± 19,3B
G3	101,0 ± 15,5	86,9 ± 13,1	85,0 ± 15,2	86,5 ± 15,4	89,9 ± 15,7B
Media geral dos momentos	103,7 ± 21,6	96,3 ± 19,2	94,1 ± 15,8	94,8 ± 16,3	

Não houve efeito de momento($p=0,28$) e nem da interação grupo X momento($p=0,76$), mas somente de grupo($p<0,001$)

Letras maiúsculas comparam médias gerais dos grupos

Comentários: os valores da PAM (mmHg) apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos G1 e G2 ($p<0,001$) G1 e G3 ($p<0,001$) e não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos G2 e G3. Não houve efeito de momento ($p=0,28$) e nem interação grupo X momento ($p=0,76$).

4.4 LIPOCALINA ASSOCIADA À GELATINASE DOS NEUTRÓFILOS (NGAL)

Tabela 6 - Mediana, 1º quartil e 3º quartil entre colchetes, referentes à NGAL (ng.mL⁻¹) segundo momento e grupo

GRUPOS	MOMENTOS			
	M1	M2	M3	M4
G1	2,20[0,07;4,07]b	4,29[0,86;10,27]b	4,04[2,78;9,10]b	400[385,69;400]a
	B	A	A	A
G2	6,21[3,80;15,85]b	7,89[5,46;13,83]b	9,88[6,92;14,69]b	400[400,00;400,00]a
	AB	A	A	A
G3	11,68[9,38;14,36]ab	10,22[7,36;10,85]ab	8,86[6,88;10,98]b	75,37[20,47;153,14]a
	A	A	A	B

Letras minúsculas comparam momentos em cada grupo
 Letras maiúsculas comparam grupos em cada momento
 p=0,001 comparando momentos em cada grupo
 p=0,001 comparando os grupos em M1 e M4
 p>0,05 comparando os grupos nos outros momentos

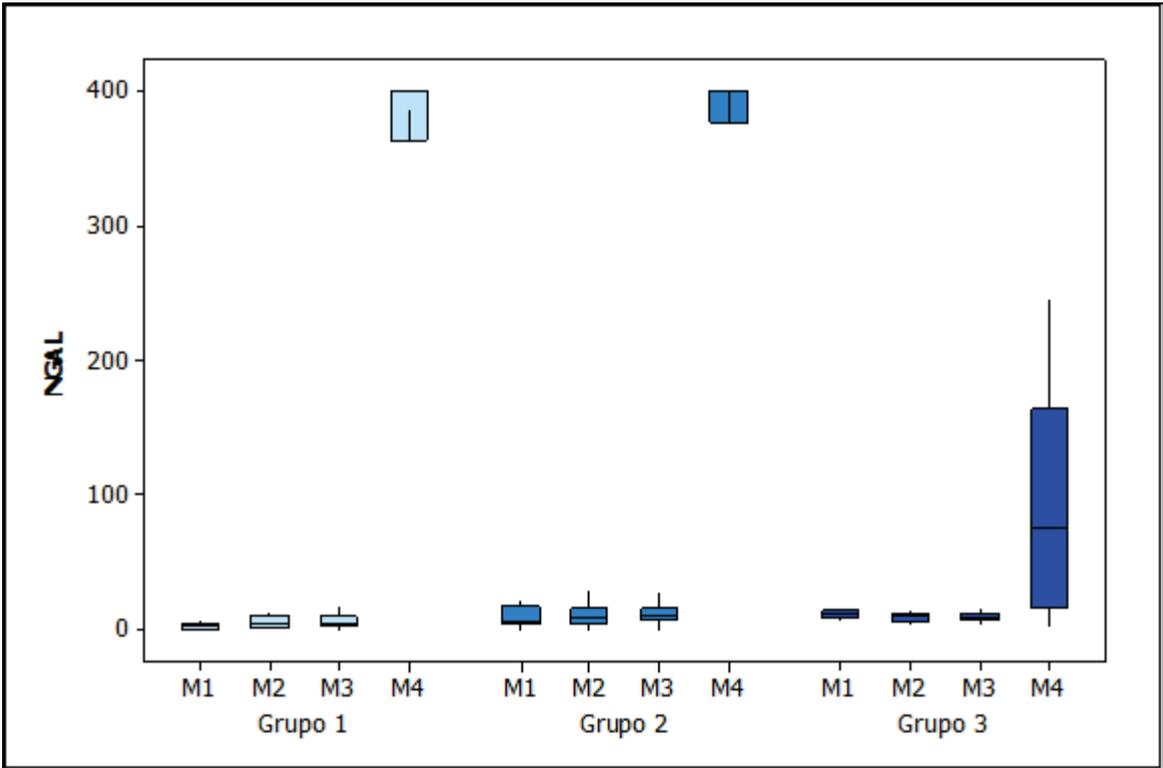


Figura 4 - *Boxplot* referente aos valores da NGAL (ng.mL^{-1}) nos quatro momentos segundo os grupos.

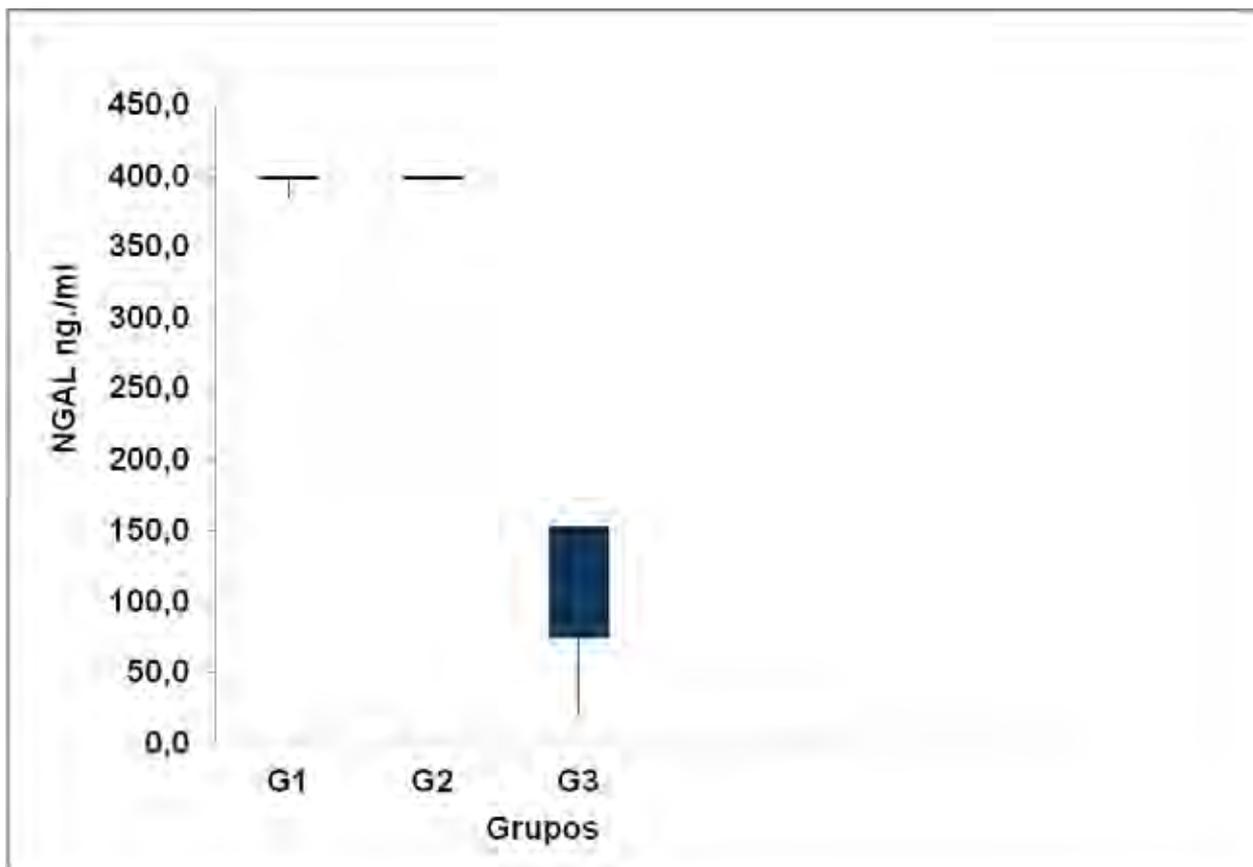


Figura 5 – *Boxplot* referente aos valores da NGAL (ng.mL^{-1}) momento quatro (M4) nos três grupos estudados.

