

Claudio Mueller Kakuda

**Efeitos da dexmedetomidina sobre a lesão de isquemia
e reperfusão renal em ratos: avaliação pela NGAL,
histologia e interleucinas**

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

Profa. Titular Norma Sueli Pinheiro Módolo

Orientadora

Botucatu-SP

2013

*À minha esposa Aline Cruz Kakuda, fonte de felicidade imensurável,
por estar ao meu lado em todas as fases da minha caminhada.*

*Aos meus pais Roberto e Yvonne, com amor e dedicação me
ajudaram a superar obstáculos e possibilitaram a realização dos meus
sonhos.*

À professora titular Norma Sueli Pinheiro Módolo, que ao longo de toda minha formação me enriqueceu com seus conhecimentos e palavras de incentivo e amizade.

Aos Docentes do Departamento de Anestesiologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, por todos os ensinamentos.

À Sônia Maria Martins e Silva, Neli Aparecida Pavan e Joana Jacirene Costa Teixeira, funcionárias da secretaria do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, pelo apoio e dedicação.

Ao Cristiano Correa de Oliveira, funcionário do Laboratório Experimental do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, pela valiosa ajuda na realização do experimento.

"A tarefa não é tanto ver o que ninguém viu, mas
pensar o que ninguém pensou daquilo que todo
mundo vê."

Arthur Schopenhauer

Lista de Figuras

Figura 1	Critérios de RIFLE.....	14
Figura 2	Resposta inflamatória na lesão isquêmica.....	18
Figura 3	Reparo da lesão renal isquêmica aguda.....	20
Figura 4	Sistema de Indução anestésica inalatória.....	32
Figura 5	Manutenção da ventilação espontânea sob máscara facial.....	33
Figura 6	Clampeamento da artéria renal esquerda.....	34
Figura 7	Coleta de sangue intracardíaco.....	35
Figura 8	Momentos estudados.....	36
Figura 9	Peso dos animais (g) por grupos.....	39
Figura 10	Pressão arterial sistólica (mmHg) por grupos e momentos.....	40
Figura 11	Pressão arterial diastólica por grupos e momentos.....	41
Figura 12	Pressão arterial média por grupos e momentos	42
Figura 13	Temperatura (°C) segundo grupos e momentos.....	43
Figura 14	Frequência cardíaca (bpm) segundo grupos e momentos.....	44
Figura 15	Lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos (NGAL) (ng/mL) segundo grupos e momentos.....	45
Figura 16	Interleucina 1 α (IL-1 α) (pg/mL) segundo grupos e momentos.....	46
Figura 17	Interleucina 1 β (IL-1 β) segundo grupos e momentos.....	47
Figura 18	Interleucina 6 (IL-6) segundo grupos e momentos.....	48
Figura 19	Interleucina 10 (IL-10) segundo grupos e momentos.....	49
Figura 20	Fator de necrose tumoral α (TNF- α) segundo grupos e momentos...	50

Lista de Tabelas

Tabela 1	Cálculo da dose de dexmedetomidina.....	31
Tabela 2	Grau e gravidade de lesão quanto a necrose tubular avaliado pela histologia renal.....	37
Tabela 3	Valores de mediana e percentis (25-75%) referente ao peso (g) segundo o grupo.....	39
Tabela 4	Valores de mediana e percentis (25-75%) da pressão arterial sistólica (PAS) (mmHg) segundo grupos e momentos.....	40
Tabela 5	Valores de mediana e percentis (25-75%) de pressão arterial diastólica (PAD) (mmHg) segundo grupos e momentos.....	41
Tabela 6	Valores de mediana e percentis (25-75%) de pressão arterial média (PAM) (mmHg) segundo grupos e momentos.....	42
Tabela 7	Valores de mediana e percentis (25-75%) da temperatura (T) (°C), segundo grupos e momentos.....	43
Tabela 8	Valores de mediana e percentis da frequência cardíaca (FC) (bpm) segundo grupos e momentos.....	44
Tabela 9	Valores de mediana e percentis de lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos (NGAL) (ng/mL) segundo grupos e momentos.....	45
Tabela 10	Valores de mediana e percentis de interleucina 1 α (IL-1 α) (pg/mL) segundo grupos e momentos.....	46
Tabela 11	Valores de mediana e percentis (25-75%) de interleucina 1 β (IL-1 β) (pg/mL) segundo grupos e momentos.....	47
Tabela 12	Valores de mediana e percentis (25-75%) de interleucina 6 (IL-6) (pg/mL) segundo grupos e momentos.....	48
Tabela 13	Valores de mediana e percentis (25-75%) de interleucina 10 (IL-10) (pg/mL) segundo grupos e momentos.....	49
Tabela 14	Valores de mediana e percentis (25-75%) de fator de necrose tumoral α (TNF- α) (pg/mL) segundo grupos e momentos.....	50
Tabela 15	Histologia renal segundo escore de necrose tubular segundo Park et al. Segundo grupos.....	51

1 INTRODUÇÃO E LITERATURA.....	13
1.1 Lesão renal aguda.....	13
1.2 Isquemia e reperfusão.....	15
1.3 Inflamação.....	17
1.4 Interleucinas.....	20
1.5 Biomarcadores de lesão renal.....	21
1.6 Dexmedetomidina.....	24
2 HIPÓTESE DO ESTUDO.....	27
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 Primário.....	28
3.2 Secundário.....	28
4 MATERIAL E MÉTODO.....	29
4.1 Grupos experimentais.....	29
4.2 Cálculo da dose da dexmedetomidina.....	30
4.3 Atributos estudados.....	31
4.4 Momentos estudados.....	31
4.5 Sequência experimental.....	32
4.6 Avaliação histológica.....	37
4.7 Dosagens de NGAL e interleucinas.....	38
4.8 Análise estatística.....	38
5 RESULTADOS.....	39
5.1 Peso.....	39
5.2 Pressão arterial sistólica.....	40
5.3 Pressão arterial diastólica.....	41
5.4 Pressão arterial média.....	42
5.5 Temperatura.....	43
5.6 Frequência cardíaca.....	44
5.7 NGAL.....	45
5.8 Interleucina 1 α (IL-1 α).....	46
5.9 Interleucina 1 β (IL-1 β).....	47
5.10 Interleucina 6 (IL-6).....	48
5.11 Interleucina 10 (IL-10).....	49
5.12 Fator de necrose tumoral α (TNF- α).....	50
5.13 Histologia renal.....	51
6 DISCUSSÃO.....	52
7 CONCLUSÃO.....	59
8 REFERÊNCIAS.....	60
ANEXOS.....	66

Kakuda CM. Efeitos da dexmedetomidina sobre a lesão de isquemia e reperfusão renal em ratos: avaliação pela NGAL, histologia e interleucinas. Botucatu, 2013. 67p. Tese (Doutorado em Anestesiologia), Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

RESUMO

Justificativa e Objetivo: A lesão renal aguda isquêmica é fenômeno comum no período perioperatório e em doentes críticos internados em unidades de terapia intensiva. O restabelecimento do fluxo sanguíneo pode piorar a lesão pelo mecanismo de isquemia e reperfusão (I/R). O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do uso da dexmedetomidina no rim de ratos, em modelo experimental de I/R. **Método:** Foram selecionados 34 ratos Wistar e alocados em quatro grupos aleatórios. Grupo Controle – C (nefrectomia direita, infusão de salina e manobras de I/R, n=10), Grupo Dexmedetomidina – D (nefrectomia direita, infusão de dexmedetomidina e manobras de I/R, n=8), Grupo Sham – S (nefrectomia direita e infusão de salina, n=8), Grupo Sham com dexmedetomidina – SD (nefrectomia direita e infusão de dexmedetomidina, n=8). Os animais foram anestesiados com isoflurano. Avaliou-se peso, frequência cardíaca (FC), pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM), temperatura intraoperatória (T) nos momentos M0 (monitorização inicial), M1 (após estabilização), M2 (após isquemia), M3 (após reperfusão); dosagem plasmática de NGAL em M1, M2, M3 e M4 (12 horas após o início do experimento) e dosagem plasmática de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α nos momentos M1 e M4. Os rins direito e esquerdo foram analisados histologicamente. **Resultados:** Os grupos foram uniformes quanto ao peso. A temperatura do grupo SD em M0 foi inferior a M1 e M2, sem diferenças nos demais grupos. A FC do grupo S foi maior que do grupo D em M2 e M3, sem diferenças nos demais grupos e momentos. A análise da PAS, PAD e PAM mostrou redução nos momentos M2 e M3 nos grupos D e SD. Na análise de NGAL os valores foram estatisticamente superiores em M3 nos grupos C e D em relação a S e SD e M3 foi superior aos valores de M1 em todos os grupos. Na análise de IL-1 α , IL-6 e IL-10 os valores em M1 do grupo SD foi superior ao grupo D e não houve diferenças entre os grupos em M4. Não houve diferenças de dosagens de IL-1 β e em M4, o nível de TNF- α de SD foi maior que do grupo C. Histologicamente, os grupos C e D tiveram lesão celular nos rins esquerdos, mas sem diferenças entre eles, e não houve lesão nos rins esquerdos dos grupos S e SD e não houve lesão em nenhum rim direito. **Conclusão:** a administração de dexmedetomidina acarreta queda nos níveis pressóricos e redução da FC. A dosagem da NGAL não evidenciou proteção ou lesão

renal. Não houve diferenças de inflamação durante a lesão, observado pela dosagem de interleucinas. A análise histológica para necrose tubular aguda demonstrou que o uso da droga não protegeu os rins da lesão de isquemia e reperfusão.

Palavras-chave: Isquemia, Reperfusão, NGAL, Interleucinas, Histologia, Rato

Kakuda CM. Effects of dexmedetomidine on ischemia-reperfusion injury in rats: assessment by NGAL, histology and interleukins. Botucatu, 2013. 67p. Thesis (PhD degree in Anesthesiology), Botucatu Medical School, São Paulo State University - UNESP.

ABSTRACT

Background and Objectives. Acute kidney injury (AKI) is a common phenomenon in perioperative period and critically ill patients admitted to intensive care units. The restoration of blood flow may worsen injury by a mechanism of ischemia and reperfusion (I/R). The aim of this study was to evaluate the role of dexmedetomidine in an experimental model of renal I/R in rats. **Method.** 34 Wistar rats were selected and randomly divided into 4 different groups. Control group – C (right nephrectomy, saline solution infusion and left renal I/R, n=10), Dexmedetomidine group – D (right nephrectomy, dexmedetomidine infusion and left renal I/R, n=8), Sham group – S (nephrectomy and saline infusion, n=8), Sham with dexmedetomidine – SD (right nephrectomy and dexmedetomidine infusion, n=8). The rats were anesthetized by isoflurane. The following criteria were studied: weight (W), heart rate (HR), systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) and mean arterial pressure (MAP), intraoperative temperature (T) at M0 (initial monitorization), M1 (after initial stabilization), M2 (after ischemia) and M3 moment (after reperfusion); NGAL plasma level at M1, M2, M3 and M4 (12 hours after the procedure) and plasma level of IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α at M1 and M4 moments. Histological analysis was performed in all kidneys. **Results.** The groups had no weight differences. SD temperature at M1 was lower than M1 and M2 and there were no differences between other groups and moments. S group HR was higher than D group at M2 and M3 with no differences in other groups and moments. There was a reduction of SBP, DBP and MAP at M2 and M3 in D and SD groups. NGAL analysis showed higher levels at M3 in C and D groups than S and SD and levels at M3 were higher than at M1 in all groups. The levels of IL-1 α , IL-6 and IL-10 at M1 in SD group were higher than in group D and there were no differences between groups in M4. There were no differences in plasma levels of IL-1 β and at M4, the plasma level of TNF- α in SD group was higher than in C group. Histological analysis showed injury in left kidney of C and D groups with no statistical differences between them and there was no injury in left kidney in S and SD group. There was no injury in any right kidney. Conclusion: Dexmedetomidine infusion leads to reduction in blood pressure and HR. NGAL plasma level showed no protection and did not cause renal injury with dexmedetomidine infusion. There were no

Abstract

inflammation differences during injury showed by interleukins plasma levels. Histological analysis showed that the use of dexmedetomidina did not protected against renal I/R.

Key words: Ischemia, Reperfusion, NGAL, Interleukins, Histology, Rat.

1 INTRODUÇÃO E LITERATURA

1.1 Lesão Renal Aguda

A lesão renal aguda (LRA) caracterizada como redução abrupta da função renal tem incidência bastante variável, dependendo dos critérios utilizados em sua definição¹. Esta não é universalmente aceita e existem mais de 35 diferentes definições na literatura². Isso faz com que exista grande variação entre os dados disponíveis quanto à sua incidência (1% a 25% dos pacientes em UTI) e mortalidade (15% a 60%). É relativamente comum entre pacientes internados, sobretudo entre os doentes críticos admitidos em unidades de terapia intensiva. Todas as definições incluem elevação abrupta da creatinina sérica ou redução do débito urinário³. Foi demonstrado que mesmo mudanças moderadas na função renal podem ter impacto negativo sobre o resultado da evolução desta entidade⁴.

Atualmente tem sido utilizada a classificação RIFLE, que combina creatinina sérica ou débito urinário com desfecho clínico³⁻⁵. É um bom preditor de prognóstico, com aumento da mortalidade conforme a classe. Esta se divide em três categorias de gravidade (risco, lesão e falência) e duas categorias clínicas (estágio final da doença renal e perda renal). Desta forma, o acrônimo RIFLE passou a identificar a classificação da forma que se segue:

- **Risco (R - Risk):** elevação de 1,5 vezes a creatinina sérica em relação ao basal ou redução da taxa de Filtração Glomerular (TFG) em mais de 25% e/ou débito urinário (DU) de 0,5mL/kg/h por 6 horas.
- **Lesão (I - Injury):** elevação de duas vezes a creatinina sérica em relação ao basal ou redução da TFG em mais de 50% e/ou DU de 0,5mL/kg/h por 12 horas.
- **Falência (F - Failure):** aumento de três vezes a creatinina sérica em relação ao basal e/ou débito urinário de 0,3mL/kg/h por 24 horas

(oligúria) ou por 12 horas (anúria) ou valores de creatinina sérica acima de 4.0mg/dL.

- **Perda Renal (L - Loss:)** falência renal aguda persistente por mais de 4 semanas.
- **Estagio final da doença renal (E - End stage):** falência renal por mais de 3 meses.

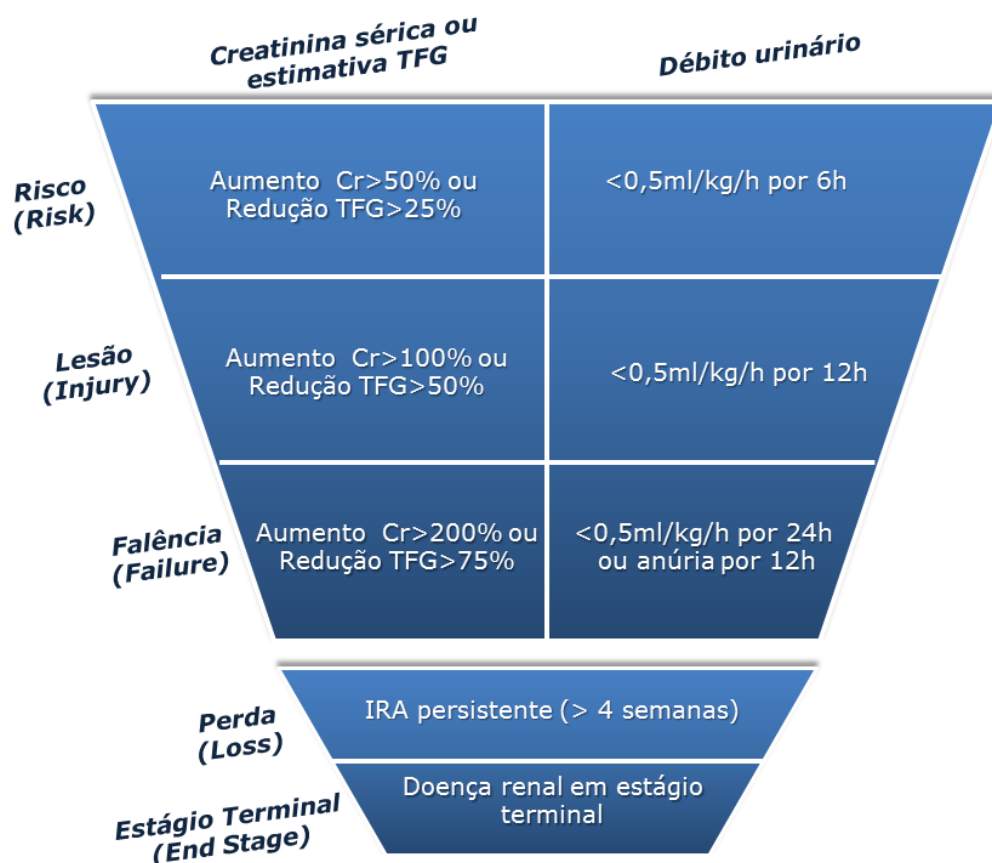


FIGURA 1 – Critérios de RIFLE. (Adaptado de Ricci et al., 2008).