Comentários: os valores da NGAL plasmática (ng.mL^{-1}) obtidos foram estatisticamente diferentes quando comparado o M1 com o M4 ($p=0,001$) nos três grupos. Quando comparados os grupos nos outros momentos $p>0,05$. Quando comparado os diversos momentos em cada grupo $p=0,001$, mostrando diferença entre o M4 e os demais momentos dentro do mesmo grupo (Tabela 6 e Figuras 4 e 5).

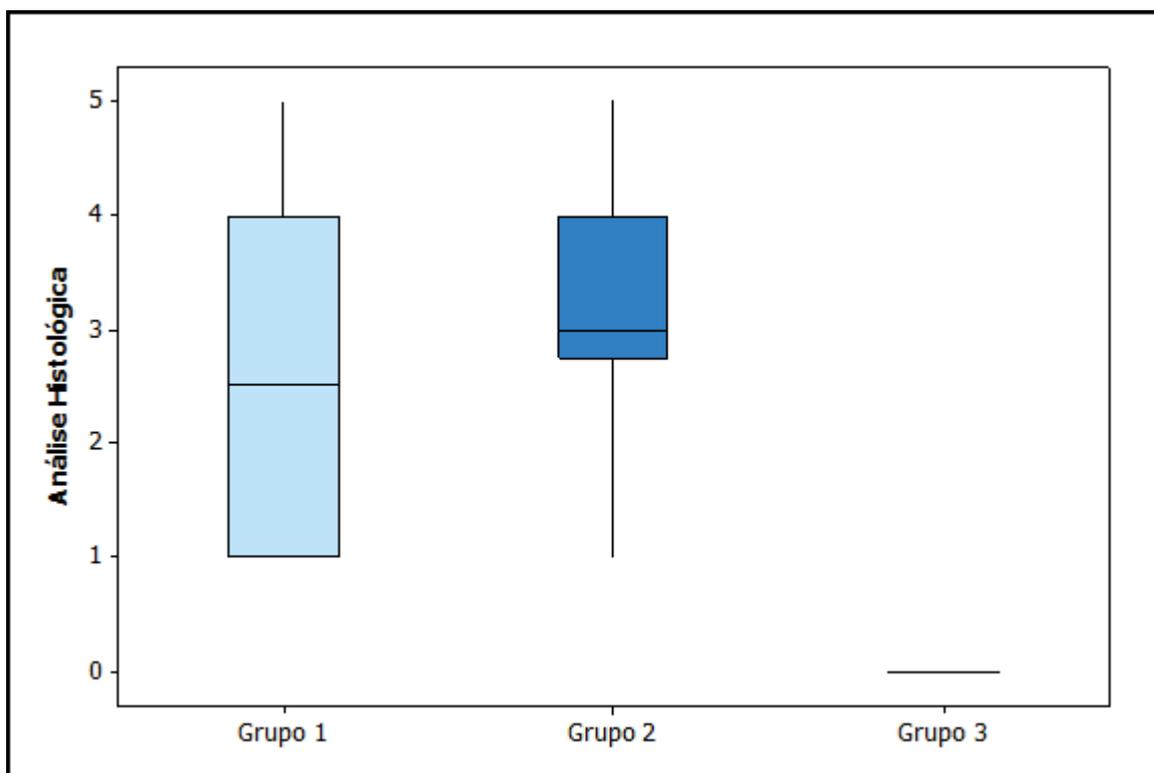
4.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Tabela 7 - Mediana, 1º e 3º quartil, entre colchetes, referentes aos escores da intensidade da lesão histológica segundo os grupos e lados (direito e esquerdo)

Grupos	Escore de Lesão	
	Rim Direito	Rim Esquerdo
G1	0[0,0]b A	2[1,4]a A
G2	0[0,0]b A	3[3,4]a A
G3	0[0,0]a A	0[0,0]a B

Grupos seguidos de pelo menos uma letra em comum não diferem estatisticamente
Letras minúsculas comparam lados em cada grupo ($p < 0,01$ para os grupos Ringer e Amido) e $p = 1,00$ para o grupo Controle
Letras maiúsculas comparam grupos em cada lado ($p = 0,37$ para os rins direitos e $p < 0,01$ para os rins esquerdos)

Escore de avaliação histológica



$p < 0,05$

Figura 6 - *Boxplot* referente à avaliação histológica da lesão celular, segundo o grupo.

Comentário: os valores dos escores dos exames histológicos (segundo a Tabela 7) mostraram que quando comparados os rins direitos dos três grupos não houve diferença entre os escores ($p=0,37$). Quando comparado os rins esquerdos não diferiram estatisticamente dos grupos G1 e G2 e diferiram estatisticamente entre os grupos G1 e G2 do grupo G3 ($p < 0,01$). Quando se comparou os rins direitos e esquerdos em cada grupo foi estatisticamente significativa nos grupos G1 e G2 ($p < 0,01$) e não significativa no G3 ($p=1,00$). O grupo G1 (2[1;4]) apresentou escore de lesão moderada e G2 (3[3;4]) escore de lesão moderada à grave quanto à avaliação histológica do rim esquerdo.

Apresentação das fotografias das lâminas referentes à mediana dos escores da intensidade da lesão histológica do rim esquerdo segundo os grupos (Figuras 7, 8 e 9).

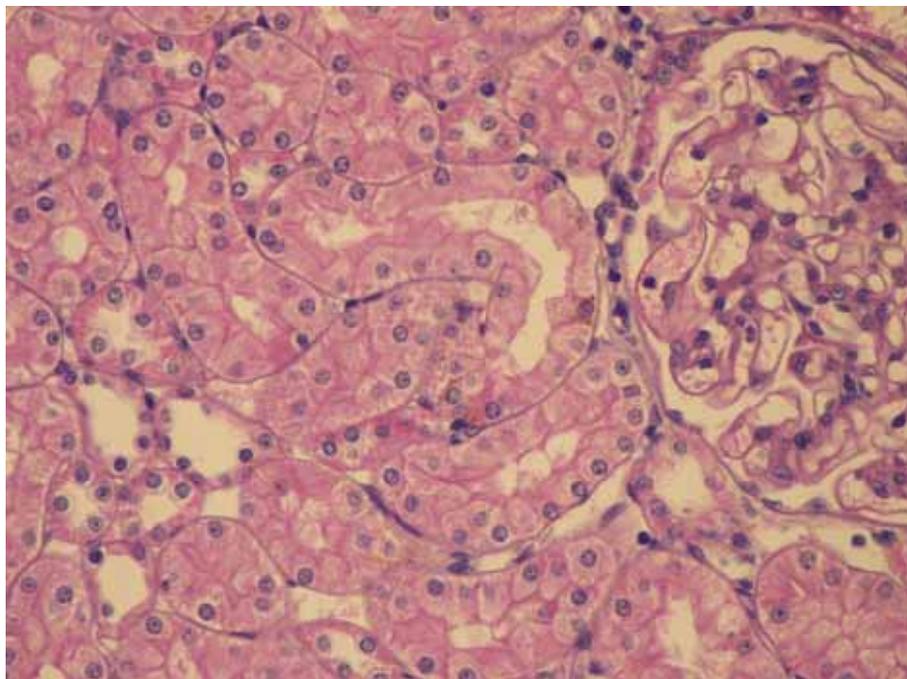


Figura 7 - Mediana referente aos escores da intensidade da lesão histológica - Grupo 3 (Controle) – grau zero de Park⁴⁷ (aumento 200x).

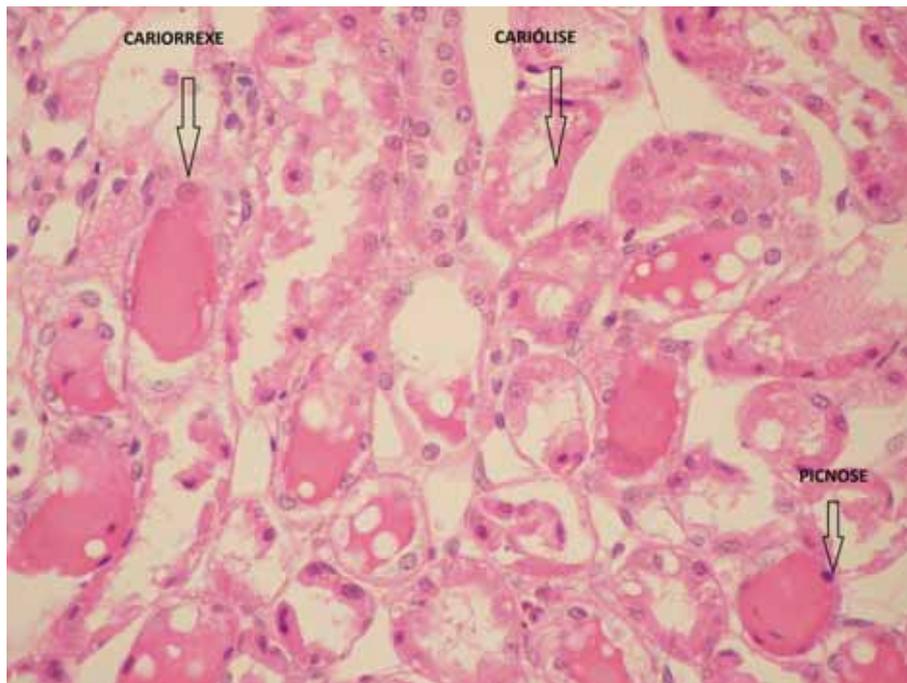


Figura 8 - Mediana referente aos escores da intensidade da lesão histológica - Grupo 1 – grau dois de Park⁴⁷ (aumento 200x).