As causas de insuficiência renal aguda (IRA) podem ser divididas em três categorias. Na forma pré-renal ocorre elevação reversível de ureia e creatinina séricas, geralmente por decréscimo da perfusão renal com consequente queda da taxa de filtração glomerular (TFG). Na forma renal, ou intrarrenal, há alteração de estrutura do glomérulo, sendo a necrose tubular aguda (NTA) a principal causa. Ocorre geralmente por agressão isquêmica ou nefrotóxica e em 75% dos casos é a evolução de uma IRA pré-renal. Por último a IRA pós-renal, que ocorre por obstrução das vias urinárias por massas extrínsecas (tumor ginecológico, por exemplo) ou intrínsecas do trato urinário (litíase ou tumor do trato urinário)⁶.

No período perioperatório a lesão por isquemia e reperfusão permanece como primeira causa de LRA⁷ e apesar dos avanços terapêuticos, está associada a índices de morbidade elevados¹. Frequentemente leva a períodos prolongados de internação e pode evoluir para doença renal em estágio terminal (DRET).

1.2 Isquemia e Reperfusão

Isquemia é a ausência ou diminuição do fluxo sanguíneo para o tecido com potencial lesão celular e é a base de condições como infarto do miocárdio, insuficiência vascular periférica, acidente vascular cerebral e choque hipovolêmico. A restauração do fluxo sanguíneo para o órgão isquêmico é denominada reperfusão e, embora seja necessária para evitar a lesão celular irreversível, também ocasiona lesões celulares. É resultado de um desequilíbrio localizado ou generalizado da oferta de oxigênio e nutrientes e do acúmulo de produtos do metabolismo. Como resultado, as células tubulares epiteliais sofrem um insulto, que se for grave, as leva à morte por apoptose ou necrose (necrose tubular aguda), causando disfunção do órgão com alteração da homeostase de água e eletrólitos e diminuição na eliminação de metabólitos⁸.

O dano celular após a reperfusão de um tecido previamente isquêmico é denominado lesão de reperfusão. A lesão de isquemia e reperfusão (I/R) causa resposta inflamatória local e sistêmica, podendo resultar em disfunção múltipla de órgãos e sistemas (DMOS) e morte⁹. No caso dos rins, causa danos ao

parênquima renal pós-isquêmico e histologicamente é caracterizado por alterações vasculares, edema intersticial, alteração de células do parênquima, de células tubulares e infiltrado inflamatório¹⁰.

A fisiopatologia é um processo dinâmico, que resulta em inflamação e comprometimento do fluxo sanguíneo para a medula externa com perda de células tubulares, necrose e/ou apoptose das células epiteliais. No período inicial de isquemia ocorre depleção de ATP com mudança de metabolismo aeróbico para anaeróbico e geração de metabólitos citotóxicos. Após reperfusão surgem formas reativas intermediárias de oxigênio, além de ativação de plaquetas e neutrófilos, lesão de células endoteliais, aumento da permeabilidade vascular, da atividade de citocinas e ativação do complemento¹¹. A interação entre leucócitos e endotélio gera uma barreira física, dificultando o fluxo sanguíneo¹². Duas substâncias se relacionam a este processo: endotelina e óxido nítrico (NO), que modulam o tônus vascular e alteram a adesão leucocitária. Frente à isquemia, há elevação sérica de endotelina-1 e a administração de anticorpos antiendotelina e antagonistas do receptor de endotelina protegem contra lesão de isquemia e reperfusão. Alguns efeitos da endotelina são contrabalançados pelo NO. Óxido nítrico causa vasodilatação e reduz expressão e atividade da endotelina, com consequente proteção contra lesão de isquemia e reperfusão. Também inibe a adesão de neutrófilos ao endotélio induzida pelo TNF- α ¹².

Caso a lesão seja reversível, ocorre migração de células sobreviventes, desdiferenciação, proliferação e nova diferenciação, com restabelecimento do epitélio normal¹².

O pré-condicionamento isquêmico é um mecanismo intrínseco utilizado por órgãos expostos a períodos de insulto isquêmico ou tóxico, com potencial de proteção contra agressão isquêmica posterior¹³. Foi descrito primeiramente no coração^{14,15}, mas também ocorre em outros órgãos, como o rim¹¹. Possíveis mecanismos renais seriam a desdiferenciação celular pós-isquêmica, gerando células menos susceptíveis à isquemia, além do aumento de proteínas protetoras.

A ativação de cinases relacionadas à isquemia JNK e p38 foram marcadamente reduzida pelo pré-condicionamento isquêmico^{11,13}, mas não houve efeito sobre ERK. O equilíbrio entre ERK, JNK e p38 tem sido proposto como determinante de sobrevivência de neurônios e células renais à apoptose¹³. JNK e p38 aumentam a expressão de moléculas de adesão e produção de citocinas e, portanto, a redução destas cinases pode reduzir a interação entre leucócitos e endotélio.

1.3 Inflamação

O endotélio e as células musculares lisas têm papel importante na fisiopatologia da lesão renal aguda. Durante período de redução da perfusão renal, o fluxo sanguíneo para a região medular externa é reduzido desproporcionalmente em relação à perfusão total do rim. As células endoteliais são determinantes importantes do tônus vascular, da atração leucocitária e da responsividade da musculatura lisa. O endotélio lesado e as pequenas arteríolas no rim pós-isquêmico estão mais contraídas que os vasos de rins normais em resposta ao aumento dos níveis de endotelina-1, angiotensina II, tromboxano A2, prostaglandinas H2, leucotrienos C4 e D4 e adenosina além do estímulo nervoso simpático. Também há diminuição da vasodilatação em resposta a acetilcolina, bradicinina e óxido nítrico. Essa vasoconstrição também é agravada por citocinas vasoativas como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IL-32 e endotelina, produzidas como resultado da adesão endotélio-leucócito e ativação de leucócitos. O aumento da vasoconstrição, oclusão de pequenos vasos pela adesão de leucócitos ao endotélio e ativação da cascata de coagulação comprometem a microcirculação local e levam a isquemia regional, principalmente da camada medular externa⁸.

Há neste processo infiltração intersticial por células inflamatórias, alteração da permeabilidade vascular com edema tecidual, perda da borda em escova do epitélio tubular e perda da polaridade de suas células. A luz tubular contém células destacadas, e debris celulares, podendo ocorrer obstrução⁸.

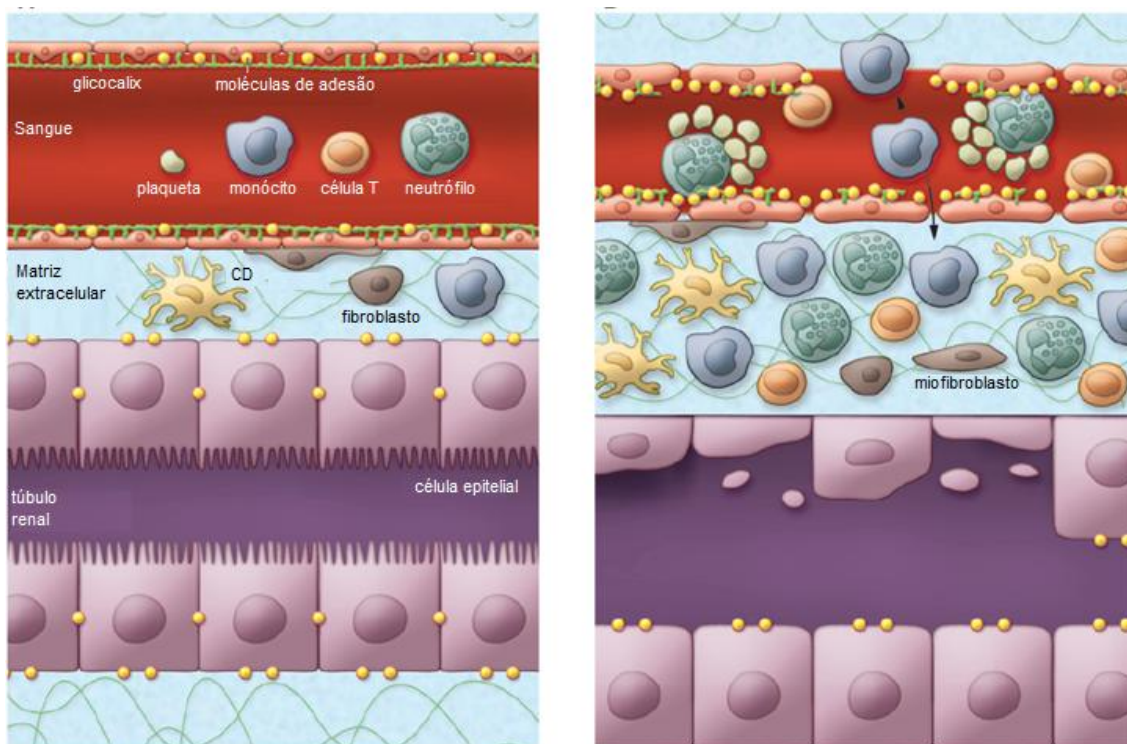


FIGURA 2 - Resposta inflamatória na lesão isquêmica (Adaptado de Bonventre et al., 2011).

As respostas imune inata e adaptativa estão envolvidas na fisiopatologia da lesão de isquemia e reperfusão. A resposta imune inata é responsável pela resposta precoce à agressão de maneira inespecífica e envolve neutrófilos, monócitos, macrófagos, células “*natural-killer*” (NK). O componente adaptativo, que é ativado por antígenos específicos, é iniciado após algumas horas e permanece durante todo o evento e alguns dias após insulto, inclui maturação de células com apresentação de antígenos, proliferação e ativação de linfócitos e interação de linfócitos T e B⁸.

Com a hipoxemia em túbulos proximais isolados observou-se, ainda, um aumento na liberação de NO. A análise de “*western blot*” em rins isquêmicos homogeneizados demonstrou aumento na expressão da proteína óxido nítrico sintase induzida (iNOS). A diminuição da iNOS em ratos foi associada a uma significativa redução da mortalidade durante a isquemia e reperfusão. O carreamento do NO pelos radicais de oxigênio produz peroxinitrito que causa dano ao túbulo durante a isquemia. Observou-se que a administração de hormônio estimulante de α -melanócito proporciona proteção contra lesão renal de isquemia e reperfusão pelo bloqueio da indução da iNOS e diminui a

infiltração leucocitária renal durante a isquemia. A superóxido dismutase, varredora de radicais de oxigênio, também tem papel protetor na LRA associada à endotoxina. No entanto, há indícios de que o efeito da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) nas arteríolas glomerulares aferentes é de proteção contra LRA causada por isquemia e reperfusão. Além disto, o efeito protetor da eNOS supera os efeitos deletérios da iNOS. A proteína quinase mitógena (MAPK) também está envolvida na LRA oxidante. Ativação da quinase regulada por sinais extracelulares (ERK) ou inibição da quinase c-Jun N-terminal (JNK) tem sido apontado como fator de melhora na necrose induzida por lesão oxidante em células do tubo proximal em ratos *in vitro*. A “*up regulation*” da ERK pode determinar importante efeito no pré-condicionamento e proporciona proteção contra insultos subsequentes de isquemia e reperfusão¹⁶.

Quando a lesão é reversível, tem início a fase de reparo. Células tubulares viáveis migram e recobrem áreas expostas da membrana basal, sofrendo processo de desdiferenciação celular. Estas dão, então, início ao processo de divisão celular e substituem as células perdidas. Sofrem novo processo de diferenciação com restabelecimento do epitélio normal⁸.

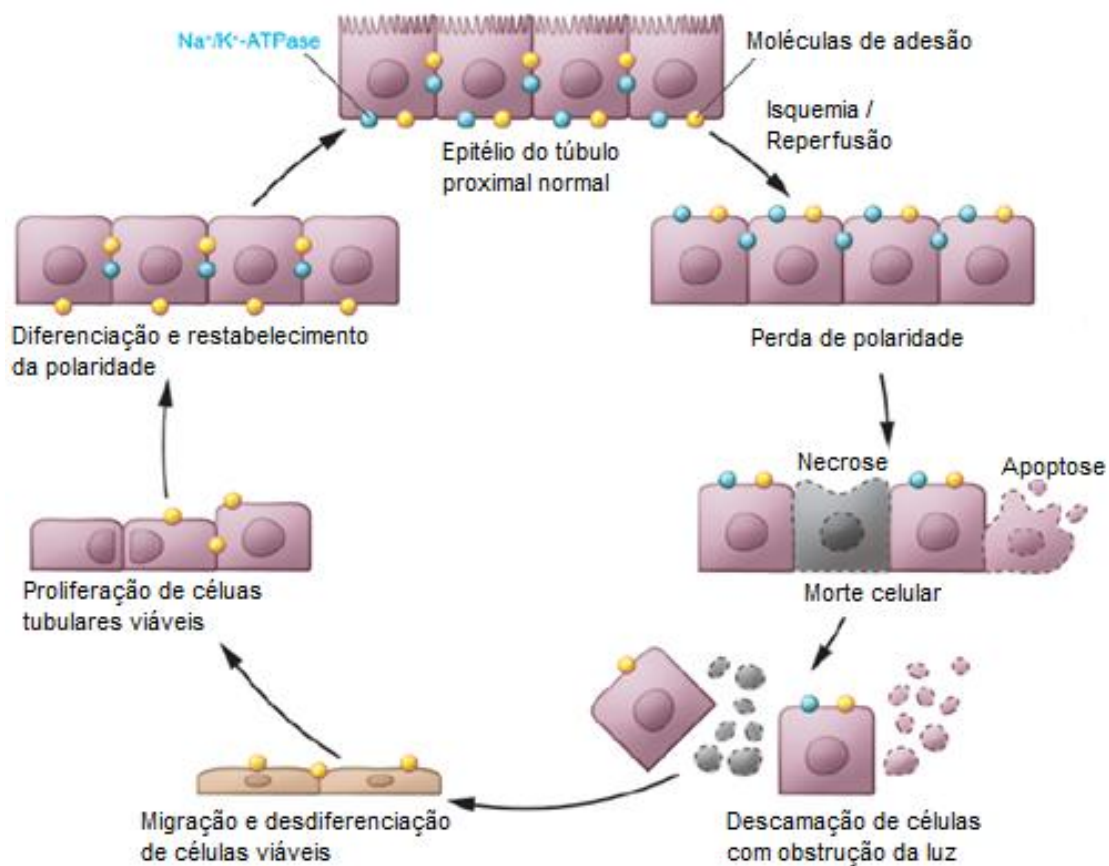


FIGURA 3 – Reparo da lesão renal isquêmica aguda.

1.4 Interleucinas

Interleucinas são moléculas que promovem a comunicação intercelular que regula a resposta inflamatória. Algumas citocinas exercem efeito estimulatórios *in vitro*, enquanto outras parecem atenuar a responsividade de células T. O resultado deste papel complementar e aparentemente competitivo *in vivo* ainda não foi completamente esclarecido¹⁷.

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina envolvida na regulação da imunidade e resposta inflamatória. É produzida por linfócitos T e B, monócitos, macrófagos, fibroblastos, musculatura lisa de vasos, endotélio, além de células mesangiais e epitélio tubular. Tem diversas funções, entre elas regula expressão de moléculas de adesão e induz produção de outras citocinas em células endoteliais, como IL-1 β , e TNF- α , que amplificam potentemente a

resposta inflamatória. Foi demonstrado que a IL-6 piora a inflamação e o grau de lesão renal após isquemia e reperfusão¹⁷.