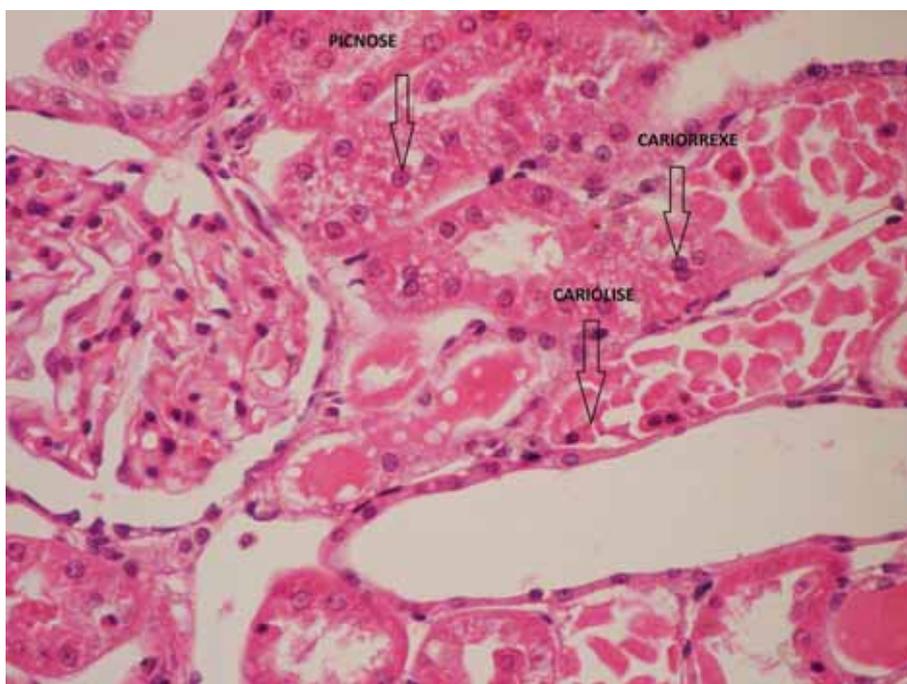


Figura 9 - Mediana referente aos escores da intensidade da lesão histológica Grupo 2 – grau três de Park⁴⁷ (aumento 400x).

5 Discussão

5.1 MODELO ANIMAL

O estudo utilizou o modelo isquemia/reperfusão (I/R) em ratos e foi desenvolvido no Laboratório Experimental de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. É modelo consolidado, tendo sido utilizado para estudos de proteção renal em mais de 1000 ratos machos *Wistar*, em que houve controle da ventilação pulmonar, pressão arterial e temperatura.

Foram escolhidos ratos machos por serem mais susceptíveis à lesão por isquemia e reperfusão⁴⁶.

Foi realizada nefrectomia direita para que não houvesse compensação do rim contralateral, sendo a isquemia temporária renal executada com *clamp* microvascular atraumático, garantindo assim a integridade vascular com subsequente adequada reperfusão após a liberação do fluxo pelo desclameamento vascular. Segundo Modolo et al., 2001⁴⁸, a nefrectomia unilateral determina recuperação mais rápida da falência renal, menor lesão isquêmica e maior produção de fatores humorais que estimula a reparação renal compensatória. Em ratos não uninefrectomizados ocorreu aumento da resistência vascular renal do rim que foi submetido à isquemia devido a ativação e liberação de renina-angiotensina pelo outro rim intacto⁴⁹

Todos os ratos utilizados nesse estudo pesavam acima 350 gramas, sendo que a média dos pesos variou entre os grupos (G1>G2>G3) conforme tabela 3. Entretanto essa variação de peso não interferiu com os parâmetros avaliados, pois todos os animais apresentavam pesos superiores a 350 gramas conforme definido na metodologia, eram de uma mesma linhagem e

maturidade e todas as reposições volêmicas e de fármacos foram baseadas nos pesos individualizados de cada animal.

Os efeitos da variação da temperatura durante período isquêmico de 45 minutos em rim esquerdo de rato, após nefrectomia direita foram demonstrados por Delbridge et al., 2007⁵⁰.

Neste estudo, a temperatura retal (T) foi um parâmetro mensurado para controle do experimento. Medidas para manutenção da normotermia foram realizadas evitando assim que a hipotermia pudesse interferir com a lesão renal. Portanto, em todos os animais a média da temperatura retal ao final do procedimento nos diferentes grupos foi de 37°C. A temperatura foi monitorizada por meio de um termômetro digital com sensor colocado no reto dos animais e foi mantida entre 36°C a 38°C, com o emprego de bolsas térmicas. Os valores da temperatura retal não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos nos momentos estudados. É importante a manutenção da temperatura no modelo I/R porque a hipotermia durante I/R protege o órgão, com menor grau de lesão renal, da mesma forma que quando ocorre hipertermia os graus de lesão são maiores. Portanto, a especificação e o controle da temperatura, como variável do modelo experimental na I/R é essencial para que não contribua como fator agravante ou protetor no modelo I/R. O estudo de Zager e Altschuld, 1986⁵¹, apresentou resultados que comprovaram que a hipertermia potencializa a lesão isquêmica renal enquanto a hipotermia confere proteção aos rins.

As técnicas anestésicas com o isoflurano e o remifentanil neste modelo animal foram idênticas nos três grupos e tituladas conforme resposta terapêutica de cada animal, porém, evitando que provocassem alterações significativas na pressão arterial média. A concentração de isoflurano inalada foi semelhante à utilizada na prática clínica, em seres humanos.

Os valores da PAM em mmHg conforme demonstrados na tabela 5, apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos G1 e G2

(G1>G2) G1 e G3 (G1>G3) e não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos G2 e G3. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os momentos e nem interação grupo *versus* momento. Apesar dessa variação hemodinâmica que se refletiu em menores valores de PAM no grupo 3 (G3), não houve correspondência clínica-laboratorial que poderia ser comprovada com maior lesão renal avaliada pela dosagem de NGAL plasmática e/ou análise histológica renal. Pelo contrário, os animais do grupo 3 não apresentaram nenhum grau de lesão histológica. Apesar dos menores níveis pressóricos dos animais dos grupos dois e três as mesmas se mantiveram dentro do limite de autorregulação de perfusão renal.

Os valores da NGAL plasmática (ng.mL^{-1}) obtidos foram estatisticamente diferentes quando comparados M1 com M4 ($p=0,001$) nos três grupos. Quando comparados os grupos nos demais momentos estudados não houve diferença ($p>0,05$). Quando foram comparados os diversos momentos estudados em cada grupo $p=0,001$, M4 apresentou os demais momentos dentro do mesmo grupo (Tabela 6 e Figuras 4 e 5)

Em pacientes que apresentaram LRA principalmente associada à cirurgia cardíaca onde se conhece o momento real do dano renal, estudo de novos biomarcadores de LRA tem-se mostrado promissores⁵².

A NGAL é uma proteína induzida no rim após a lesão isquêmica ou nefrotóxica. Elevações são detectáveis dentro de horas de lesão renal aguda, enquanto que elevações de creatinina correspondente só ocorrem após 1 a 3 dias. Estudos já demonstraram sua utilidade como biomarcador diagnóstico em pacientes submetidos à CEC, angiografia com administração de contraste e diarreia associadas à síndrome hemolítico-urêmica. Estudos recentes sugerem que níveis elevados de NGAL demonstram uma rápida diminuição da função renal em pacientes com diagnóstico de doença renal crônica prévia⁵³. O aumento da NGAL no rato pode ocorrer em transformação maligna ou quando da exposição de determinadas células a estímulos

inflamatórios. Ocorre aumento rápido e precoce da NGAL nas células tubulares proximais após isquemia e reperfusão do rim⁵⁴. Esses resultados iniciais foram confirmados em situação de lesão nefrotóxica aguda por vários grupos de pesquisa⁵⁵⁻⁵⁷. No entanto, a maioria dos estudos mediram exclusivamente o aumento da NGAL em termos de RNAm no tecido renal e há poucos estudos sobre dados quantitativos dos níveis da proteína NGAL na urina ou plasma de ratos quer no estado basal ou após lesão renal aguda. Existem diferenças consideráveis em relação ao tempo e magnitudes da resposta do RNAm NGAL aos diferentes agentes nefrotóxicos, e, também, pode haver diferenças na quantidade de NGAL urinária e plasmática em resposta ao estímulo tóxico.

Nesse estudo onde a isquemia renal foi provocada por meio do clampeamento da artéria renal esquerda nos animais dos grupos 1 e 2, o aumento sequencial da NGAL plasmática pode ser acompanhado nas primeiras 12 horas a partir do momento um (M1) até o maior valor medido no momento quatro (M4), e que demonstra a validade da NGAL como marcador precoce de LRA. Houve também aumento da pNGAL no grupo 3 (G Controle) porém mantendo-se com valores abaixo de 150 ng.mL⁻¹ considerado o valor limite da normalidade. Esse aumento da NGAL no grupo controle pode ser justificado pela resposta ao estresse anestésico-cirúrgico, pela manipulação das alças intestinais do animal e pela ventilação mecânica a que os animais foram submetidos. Todos esses fatores são potencialmente capazes de elevar a NGAL plasmática.

No estudo de Cruz et al., 2010¹⁴, com 301 pacientes, 133 (44%) desenvolveram LRA durante a sua permanência na UTI. A NGAL plasmática foi um bom marcador diagnóstico nas primeiras 48 horas de internação (área ROC 0,78, 95% CI 0,65-0,90), e para necessidade de TSR (área ROC 0,82, 95% CI 0,70-0,95) representado na figura 10. Houve aumento do pico de concentrações plasmáticas da NGAL com o agravamento da LRA (R=0,554,p< 0,001). Esse estudo concluiu ser a NGAL plasmática um

marcador útil na fase inicial da LRA, mesmo em pacientes onde não se conhece o momento real do insulto renal. Permitiu assim o diagnóstico da LRA até 48 horas antes de qualquer manifestação clínica ou alteração laboratorial critérios utilizados para definir LRA baseado no consenso RIFLE ou seja débito urinário e elevação da creatinina. Além do que a pNGAL prevê necessidade de TSR e se correlaciona com a gravidade da lesão renal aguda. Usando um valor limite de 150 ng.mL^{-1} para pNGAL, a sensibilidade foi de 73%, e especificidade foi de 81%.

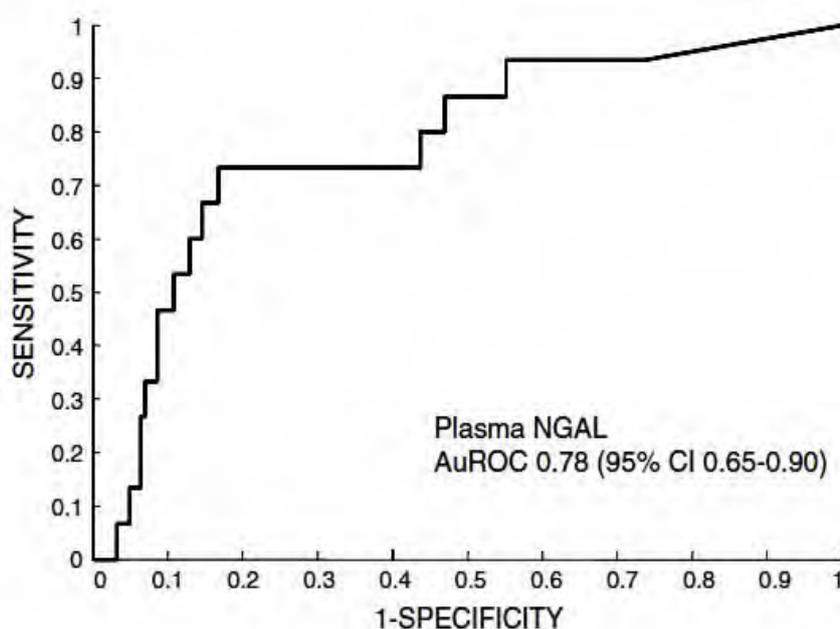


Figura 10 - Curva-Receptor de operação característica (ROC) para NGAL plasmática (Cruz et al., 2010¹⁴).

No referido trabalho de Cruz et al., 2010¹⁴, o mesmo definiu LRA utilizando a creatinina e o débito urinário baseado nos critérios da classificação de RIFLE³ e comprovou a precocidade do aumento da pNGAL 24 horas antes da elevação da creatinina utilizada para diagnosticar LRA baseada na classificação RIFLE apresentado na figura 11.

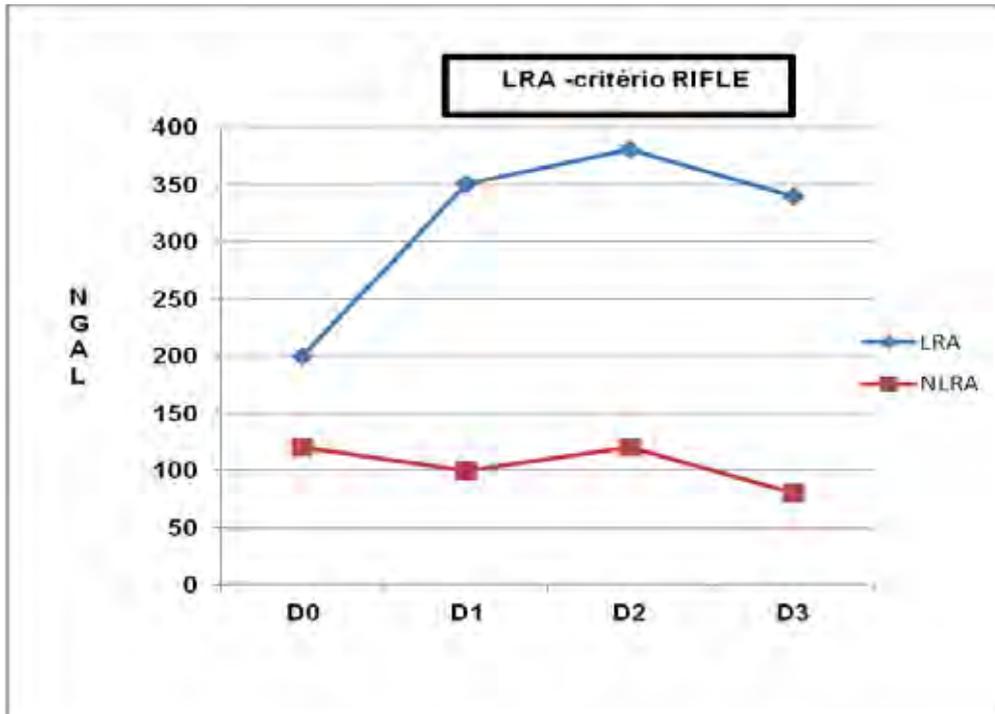


Figura 11 - Concentrações médias de pNGAL em intervalo de tempo em vários pacientes com e sem LRA. O eixo X representa o dia de internamento na UTI. D1 é o dia em que o diagnóstico de LRA foi feito pela primeira vez com base nos critérios RIFLE. Pacientes que não desenvolveram LRA apresentaram valores relativamente mais baixos pNGAL sem notável variação ($p < 0,001$ em cada momento) Adaptado de Cruz et al.,2010¹⁴.

O nosso estudo demonstra claramente o aumento sequencial dos valores da pNGAL a partir do momento um (M1) nos três grupos, sendo que apenas no momento quatro (M4) ao final do experimento nos grupos 1 (G1) e 2 (G2) a mediana da NGAL (400 ng.mL^{-1}) alcançou níveis elevados em torno de 60 vezes do valor inicial. Nos animais do grupo 3 (G Controle) que não sofreram isquemia renal apesar do aumento dos valores de pNGAL (mediana de $75,37 \text{ ng.mL}^{-1}$) os valores da mesma permaneceram abaixo do considerado normal de 150 ng.mL^{-1} .