A interleucina-1 (IL-1) é uma das principais citocinas pró-inflamatórias. Existem dois subtipos, interleucina 1 α (IL-1 α) e interleucina 1 β (IL-1 β) e ambas se ligam ao mesmo receptor, o receptor agonista IL-1. Induz a produção e liberação de diversas citocinas incluindo IL-6, TNF- α , INF- δ , IL-8 e a própria IL-1, entre outros¹⁸, induzindo infiltração inflamatória tecidual. Um estudo demonstrou a participação da IL-1, seguida de infiltração tecidual por células inflamatórias na lesão tecidual.

Com relação à Interleucina-10 (IL-10) já foi demonstrado o seu papel de atenuação da resposta inflamatória com proteção contra a lesão de isquemia e reperfusão^{19,20}.

O fator de necrose tumoral α (TNF- α) é uma potente citocina pró-inflamatória. É liberada em resposta à lesão de isquemia e reperfusão e está envolvida em sua patogênese. Induz deposição de fibrina nos glomérulos, infiltração de células inflamatórias e vasoconstrição, causando redução na taxa de filtração glomerular²¹. A ligação ao receptor TNF também pode induzir apoptose de células renais, o principal mecanismo de morte celular associado à lesão de isquemia e reperfusão²¹.

Na lesão renal induzida pela cisplatina estão aumentadas as interleucinas IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-18 e TNF- α ²².

1.5 Biomarcadores de lesão renal

Estudos experimentais em animais têm esclarecido a patogênese da LRA e demonstram que pode ser prevenida ou tratada desde que medidas protetoras precoces sejam tomadas. Mas a ausência de um marcador precoce de lesão renal tem interferido na aplicabilidade das pesquisas experimentais.

O marcador mais utilizado para avaliação da função renal é a dosagem da creatinina plasmática, mas esta sofre interferência de múltiplos fatores como idade, sexo, massa muscular, e grau de hidratação. Pode, ainda, estar dentro

da normalidade com uma perda de até 50% da função renal^{1,23}. Eleva-se tardiamente, entre 24 a 48 horas após a lesão renal, tempo considerado tardio para detecção precoce da lesão renal²⁴. A creatinina não é sensível, é inespecífica e não diferencia adequadamente os diferentes estágios de LRA.²⁵

A identificação da LRA como um marcador precoce é um passo importante para uma intervenção rápida e precisa com melhora dos resultados obtidos no tratamento desta condição²⁴.

A NGAL (lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos) é uma proteína de 25kDa que se expressa em baixas concentrações em diversos tecidos humanos, incluindo rins, traqueia, pulmões, estômago e cólon. Sua expressão se inicia após evento lesivo, aparecendo em precursores granulocíticos e epitélio dos órgãos citados. Passa livremente pela membrana glomerular sendo parcialmente reabsorvida por endocitose no túbulo proximal^{24,26}.

Tem capacidade de ligação com pequenas moléculas hidrofóbicas, participa do transporte de moléculas através de barreiras fisiológicas, ligação a receptores específicos na superfície celular e formação de complexos com macromoléculas solúveis²⁴. Transporta retinóides, ácido aracdônico, prostaglandinas, ácidos graxos, ferormônios, esteroides e ferro. Participa, ainda, da homeostase celular e da resposta imune inata²⁴.

A NGAL participa da regeneração da célula tubular renal imediatamente após insulto isquêmico ou inflamatório. Em um modelo de isquemia-reperfusão em ratos, demonstrou-se que uma única dose de NGAL administrada durante a fase inicial da doença renal protege o rim, preserva integridade tubular e atenua azotemia^{27,28}.

O insulto de isquemia e reperfusão tem capacidade de induzir a expressão da NGAL em epitélio lesado²⁷. Após insulto, a NGAL se acumula predominantemente no túbulo proximal juntamente com células epiteliais proliferativas. Nesta situação, a concentração plasmática está elevada em torno de dez vezes e na urina cem vezes, o que se correlaciona com valores de creatinina¹.

A NGAL tem sido usada como marcador precoce e sensível de lesão renal em experimentos com animais. Existem estudos em seres humanos avaliando seu uso como marcador precoce de lesão renal. A dosagem ELISA pode identificar seu aumento, antes mesmo do desenvolvimento da LRA, sendo NGAL um marcador sensível, específico e preditivo de lesão renal aguda²⁹⁻³¹.

Portanto, sendo a NGAL um marcador precoce de LRA, esta se assemelhará à troponina para lesão miocárdica³².

Várias pesquisas têm utilizado dosagem de NGAL plasmática e urinária através do método ELISA baseado em anticorpo monoclonal. Alguns estudos têm apresentado valores de NGAL preditivos de lesão renal de 140ng/mL para o plasma (sensibilidade de 84% e especificidade de 94%) e de 100g/L para urina (sensibilidade de 82% e especificidade de 90%)³³⁻³⁵.

A dosagem de 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. Num estudo em que 71 crianças foram submetidas à correção de cardiopatia congênita, a dosagem da NGAL mostrou um alto valor preditivo para LRA, tanto urinário quanto plasmático. O diagnóstico clínico, baseado no marcador creatinina, ocorreu apenas 24 a 48h após²⁶. Em adultos, os dados não foram tão concretos. Possíveis razões para essa diferença entre as populações infantil e adulta podem ser a influência de comorbidades em adultos, as limitações típicas da creatinina ou do débito urinário, ambos usados como método de auxílio diagnóstico. Além disso, a coleta de NGAL realizadas em momentos diferentes entre os estudos podem ter contribuído para as divergências. Ainda assim, o incremento sérico da NGAL foi proporcional ao grau de gravidade e duração da LRA, sendo considerado o mais forte fator independente de risco para desenvolvimento de LRA em UTI³⁶⁻³⁸.

Sepse é uma condição que contribui para o desenvolvimento de LRA em mais de 50% dos pacientes graves. Diferente do que ocorre em cirurgia cardíaca, em que o momento do evento lesivo ao rim é conhecido, na seps e choque séptico este momento é desconhecido, dificultando a detecção precoce

e abordagem ideal. Um marcador precoce de lesão renal possibilitaria a tomada de decisão tão logo quando fosse estabelecido o risco. Em estudo envolvendo pacientes adultos, sépticos e não sépticos, a NGAL plasmática e urinária demonstrou associação significativa com piora da LRA e início da TSR³⁹. 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 melhor como preditor de progressão da LRA em pacientes não sépticos. De maneira geral, a NGAL permitiu o diagnóstico de LRA 48 horas antes dos métodos convencionais preconizados em consensos RIFLE⁴⁰.

Na sala de urgência, para 661 pacientes com suspeita de sepse, a NGAL foi um bom marcador preditivo para diagnóstico e prognóstico de LRA. Concentrações plasmáticas acima de 150ng/mL tiveram sensibilidade de 96% e especificidade de 51% para detecção de LRA dentro de 72h de acompanhamento⁴¹. Outro estudo selecionou pacientes com resposta inflamatória por causas diversas, dentre elas, síndrome de resposta inflamatória sistêmica, sepse e choque séptico, com e sem LRA. A dosagem da NGAL sérica e urinária mostrou ser bom preditor de LRA nesse contexto⁴².

Metanálise envolvendo 2538 doentes mostrou que a sensibilidade e especificidade da NGAL para LRA variou entre 75% e 95% em doentes críticos ou após exposição a contraste. Nesse estudo, a NGAL mostrou excelente valor preditivo para LRA (80%) e para início da TSR (78%). O ponto de corte variou conforme etiologia da insuficiência renal, mas de maneira geral ficou acima de 150ng/mL⁴³.

1.6 Dexmedetomidina

A dexmedetomidina é fármaco agonista do receptor α_2 -adrenérgico. Tem afinidade oito vezes maior pelo receptor α_2 que a clonidina. É 1620 vezes mais potente como α_2 -agonista do que como α_1 -agonista e tem efeito mais curto que a clonidina⁴⁴. É um agonista puro, com propriedades farmacocinéticas mais previsíveis, sendo a meia-vida de distribuição ($t_{1/2\alpha}$) de aproximadamente seis

minutos, contra dez minutos da clonidina, e meia-vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$) de duas horas, enquanto a da clonidina é de mais de oito horas.

Estudos farmacológicos identificaram a existência de três subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos: α_2A , α_2B , α_2C , nomenclatura que utiliza localização cromossômica do gene. Estes receptores podem ser pré-sinápticos (regulação da liberação de noradrenalina e adenosina trifosfato – ATP) e quando ativados inibem a liberação de noradrenalina tanto central quanto periférica. O subtipo predominante é o α_2A , mas α_2C e possivelmente α_2B também estejam presentes. No sítio pós-sináptico os três subtipos estão presentes na musculatura lisa vascular e quando ativados provocam vasoconstrição⁴⁵⁻⁴⁷.

Os receptores α_2 estão relacionados à regulação do sistema cardiovascular e sistema nervoso autônomo e se localizam em vasos sanguíneos (onde estão associados à vasoconstrição) e em terminais simpáticos onde inibem a liberação de noradrenalina. Também estão presentes no SNC, onde sua ativação leva a sedação, redução do tônus simpático e aumento da atividade cardio-vagal⁴⁸, levando à diminuição da frequência cardíaca e do débito cardíaco. Possui propriedades analgésicas com redução da necessidade de opióides durante anestesia geral⁴⁹.

Em seres humanos, o aumento da concentração plasmática de dexmedetomidina resulta em aumento progressivo do nível de sedação e analgesia, diminuição da frequência cardíaca, débito cardíaco e memória; há relação bifásica dose-dependente com pressão arterial média, com pressão da artéria pulmonar e resistência vascular⁴⁸. Doses baixas, que determinam menor concentração plasmática de dexmedetomidina, causam hipotensão arterial por simpatólise central e por inibição da neuro transmissão periférica. Altas doses induzem resposta hipertensiva por ativação de receptores α_2 pós-sinápticos da musculatura lisa vascular. Também causam bradicardia dose dependente pela diminuição do tônus simpático e, principalmente, pelo aumento da atividade vagal do barorreflexo. Possui mínimos efeitos sobre a ventilação. O receptor α_2 não tem um papel importante no sistema respiratório⁴⁸.

Foi demonstrando efeito protetor da dexmedetomidina contra lesão de isquemia e reperfusão em coração⁵⁰ e cérebro^{51,52} de ratos. Acredita-se que a

redução do tônus simpático e a inibição do receptor N-metil-D-aspartato estejam relacionados à modulação e redução do número de células necróticas⁵³. Engelhard et al. (2003) em seu experimento demonstraram o efeito neuroprotetor da dexmedetomidina utilizando modelo de isquemia e reperfusão cerebral em ratos com diminuição da apoptose através do aumento da concentração de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Mdm-2⁵³.

No rim, foi demonstrada proteção contra lesão renal induzida por radiocontraste com uso de agonistas do receptor α_2 -adrenérgico⁵⁴. Há relato de melhora da função renal com uso de dexmedetomidina em ratos submetidos à hemorragia aguda⁵⁵. Um estudo sobre alterações histológicas após isquemia e reperfusão em ratos demonstrou que o uso de dexmedetomidina se relacionou com glomérulos normais e edema discreto de células tubulares renais, indicando de que esta droga pode reduzir a lesão renal neste cenário⁵⁶. Outro estudo demonstrou significativa redução nos níveis plasmáticos de creatinina e ureia em ratos submetidos à lesão renal de isquemia e reperfusão⁵⁷. Também foi demonstrada capacidade de proteger pulmões de ratos de lesão produzida a distancia por isquemia e reperfusão renal⁵⁸.

Na prática clínica os efeitos protetores da dexmedetomidina sobre a função renal permanecem incertos⁵⁹. Wijesundera et al. (2003)⁶⁰ em seu trabalho de metanálise utilizou publicações em que clonidina, dexmedetomidina ou mivazerol foram administradas no pré-operatório, intraoperatório e pós-operatório (48 horas). Foram analisados mortalidade, infarto do miocárdio, isquemia e taquiarritmias supraventriculares e demonstrou que o uso de fármacos α -agonistas adrenérgicos se relacionou à redução da mortalidade e do índice de infarto agudo do miocárdio após cirurgia vascular.

Frumento et al. (2006)⁶¹ observaram que em pacientes submetidos à cirurgia torácica, o uso de dexmedetomidina como adjuvante de analgesia epidural em pacientes sem doença renal prévia se associou com melhor resultado de débito urinário e índices de filtração glomerular, provavelmente por reverter o efeito tubular antidiurético por diminuir a liberação ou efeito da arginina vasopressina (AVP).

2 Hipótese do Estudo

A hipótese do estudo foi a de que a dexmedetomidina na dose de $3\mu\text{g/kg}$ em bolus de 10 minutos seguida de infusão contínua de $3\mu\text{g/kg/min}$ poderia proteger o rim das lesões de isquemia e reperfusão.

3 OBJETIVOS

3.1 Primário

Avaliar os efeitos protetores renais da dexmedetomidina por meio das dosagens plasmáticas da NGAL, interleucinas e análise histológica em modelo experimental de isquemia e reperfusão em ratos.

3.2 Secundário

Avaliar a estabilidade hemodinâmica com a administração da dexmedetomidina.

4 MATERIAL E MÉTODO

Após a aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, foram incluídos no estudo 34 ratos Wistar, com peso maior que 250g, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu da UNESP.

4.1 Grupos Experimentais

Todos os animais foram inicialmente anestesiados por via inalatória com isoflurano em concentração inspirada de 4% e fluxo de oxigênio de 3 a 4 litros por minuto durante 5 minutos e incluídos aleatoriamente em quatro grupos de estudo conforme descrição abaixo.

- **Grupo Sham (S)** isoflurano e nefrectomia direita;
- **Grupo Sham com dexmedetomidina (SD)** isoflurano e dexmedetomidina + nefrectomia direita;
- **Grupo Controle (C)** isoflurano + nefrectomia direita e isquemia e reperfusão renal esquerda
- **Grupo Dexmedetomidina (D)** isoflurano e dexmedetomidina + nefrectomia e isquemia e reperfusão renal esquerda.

Grupo S ou Grupo Sham (n=10): indução anestésica com isoflurano a 4,0% e manutenção com fração inspirada entre 1,5 e 3,0%. Realizadas laparotomia e nefrectomia direita, sem isquemia renal esquerda.

Grupo SD ou Grupo Sham com Dexmedetomidina (n=8): indução anestésica com isoflurano a 4,0% e manutenção entre 1,5 a 3,0%. Dexmedetomidina a 3µg/kg em 10 minutos, seguido de infusão contínua de 3µg/kg/h. Realizada laparotomia com nefrectomia direita. Não houve isquemia e reperfusão renal esquerda.

Grupo C ou Grupo Controle (n=8): indução anestésica com isoflurano a 4,0% e manutenção com isoflurano na concentração inspirada entre 1,5 a 3,0%. Realizadas laparotomia e nefrectomia direita. Administrado 2 mL de solução de soro fisiológico 0,9% em *bolus* e mantida infusão contínua de solução salina (soro fisiológico 0,9%) em uma taxa de infusão contínua de 3 mL.h⁻¹. Submetidos a isquemia e reperfusão renal esquerda.

Grupo D ou Grupo Dexmedetomidina (n=10): indução anestésica com isoflurano a 4,0% e manutenção com isoflurano na concentração inspirada entre 1,5 a 3,0%. Serão realizadas laparotomia e nefrectomia direita. Infusão contínua de dexmedetomidina a 3µg/kg em 10 minutos, seguido de infusão contínua de 3µg/kg/h. Submetidos a isquemia e reperfusão renal esquerda.

4.2 Cálculo da dose de dexmedetomidina

Os trabalhos que relacionam dexmedetomidina com lesão de isquemia e reperfusão renal em ratos são bastante heterogêneos e utilizam a droga de formas e doses diversas. Foi utilizado na forma intraperitoneal em dois estudos, na dose de 25µg/Kg⁵⁷ e de 100µg/kg⁵⁶. Em outro trabalho, a dexmedetomidina foi utilizada com *bolus* inicial de 1,0µg/kg em 10 minutos, seguido de infusão contínua de 1,0µg/kg/h em bomba de infusão⁶².