Evidências recentes sugerem que HES está associada com maior incidência de LRA do que o Ringer lactato em pacientes críticos com sepse

grave⁴⁰. Nesse experimento quando se comparou as dosagens da pNGAL entre os animais do G1 hidratados com Ringer lactato e os animais do G2 hidratados com HES não houve diferença estatística entre esses dois grupos demonstrando a não interferência da solução de hidratação no aumento do marcador renal e sim apenas o clampeamento da artéria renal esquerda como fator determinante da lesão isquêmica, fato esse comprovado pelos valores normais da pNGAL no G3 (G Controle). Quando se comparou os grupos G1 e G3 no momento 4 (M4) a mediana da pNGAL foi de 400 ng.mL⁻¹ e 75,37 ng.mL⁻¹ sendo a diferença estatisticamente significativa (p=0,001) quando os animais de ambos os grupos foram hidratados com RL e o que os diferenciaram foi a ausência de isquemia renal no grupo G3 (G Controle).

O melhor fluido para hidratação ainda não é um consenso na literatura e a maioria dos trabalhos comparam a utilização dos mesmos em situações específicas. Os argumentos para utilização de colóides ou cristalóides são diversos, destacando-se: 1) colóides são mais efetivos expansores plasmáticos que cristalóides; 2) colóides sintéticos são igualmente efetivos e seguros e mais baratos que albumina; 3) solução de HES apresenta o melhor perfil de risco benefício entre os colóides sintéticos; 4) a solução de HES130/0,4 é mais segura que os demais hidroxietilamidos com pesos moleculares mais elevados⁵⁸.

Schick et al., 2010⁵⁹, em modelo de sepse com ratos, os animais tratados com cristalóides apresentaram menor incidência de insuficiência renal, quando comparados aos tratados com colóides. Esses resultados suportam a interpretação de que cristalóides devem ser preferidos em casos de sepse em relação à LRA.

O uso preferencial de soluções coloidais para reanimação de pacientes que necessitam de reposição de volume intravascular é com base em raciocínios que não têm suporte em evidências clínicas. Não apenas dados de metanálises, mas inúmeros ensaios clínicos mostram que a

ressuscitação com colóides não é mais eficaz do que cristalóides principalmente em pacientes críticos. Efeitos dos colóides na expansão volêmica são transitórios e sem efeitos a longo prazo nos resultados clínicos

Estudos evidenciam que os efeitos adversos do HES são dose-dependentes e são mais pronunciados em pacientes com disfunção renal pré-existente⁴⁰.

O melhor fluido a ser utilizado se cristalóides ou colóides para expansão do volume intravascular ainda permanece controverso, sendo que efeitos renais de diferentes colóides ainda não foram totalmente elucidados⁴⁰. Portanto, como não existe consenso qual a composição ideal do fluido e a taxa ideal de infusão, essa conduta deve ser individualizada⁴⁰.

A NGAL é o biomarcador mais estudado na fase inicial da LRA. Sua concentração aumenta nas lesões tubulares e precede o aumento da creatinina sérica em mais de 24 horas⁶⁰. Quando comparado aos marcadores amplamente utilizados como troponina na isquemia miocárdica, que apresenta uma área sob a curva (AUC) na faixa de 0,7, o desempenho da NGAL é suficiente para sua aceitação clínica e inclusão para o diagnóstico precoce de LRA⁶¹.

A creatinina é uma substância endógena e a dosagem da sua concentração sanguínea é o marcador laboratorial mais utilizado na prática clínica para avaliar a filtração glomerular e conseqüentemente a função renal. Em pacientes com função renal normal, os níveis da creatinina sérica são praticamente constantes, com variação em torno de 8%⁶². Um aumento dos níveis plasmáticos de creatinina é observado quando ocorre lesão dos néfrons funcionantes, entretanto, para que este aumento dos níveis de creatinina pode demorar de 24-72 horas^{1,63}.

Segundo Carraretto, 2011⁶⁴, em estudo experimental, os ratos do grupo controle, que somente foram submetidos à nefrectomia direita, sem isquemia renal esquerda, sob anestesia com propofol ou isoflurano,

apresentaram alterações discretas e não significativas nos valores da creatinina plasmática, entre os vários momentos estudados nas 24 horas de observação do estudo. Embora os valores da creatinina apresentassem aumento nos ratos dos grupos submetidos a I/R com normoglicemia. Esse aumento não foi significativo estatisticamente, dados esses similares aos da literatura que consideram a creatinina um marcador tardio de LRA.

A utilização da creatinina plasmática, para avaliar o ritmo de filtração glomerular (RFG) e conseqüentemente a função renal tem suas limitações. A sua produção e liberação no sangue pode ser muito variável³¹ e, assim, a diminuição abrupta no RFG poderia demorar de 24-72 horas para ser mensurada por meio da elevação da creatinina sanguínea. Em situações onde o diagnóstico e tratamento precoce de isquemia renal são fatores determinantes de morbimortalidade e prognóstico, esse período é muito longo e a creatinina sérica tem sido sistematicamente questionada como marcador de função renal⁶³⁻⁶⁵.

Baseados em inúmeros estudos que evidenciam a elevação tardia da creatinina e como a segunda fase do experimento seria realizada após 12 horas do início do mesmo, a dosagem da creatinina plasmática não foi mensurada nesse estudo.

Nesse estudo experimental a elevação precoce da NGAL demonstrou uma forte correlação com a LRA pós-isquemia renal aguda, comprovada pela análise histológica, abrindo perspectivas para novos estudos.

Sendo assim, a utilização da pNGAL para identificação precoce dos pacientes de risco elevado pode permitir as intervenções terapêuticas na fase inicial da doença antes que lesões irreversíveis possam ocorrer, modificando a morbimortalidade da LRA.

Os valores dos escores dos exames histológicos (Tabela 7) mostraram que quando comparados os rins direitos dos três grupos não

houve diferença entre os escores ($p=0,37$). Quando comparado os rins esquerdos não diferiram estatisticamente dos grupos G1 e G2 e diferiram estatisticamente dos grupos G1 e G2 comparados ao grupo G3. Quando se comparou os rins direitos e esquerdos em cada grupo foi estatisticamente significativa nos grupos G1 e G2 ($p<0,01$) e não significativa no G3 ($p=1,00$). O grupo G1 (2[1;4]) apresentou escore de lesão moderada e G2 (3[3;4]) escore de lesão moderada a grave quanto à avaliação histológica do rim esquerdo .

A análise histológica das lâminas dos rins, utilizando os critérios proposto por Park et al., 2008⁴⁶, cujos escores variam de 1 a 5 para avaliação de lesão tubular (sendo 0 = nenhuma lesão e 5 = lesão muito intensa, com grau de necrose tubular $> 75\%$)⁴⁶ teve como resultado, a ausência de lesão tubular nos rins direitos dos ratos do três grupos (G1,G2 e G3). Essa avaliação histológica serviu como controle do rim contra lateral, garantindo com isso a fidedignidade do experimento.

Nesse estudo a análise histológica das lâminas dos rins esquerdos demonstrou que nos animais pertencentes ao grupo G3 (G Controle) que não sofreram I/R não apresentaram nenhuma alteração histológica que comprovasse lesão renal.

O escore de lesão histológica foi de grau 2 (lesões moderadas) dos rins esquerdos, ou seja, os que sofreram I/R nos animais dos grupos G1 hidratados com Ringer lactato. Esses resultados são semelhantes aos encontrados no grupo similar do estudo de Carraretto, 2011⁶⁴, onde os animais em condições de normoglicemia foram submetidos à anestesia com isoflurano e hidratados com Ringer lactato.

Os animais do grupo G2 hidratados com HES (Voluven[®]) apresentaram escore de lesão histológica grau 3 (lesões moderadas a grave) dos rins esquerdos, ou seja, os que sofreram I/R. Apesar da diferença dos

escores de lesão entre os grupos 1 e 2 essa diferença não foi estatisticamente significativa.

A ausência de lesão histológica nos rins esquerdos do grupo 3(G Controle) e a presença de lesões nos grupos G1 e G2 que sofreram I/R garantem que o fator promotor da lesão foi, de fato, o clampeamento arterial e que a mesma teve como consequências a elevação da NGAL plasmática e os graus variáveis de necrose tubular.

A lesão renal associada à isquemia/reperfusão é resultado de um processo que envolve a vasculatura e os túbulos renais. As alterações da vasculatura alterarão o suprimento de oxigênio e nutrientes às células epiteliais e essas células lesadas responderão com produção de fatores autócrinos, que afetarão sua própria sobrevivência, e fatores parácrinos que afetarão a vasculatura. Há ativação da cascata de sinalização, resultando em alterações hemodinâmicas, leucocitose e lesão direta das células epiteliais tubulares, seguida por um processo de reparação que tem como finalidade a restauração da morfologia e da função celular⁶⁶.

Um estudo de Schick et al., 2010⁵⁹, sobre o impacto das soluções de hidratação sobre os rins de ratos em modelo de sepse mostrou mais morte celular nas células tubulares dos ratos do grupo HES em comparação com os dos grupos cristalóides e controle. Comparando-se os resultados histológicos com os parâmetros funcionais, apenas mostrou um aumento significativo da NGAL plasmática em animais tratados com HES.

Outro estudo recente investigou os efeitos da gelatina e HES 130/0,4 em modelo de sepse, em ratos, e encontrou efeitos semelhantes com ambos os colóides sintéticos sobre a função e histologia renal em comparação com cristalóides (RL). Os animais dos grupos que usaram colóides apresentaram níveis mais elevados de NGAL e grau de lesão histológica renal significativamente maior que os do grupo cristalóide⁵⁸.

No nosso estudo de modelo experimental em condições de I/R, encontramos resultado similar e apesar da mediana da lesão histológica do grupo 2 (G2) hidratados com HES) - (3[3,4]) ter sido maior que do grupo 1 (G1) hidratados com Ringer lactato - (2[1,4]) essa diferença não foi significativa.

No grupo 1 - G1 (2[1,4]) e 2 - G2 (3[3,4]) onde os escores de lesão histológica renal apresentaram medianas elevadas, houve correspondência com valores elevados de pNGAL, comprovando-a como marcador precoce de LRA e correlacionando esses valores com o grau de lesão histológica

Portanto, esse estudo com animais demonstrou que a LRA poderá ser prevenida e/ou tratada desde que precocemente diagnosticada através de novos biomarcadores como, por exemplo, NGAL, antes mesmo que ocorra o aumento da creatinina sérica, marcador usualmente utilizado para fazer seu diagnóstico.

6 Considerações Finais

No modelo experimental estudado os seguintes resultados foram observados:

- 1 Ausência de alteração histológica dos rins direitos que não sofreram I/R nos três grupos estudados.
- 2 Alterações histológicas moderadas dos rins esquerdos ou seja os que sofreram I/R nos animais do grupo G1 hidratados com Ringer lactato.
- 3 Alterações histológicas de moderadas a graves dos rins esquerdos, ou seja, os que sofreram I/R nos animais do grupo G2 hidratados com hidroxietilamido (Voluven[®]).
- 4 Ausência de alteração histológica dos rins esquerdos, ou seja, os que não sofreram I/R do grupo G3 ,grupo Controle hidratados com Ringer lactato.

Os valores da NGAL plasmática foram compatíveis com os escores de lesão das análises histológicas.

Nos animais submetidos à isquemia renal apesar da mediana de graus de lesões histológicas ter sido maior no grupo hidratado com Ringer lactato a diferença não foi estatisticamente significativa.

A validação de um biomarcador capaz de diagnosticar precocemente a lesão tecidual renal poderá ser o fator primordial que mudará a morbimortalidade da LRA. A lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos, lipocalina 2 ou siderocalina, mostrou-se um marcador com sensibilidade proporcional ao grau de lesão.

7 Conclusão

Em ratos submetidos à anestesia geral balanceada houve aumento precoce da NGAL plasmática em condições de isquemia renal, independente da solução de hidratação utilizada (Ringer lactato ou hidroxietilamido).

O aumento da NGAL plasmática se correlacionou com graus variáveis de lesão renal nos grupos 1 e 2 e ausência de lesão no grupo 3 alterações essas comprovadas pela avaliação histológica.

8 Referências

1. Nguyen MT, Devarajan P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Pediatr Nephrol* 2008; 23:2152-57.
2. Chang CH, Lin CY, Tian YC, Chyi C, Chang JMY , Chen YC, Fang JT , Yang CW. Acute kidney injury classification: comparison of AKIN and RIFLE criteria. *Shock* 2010; 33(3): 247-52.
3. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsk P and the ADQI workgroup. Acute renal failure-definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Critical Care* 2004; 8:204-12.
4. Azevedo VLF, Silveira MAS, Santos JN, Braz JRC , Braz LG, Modolo NSP. Postoperative Renal Function Evaluation, through RIFLE Criteria, of Elderly Patients Who Underwent Femur Fracture Surgery under Spinal Anesthesia. *Renal Failure* 2008;30: 485-90.
5. Heung M, Swartz R. Acute Renal Failure –Progress and Remaining Challenges .*US Renal Disease* 2007;74-6.
6. Di Grande A, Giuffrida C, Carpinteri G, Narbone G, Pirrone G, Di Mauro A, Calandra S, Noto P, Le Moli C, Alongi B, Nigro F. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel biomarker for the early diagnosis of acute kidney injury in the emergency department. *Eur Rev Med Pharmacol Sc* 2009;13(3):197-200.
7. Mak RH. Acute kidney injury in children: the dawn of a new era. *Pediatr Nephrol* 2008; 23:2147-49.
8. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, Ruff SM, Zahedi K, Shao M, Bean J, Mori K, Barasch J, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* 2005; 365: 1231-38.
9. Bagshaw SM , Bellomo R, Devarajan P, Johnson C, Karvellas CJ, D Kutsiogiannis DJ, Mehta R, Pannu N, Romanovsky A, Sheinfeld G, Taylor S, Zappitelli M, Gibney RTN. Review article: Acute kidney injury in critical illness. *Can J Anesth* 2010; 57: 985-98.

10. Coca SG, Yalavarthy R, Concato J, Parikh CR. Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: A systematic review. *Kidney Int* 2008; 73: 1008-16.
11. Haase M, Bellomo R, Haase-Fielitz A. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *Curr Opin Crit Care* 2010; 16: 526-32.
12. Cruz DN, Cal M, Garzotto F, Perazella MA, Lentini P, Corradi V, Piccinni P, Ronco C. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early biomarker for acute kidney injury in an adult ICU population. *Intensive Care Med* 2010; 36:444–51.
13. Haase M, Bellomo R, Haase-Fielitz A, Mertens PR. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of acute renal disease. *Curr Opin Hematol* 2011; 18: 11–18.
14. Cruz D, Ronco C, Katz N. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: A promising biomarker for detecting cardiac surgery-associated acute kidney injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010; 139: 1101-6.
15. Nickolas TL, O'Rourke MJ, Yang J, Sise ME, Canetta PA, Barasch N, Buchen C, Khan F, Mori K, Giglio J, Devarajan P. Sensitivity and Specificity of a Single Emergency Department Measurement of Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin for Diagnosing Acute Kidney Injury. *Ann Intern Med* 2008; 148:810-19.
16. Ronco C. N-GAL: Diagnosing AKI as soon as possible. *Critical Care* 2007; 11:173.
17. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A; NGAL Meta-analysis Investigator Group. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2009; 54(6):1012-24.
18. 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.
19. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of kidney disease. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2008; 241:89-94.
20. Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, Akira S, Aderem A. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 2004; 432:917-21.

21. Berger T, Togawa A, Duncan GS, Elia AJ, You-Ten A, Wakeham A, Fong HEH, Cheung CC, Mak TW. Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to Escherichia coli infection but not to ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(6): 1834-9.
22. Mori K, Lee HT, Rapoport D, Drexler IR, Foster K, Yang J, Schmidt-Ott KM, Chen X, Li JY, Weiss S, Mishra J, Cheema FH, Markowitz G, Suganami T, Sawai K, Mukoyama M, Kunis C, D'Agati V, Devarajan P, Barasch J. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest* 2005; 115:610-21.
23. Paller MS, Hedlund BE. Role of iron in postischemic renal injury in the rat. *Kidney Int* 1988; 34:474-80.
24. Mori K, Nakao K. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney Int* 2007;71:967-70.
25. Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Barasch J, Devarajan P. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2534-43.
26. Wagener G, Jan M, Kim M, Mori K, Barasch JM, Sladen RN, Lee HT. Association between increases in urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery. *Anesthesiology* 2006; 105:485-91.
27. Ricci Z, Cruz D, Ronco C. The RIFLE criteria and mortality in acute kidney injury: A systematic review. *Kidney Int* 2008; 73: 538–46.
28. Kjeldsen L, Cowland JB, Borregaard N. Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1482:272-83.
29. Haase-Fielitz A, Bellomo R, Devarajan P, Story D, Matalanis G, Dragun D, Haase M. Novel and conventional serum biomarkers predicting acute kidney injury in adult cardiac surgery: a prospective cohort study. *Crit Care Med* 2009; 37: 553-60.
30. Haase-Fielitz A, Bellomo R, Devarajan P, Bennett M, Story D, Matalanis G, Frei U, Dragun D, Haase M. The predictive performance of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) increases with grade of acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 3349-54.