Em seres humanos, as doses de dexmedetomidina recomendadas são *bolus* inicial de 0,5-1,0mcg/kg em 10min com infusão de manutenção de 0,2-0,7 mcg/kg/h⁶³.

Neste trabalho, as doses de infusão de dexmedetomidina foram obtidas a partir da fórmula preconizada pelo FDA (*Food and Drug Administration*)⁶⁴. Esta fórmula converte a dose de drogas em ratos (DR) em dose equivalente em humanos, tanto em mg/kg quanto mcg/kg.

Fórmula

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

O objetivo do uso desta formula foi aproximar a dose utilizada no modelo animal com as doses utilizadas na prática clínica. Para facilidade de manuseio de bombas de infusão e utilizando-se da fórmula do FDA, optou-se pela dosagem em ratos de 3mcg/kg em 10 min (que equivale a *bolus* de 0,48mcg/kg em seres humanos), e infusão contínua de 3mck/kg/h (que equivale a 0,48mcg/kg/h em seres humanos)

TABELA 1 - Cálculo da dose de dexmedetomidina

	Dose adotada - seres humanos	Dose equivalente em ratos
Bolus inicial	0,5 µg/kg	3 µg/kg/h
Infusão contínua	0,5 µg/kg	3 µg/kg/h

4.3 Atributos Estudados

Foram analisados, em cada um dos animais dos quatro grupos os seguintes atributos:

- Peso
- Pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM)
- Frequência cardíaca (FC)
- Temperatura retal
- Dosagem plasmática de NGAL
- Dosagem plasmática de interleucinas
- Histologia renal ao final do experimento

4.4 Momentos Estudados

- Momento 0 – Monitorização inicial
- Momento 1 – após cateterização arterial e venosa
- Momento 2 – 30min após clampeamento renal
- Momento 3 – 30 min após reperusão renal
- Momento 4 – última coleta, após 12h inicio do experimento

4.5 Sequência experimental

Cada animal possuía um protocolo individual onde foram anotados os atributos de interesse do experimento. A monitorização da pressão arterial, frequência cardíaca e temperatura retal foram contínuas, a partir do momento da cateterização arterial e venosa.

1. Os animais tiveram livre acesso a água e alimentos.
2. Realizada a pesagem dos animais imediatamente antes do início do experimento.
3. Foram realizados os cálculos relativos às soluções e seu preparo.
4. Os animais foram anestesiados em recipiente específico com isoflurano a 4% e oxigênio a 100%.



FIGURA 4 - Sistema de Indução anestésica inalatória.

5. Foram utilizadas bolsas aquecidas para manutenção da temperatura em 37-38°C.

6. Os animais foram mantidos em ventilação espontânea com fração inspirada de oxigênio de 100% e isoflurano com concentração variando de 1,5% a 3% em máscara facial.



FIGURA 5 - Manutenção da ventilação espontânea sob máscara facial.

7. Colocado termômetro retal para aferição da temperatura.
8. Realizada a dissecação e cateterismo da veia jugular externa direita para infusão de soluções de hidratação e fármacos venosos em bomba de infusão contínua.
9. Infusão venosa de Ringer lactato a $3,0 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$, para a reposição das perdas de fluídos em bomba de infusão (ANNE – Abbot Laboratories, EUA).
10. Realizada a dissecação e cateterismo da artéria carótida esquerda para monitorização da pressão arterial e coleta de amostras de sangue.
11. Coleta dos seguintes dados de monitorização (Datex-Ohmeda modelo AS3 – Engstron, Finlândia): pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média, frequência cardíaca e temperatura retal. Momento 0 (M0).
12. Avaliação da estabilidade hemodinâmica, seguida de coleta de 1,5 mL de sangue da carótida esquerda para as dosagens de NGAL e interleucinas. A retirada deste sangue foi repostada com de 3 mL de Ringer lactato. Momento 1 (M1).

13. Início do *bolus* de dexmedetomidina 3,0 µg/kg em 10 minutos, seguido de infusão contínua de 3,0 µg/kg/h.
14. Intervalo de 15 minutos após termino do bolus de dexmedetomidina.
15. Infiltração da pele com bupivacaína 0,125% sem vasoconstritor, total de 2 mL/kg visando analgesia.
16. Laparotomia com nefrectomia à direita.
17. Clampeamento da artéria renal esquerda por um período de 30 minutos. Mantida a infusão da solução durante este período.

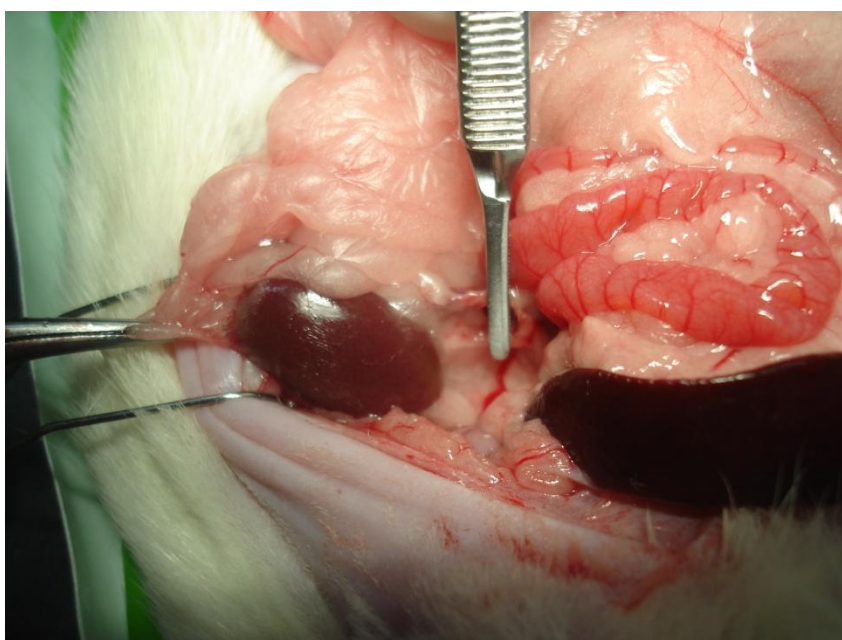


FIGURA 6 - Clampeamento da artéria renal esquerda.

18. Registrados os dados de monitorização. Imediatamente antes da liberação da artéria renal esquerda, coleta de 1,5 mL de sangue da carótida esquerda para as dosagens de NGAL e interleucinas. Reposição com *bolus* de 3 mL de Ringer lactato. Momento 2 (M2).
19. Liberação do clampeamento da artéria renal esquerda e aguardado um período de trinta minutos, mantendo-se a infusão de dexmedetomidina.
20. Fechamento da parede abdominal.

21. Trinta minutos após reperfusão, registrados os dados de monitorização e coletado 1,5 mL de sangue arterial para dosagem de NGAL e interleucinas com reposição de 1,5 mL de Ringer lactato. Momento 3 (M3).
22. Retirada dos cateteres venoso e arterial com fechamento da incisão cervical.
23. Suspensa administração do anestésico inalatório e os animais foram despertados.
24. Os animais foram mantidos em gaiola container climatizada com alimentação e livre acesso a água por 12 horas.
25. Após o período de 12h, os animais foram novamente anestesiados em recipiente específico com isoflurano a 4% e oxigênio a 100%.
26. Realizada nova coleta de 1,5 mL de sangue intracardíaco para as dosagens de NGAL e interleucinas. Momento 4 (M4).

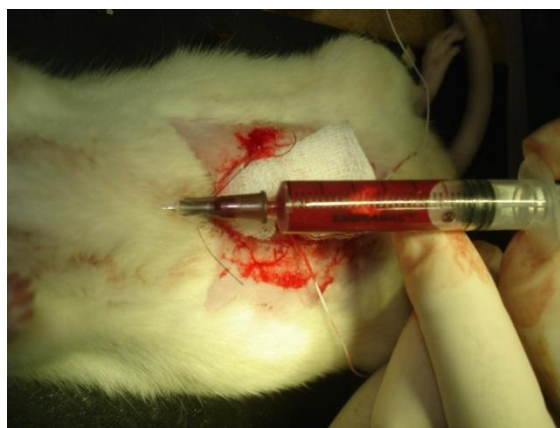


FIGURA 7 - Coleta de sangue intracardíaco.