31. Bagshaw SM, George C, Bellomo R. ANZICS DATABASE MANAGEMENT COMMITTEE. A comparison of the RIFLE criteria and AKIN criteria for acute kidney injury in critically ill patients. *Nephron Dial Transplant* 2008; 23: 1569-74.
32. Shapiro NI, Trzeciak S, Hollander JE, Birkhahn R, Otero R, Osborn TM, Moretti E, Nguyen HB, Gunnerson K, Milzman D, Gaieski DF, Goyal M, Cairns CB, Kupfer K, Lee SW, Rivers EP. The diagnostic accuracy of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin in the prediction of acute kidney injury in emergency department patients with suspected sepsis. *Ann Emerg Med* 2010; 56: 52-9.
33. Martensson J, Bell M, Oldner A, Xu S, Venge P, Martling CR. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in adult septic patients with and without acute kidney injury. *Intensive Care Med* 2010; 36: 1333-40.
34. Finn WF. The clinical and renal consequences of contrast-induced nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: i2-i10.
35. Ling W, Zhaohui N, Ben H, Leyi G, Jianping L, Huili D, Jiaqi Q. Urinary IL-18 and NGAL as early predictive biomarkers in contrast-induced nephropathy after coronary angiography. *Nephron Clin Pract* 2008; 108: 176-81.
36. Chen M, Wang F, Zhao MH. Circulating neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a useful biomarker for assessing disease activity of ANCA-associated vasculitis. *Rheumatology* 2009; 48: 355-58.
37. Ohlsson S, Wieslander J, Segelmark M. Increased circulating levels of proteinase 3 in patients with antineutrophilic cytoplasmic autoantibodies-associated systemic vasculitis in remission. *Clin Exp Immunol* 2003; 131: 528-35.
38. Brunner HI, Mueller M, Rutherford C, Passo MH, Witte D, Grom A, Mishra J, Devarajan P. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of nephritis in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2577-84.
39. Hinze CH, Suzuki M, Klein-Gitelman M, Passo MH, Olson J, Singer NG, Haines KA, Onel K, O'Neil K, Silverman ED, Tucker L, Ying J, Devarajan P, Brunner HI. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a predictor of the course of global and renal childhood-onset systemic lupus erythematosus disease activity. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 2772-81.
40. Webb ST, Allen SD. Perioperative renal protection. *Anaesthesia, Critical Care & Pain* 2008 ; 8(5):176-80.

41. Santry HP; Alam HB. Fluid resuscitation: past, present, and the future. *SHOCK* 2010; 33 (3):229-41.
42. Liang L; Xu G; Zhang Y; Chen W; Li J; Liang T. Resuscitation With Hydroxyethyl Starch Solution Prevents Bone Marrow Mononuclear Apoptosis in a Rat Trauma-Hemorrhagic Shock Mode. *The Journal of TRAUMA® Injury, Infection and Critical Care* 2010;68 (3):655-61.
43. Lee HT, Setlik AO, Fu Y, Nasr SH, Emala CW. Differential Protective Effects of Volatile Anesthetics Against Renal Ischemia-Reperfusion Injury In Vivo .*Anesthesiology* 2004; 101:1313-24.
44. Panzer O, Moitra V, Sladen RN. Pharmacology of sedative-analgesic agents:dexmedetomidine,remifentanil,ketamine,volatile anesthetics,and the role of peripheral um antagonists.*Crit Care Clin* 2009;25:451-69.
45. Devlin JW, Roberts RJ. Pharmacology of commonly used analgesics and sedatives in the ICU:benzodiazepines, propofil and opioids. *Crit Care Clin* 2009; 25:431-49.
46. Park Y, Hirose R, Dang K, Xu F, Behrends M, Tan V, Roberts JP, Niemann CU. Increased severity of renal ischemia-reperfusion injury with venous clamping compared to arterial clamping in a rat model. *Surgery* 2008 ; 143(2):243-51.
47. Universidade de São Paulo. Morte cerebral e necrose. Disciplina de Patologia Geral do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Available from: www.fo.usp.br/lido/patoartegeral/patoartenec.htm.
48. Módolo NSP, Castiglia YMM , Ganem EM, Braz JRC, Vianna PTG, Vane LA. Acute renal ischemia model in dog: effects of metoprolol .*Renal Failure* 2001; 23(1):1-10.
49. Fujii T, Takaoka M, Tsuruoka N, Kiso Y, Tanaka T, Matsumura Y. Dietary supplementation of L-carnosine prevents ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *Biol Pharm Bull* 2005; 28(2):361-3.
50. Delbridge MS, Shrestha BM, Raftery AT, El Nahas AM, Haylor JL. The effect of body temperature in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 2007; 39(10):2983-5.
51. Zager RA, Altschuld R. Body temperature: an important determinant of severity of ischemic renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 1986; 251:87- 93.

52. Ricci Z, Ronco C. Year in review 2009: Critical Care – Nephrology *Critical Care* 2010; 14:241-46.
53. Moriates C, Maisel A. The Utility of Biomarkers in Sorting Out the Complex Patient. *The American Journal of Medicine* 2010; 123: 393-9.
54. Matthaeus T, Schulze-Lohoff E, Ichimura T, Weber M, Andreucci M, Park KM, Alessandrini A, Bonventre JV . Co-regulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin and matrix metalloproteinase-9 in the postischemic rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:787.
55. Amin RP, Vickers AE, Sistare F, Thompson KL, Roman RJ, Lawton M, Kramer J, Hamadeh HK, Collins J, Grissom S, Bennett L, Tucker CJ, Wild S, Kind C, Oreffo V, Davis JW 2nd, Curtiss S, Naciff JM, Cunningham M, Tennant R, Stevens J, Car B, Bertram TA, Afshari CA .Identification of putative gene based markers of renal toxicity. *Environ Health Perspect* 2004; 112:465-79.
56. Wang EJ, Snyder RD, Fielden MR, Smith RJ, Gu YZ . Validation of putative genomic biomarkers of nephrotoxicity in rats. *Toxicology* 2008; 246:91-100.
57. Rached E, Hoffmann D, Blumbach K, Weber K, Dekant W, Mally A . Evaluation of putative biomarkers of nephrotoxicity after exposure to ochratoxin A in vivo and in vitro. *Toxicol Sci* 2008; 103:371-81.
58. Hartog CS, Bauer M, Reinhart K. The Efficacy and Safety of Colloid Resuscitation in the Critically Ill. *Anesth Analg* 2011; 112(1):156-64.
59. Schick MA, Isbary TJ, Schlegel N, Brugger J, Waschke J, Muellenbach R, Roewer N, Wunder C. The impact of crystalloid and colloid infusion on the kidney in rodent sepsis. *Intensive Care Med* 2010; 36:541-8.
60. Schmidt-Ott KM, Mori K, Kalandadze A, Li JY, Paragas N, Nicholas T, Devarajan P, Barasch J. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin-mediated iron traffic in kidney epithelia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006; 15:442–9.
61. Moore E, Bellomo R. Novel biomarkers of acute kidney injury: ready for clinical application?. *Current Opinion in Critical Care* 2010, 16:523-5.
62. Traynor J, Mactier R, Geddes CC, Fox JG. How to measure renal function in clinical practice. *Bmj* 2006 ; 333(7571):733-7.
63. McIlroy DR, Wagener G, Lee HT. Biomarkers of Acute Kidney Injury. *Anesthesiology* 2010; 112:998-1004.

64. Carraretto AR. Estudo da proteção renal com o propofol e o isoflurano durante a isquemia e a reperfusão, com hiperglicemia transitória. Botucatu, 2011. 75p. Tese (Doutorado em Anestesiologia) – Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
65. Moran SM, Myers BD. Course of acute renal failure studied by a model of creatinine kinetics. *Kidney Int* 1985; 27(6):928-37.
66. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2003 ; 14(8):2199-210.

Apêndice

Tabela 8 - Resultados dos exames histológicos dos rins D e E dos grupos G1, G2 e G3

GRUPOS														
GRUPO 1				GRUPO 2				GRUPO 3						
RATO	DIREITO	G	ESQUERDO	G	RATO	DIREITO	G	ESQUERDO	G	RATO	DIREITO	G	ESQUERDO	G
1	1391	0	1389	1	11	1361	0	1334	4	1	1482	0	1483	0
2	1375	0	1369	1	12	1387	0	1390	1	2	1484	0	1485	0
3	1359	0	1327	1	13	1360	0	1388	2	3	1486	0	1487	0
4	1355	0	1357	4	14	1372	0	1377	3	4	1488	0	1489	0
5	1374	0	1381	5	15	1324	0	1352	3	5	1490	0	1491	0
6	1370	0	1315	2	16	1343	0	1373	3	6	1492	0	1493	0
7	1340	0	1382	4	17	1326	0	1344	3	7	1494	0	1495	0
8	1335	0	1350	2	18	1319	0	1371	5	8	1496	0	1497	0
9	1358	0	1364	4	19	1366	0	1365	4	9	1498	0	1499	0
10	1341	0	1338	3	20	1380	0	1320	4	10	1500	0	1501	0

Tabela 9 – Peso (gr), pressão arterial sistólica, PAS (mmHg), pressão arterial diastólica, PAD (mmHg), pressão arterial média, PAM (mmHg), temperatura (T), pressão expirada de CO₂ (ETCO₂) e valores plasmáticos da lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos, NGAL (ng/ml) dos animais estudados nos diferentes momentos

Rato	M	Peso	PAS	PAD	PAM	T	ETCO ₂	NGAL
1	M0	480	138	109	120	35,6	20	4,07
	M1		142	105	121	35,8	23	2,98
	M2		105	85	110	36,8	21	5,69
	M3		152	112	129	37,3	25	385,69
2	M0	500	100	81	93	35,5	25	0
	M1		127	102	111	37,2	28	0,67
	M2		125	96	111	36,2	29	1,83
	M3		121	89	105	36,5	37	297,14
3	M0	460	123	99	109	37,2	23	0,39
	M1		136	109	121	37,8	23	0
	M2		137	110	119	36,7	21	0
	M3		138	113	121	37,2	23	0
4	M0	490	106	80	94	37,9	30	0
	M1		112	84	99	38,1	25	3,18
	M2		115	84	100	37,7	26	3,13
	M3		119	7	104	36,6	20	400
5	M0	500	120	86	104	37,9	36	0,07
	M1		108	74	95	38,3	21	0,86
	M2		107	72	87	37	36	2,78
	M3		93	54	71	37,2	27	400
6	M0	450	124	99	117	36,7	22	6,45
	M1		90	50	65	36,8	21	12,23
	M2		128	95	111	38,1	24	15,48
	M3		120	84	101	38,3	22	400
7	M0	450	140	128	137	37,6	26	2,11
	M1		150	119	134	36,9	26	5,51
	M2		105	68	82	37,2	21	3,03
	M3		104	77	90	37,5	21	400
8	M0	440	139	105	122	36,7	25	7,53
	M1		132	98	113	36,1	23	12,09
	M2		126	93	111	36,5	20	16,73
	M3		131	96	113	37,1	22	400
9	M0	500	145	108	123	37,0	26	3,34
	M1		132	102	116	37,0	27	5,4
	M2		96	70	84	37,5	24	9,1
	M3		96	62	75	37,9	24	400
10	M0	500	135	119	127	37,3	29	2,3
	M1		116	83	96	36,9	27	10,27
	M2		126	94	107	37,8	24	4,95
	M3		129	97	109	37,2	25	400

continua

continuação

Rato	M	Peso	PAS	PAD	PAM	T	ETCO ₂	NGAL
11	M0	380	146	103	122	37,1	19	3,8
	M1		155	104	124	36,9	20	0,33
	M2		99	72	85	37,8	21	4,72
	M3		119	87	103	37,2	26	400
12	M0	460	96	74	87	35	17	0
	M1		76	36	56	32	15	1,79
	M2		112	77	96	35,2	16	0
	M3		100	66	84	36,2	16	0,75
13	M0	450	98	76	83	36,8	23	10,14
	M1		88	68	69	36	23	6,68
	M2		108	76	97	37	23	6,92
	M3		122	92	112	36	20	400
14	M0	400	111	86	98	36	14	50,44
	M1		118	84	99	36	21	5,46
	M2		127	89	108	37	22	27,62
	M3		113	75	91	38,5	25	400
15	M0	360	137	110	118	36,0	17	15,85
	M1		124	100	103	36,3	19	29,93
	M2		136	105	121	37,6	20	13,62
	M3		131	97	114	36,5	25	400
16	M0	430	143	107	129	37,0	29	3,08
	M1		112	99	101	37,0	27	5,51
	M2		100	62	79	37,6	27	7,97
	M3		106	69	86	37,2	27	305,81
17	M0	410	149	109	27	35,3	24	5,98
	M1		120	87	102	37,3	24	13,76
	M2		122	91	108	38,3	24	9,42
	M3		124	87	107	37,8	20	400
18	M0	500	141	99	103	36	30	3,8
	M1		114	86	99	36,3	29	9,1
	M2		104	78	90	38,7	17	10,34
	M3		110	84	88	37,2	28	400
19	M0	500	114	96	104	36	20	6,45
	M1		126	99	113	36	22	13,83
	M2		114	82	97	39	26	14,69
	M3		105	74	90	37	22	400
20	M0	500	99	71	84	35,8	34	22,28
	M1		102	69	83	36,8	34	22,2
	M2		100	53	69	37,5	34	20,62
	M3		101	65	85	37	34	400
21	M0	420	121	92	107	37,9	32	15,21
	M1		98	63	77	37,3	31	7,36
	M2		127	99	113	36,8	29	15,26
	M3		128	92	111	37,6	31	120,13

continua

conclusão

Rato	M	Peso	PAS	PAD	PAM	T	ETCO ₂	NGAL
22	M0	380	102	75	90	37	36	14,36
	M1		101	61	77	37,9	35	10,17
	M2		96	48	64	37,4	34	5,56
	M3		115	86	101	37,8	35	20,47
23	M0	450	106	71	87	37,6	26	10,85
	M1		121	84	103	37,6	28	21,6
	M2		108	64	83	38,8	29	9,52
	M3		115	75	92	37,9	30	1,87
24	M0	430	109	70	69	38,1	36	10,13
	M1		90	59	72	37,8	35	10,64
	M2		97	53	67	37,8	32	6,88
	M3		96	47	62	37,2	34	193,55
25	M0	440	124	96	112	37,7	29	9,38
	M1		100	65	78	37,5	28	10,13
	M2		114	78	93	38,1	26	7,84
	M3		103	55	74	37,8	28	134,43
26	M0	460	116	86	100	35,8	25	14,1
	M1		108	79	95	37	29	13,93
	M2		115	71	89	38,2	8	12,78
	M3		104	71	89	38	27	245,81
27	M0	460	123	97	110	35,6	26	16,11
	M1		123	96	108	36,8	25	10,85
	M2		110	64	81	36,3	29	10,98
	M3		112	60	76	39	28	30,61
28	M0	450	138	107	122	37,1	28	12,52
	M1		110	80	94	38	28	10,26
	M2		120	79	98	38,4	26	8,2
	M3		122	81	100	37,3	27	153,14
29	M0	440	131	96	113	37,8	35	6,64
	M1		112	76	92	37,1	34	2,31
	M2		113	78	92	38,1	32	2,22
	M3		115	71	89	38	29	2,93
30	M0	420	115	84	100	37,1	29	5,8
	M1		98	58	73	38,1	28	2,04
	M2		96	57	70	38,1	28	9,88
	M3		102	51	71	38,2	27	28,64

ANEXO 1 - Protocolo da coleta de dados do experimento

Grupo 1 – ISO + RL

Grupo 2 – ISO + COLOIDE

MODELO DE COLETA

Data _____ Rato n.º _____ Grupo _____ Peso _____

- 1 Indução inalatória –iso 4%
- 2 Cateterização jugular/carótida/temperatura retal
- 3 Monitorização

PAS	PAD	PAM	T	ETCO2	FC

4 M0 - Estabilização

- 5 Dados da monitorização

PAS	PAD	PAM	T	ETCO2	FC

6 M1 = 1ª COLETA

- 7 14-Infiltração bupivacaina 0,125% 2 mg/kg
- 8 Nefrectomia direita
- 9 Clampeamento por 30 minutos

10 Dados monitorização

PAS	PAD	PAM	T	ETCO2	FC

11 **M2 = 30 minutos após o clampeamento**

12 Desclampeamento por 30 minutos

13 Dados monitorização

PAS	PAD	PAM	T	ETCO2	FC

14 **M3 = 30 minutos após desclampeamento (30 minutos de reperfusão)**

15 Acordar o rato

16 Após 12 horas

17 **M4= Última coleta**

18 Diurese