27. Feita a nefrectomia esquerda.
28. Sacrifício dos animais por meio de injeção intracardíaca de tiopental a 2,5%.

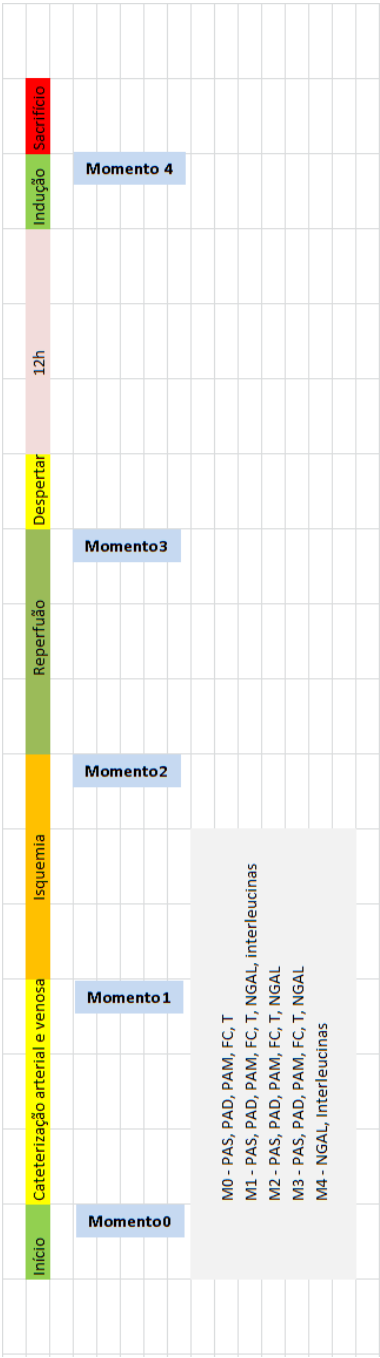


FIGURA 8 - Momentos estudados.

4.6 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 rim esquerdo por 24 horas. A seguir foram armazenados em solução de álcool 80% 150 mL + ácido pícrico 2,4g + formalina 40% 60mL + ácido acético glacial 12,5 mL, para posterior avaliação histológica.

Utilizou-se coloração de hematoxilina-eosina e os cortes foram analisados sob diversos aumentos na microscopia óptica. Os critérios microscópicos utilizados para caracterizar a necrose das células tubulares foram os seguintes: picnose nuclear, cariorrexe e cariólise ou cromatólise (rompimento de membranas celulares)⁶⁵.

Picnose é a alteração degenerativa do núcleo da célula que apresenta um volume reduzido (diminui até menos de 6 micras de diâmetro) e torna-se hipercorada, tendo sua cromatina condensada. 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). Cariorrexe é a fragmentação do núcleo picnótico. A cromatina adquire uma distribuição irregular, podendo se acumular em grânulos na membrana nuclear. Ocorre perda dos limites nucleares. Cariólise ou cromatólise é a destruição, por dissolução, do núcleo da célula. Ocorre a dissolução da cromatina e a perda da coloração do núcleo, o qual desaparece completamente.

As lâminas foram avaliadas quanto à porcentagem de necrose tubular e classificadas com o uso do escore descrito por Park⁶⁵.

TABELA 2 – Grau e gravidade de lesão quanto a necrose tubular avaliado pela histologia renal

Grau	Tipo	% de lesão
0	Sem lesão	Ausente
1	Leve	<10% necrose tubular
2	Moderado	10 a 25%
3	Moderado a Grave	25 a 50%
4	Grave	50 a 75%
5	Muito Grave	>75%

Adaptado de Park et al. 2008⁶⁵.

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

4.7 Dosagem plasmática de NGAL e interleucinas

As coletas sanguíneas realizadas em todos os momentos do experimento tiveram como objetivo as dosagens de NGAL pelo método imunoenzimático ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) e das interleucinas pelo método multiplex através do sistema com Tecnologia xMap Luminex da Biorad. Foi utilizado NGAL Rapid Elisa Kit (037) (Anexo 1) e das Interleucinas BIOPLEX multiplexados baseados em beads (Anexo 2).

4.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa Stat/SE 9.0 for Windows (Stata Corporation, College Station, Texas, USA). Valores de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média, frequência cardíaca, temperatura, NGAL, interleucinas e escore histológico são expressos em mediana e percentis 25-75%.

Para comparação da PAS, PAD, PAM, FC, T, NGAL, interleucinas e escore histológico entre os grupos, foi usado o teste de Kruskal Wallis – pós teste de Dunn.

Para comparação entre os momentos, para PAS, PAD, PAM, FC, T e NGAL, utilizou-se o teste de Friedman. Para interleucinas, utilizou-se teste Wilcoxon e para escore histológico o teste de Mann-Whitney.

5 RESULTADOS

5.1 Peso

TABELA 3 - Valores de mediana e percentis (25-75%) referente ao peso (g) segundo o grupo

Grupo	Peso (g)
C*	425(402,5-460)
D*	440(420-470)
S*	450(375-467,5)
SD*	460(432,5-497,5)
p	0,32

*Análise de variância de Kruskal Wallis. Mediana (percentil 25-75%). C – controle; D – Dexmedetomidina; S – Sham; SD – Sham com dexmedetomidina.

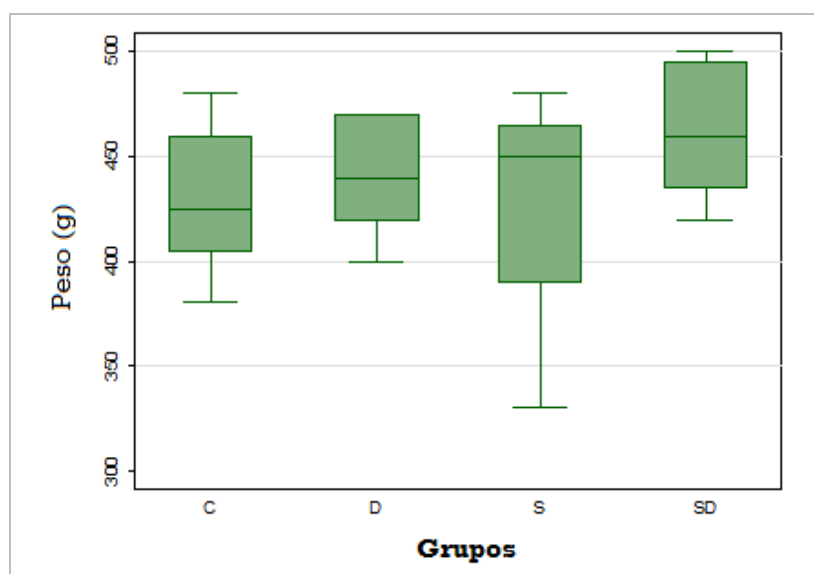


FIGURA 9 - Peso dos animais (g) por grupos.

As linhas da caixa representam mediana e percentis (linha superior e inferior).

Comentários: a análise do peso dos animais revela que não houve diferenças entre os grupos que eram homogêneos entre si, com animais de mesmo porte.

5.2 Pressão arterial sistólica

TABELA 4 - Valores de mediana e percentis (25-75%) da pressão arterial sistólica (PAS) (mmHg) segundo grupos e momentos

Grupos	Momentos				p
	M0 [#]	M1 [#]	M2 [#]	M3 [#]	
C*	116,5 (102,5-132,5)	113,5(104,75-128,75)	102(93-108)	105,5(94,75-110,75)	0,07
D*	102,5(90,5-108,5)	93(83-97,25)	85,5(81,25-87,75)	83(74,5-95,5)	<0,0001
S*	117,5(107-125,25)	113(107,25-118)	109,5(101,5-115,25)	110(105-112)	0,10
SD*	116,5(104,25-119,5)	92,5(88-99,5)	93,5(91,50-98,75)	89,5(87,25-94,5)	<0,0001
p	0,05	0,001	0,002	0,0001	

Análise de variância de Kruskal-Wallis – pós-teste de Dunn. Mediana e percentis 25-75%. M1: D<S, D<C (p=0,001); M2: D<S e D<C(p=0,02); M3: D<S, C>D (p=0,0001). *Teste de Friedman Grupo D: M0>M2, M0>M3 (p<0,0001), grupo SD: M0>M2, M0>M3 (p<0,001).

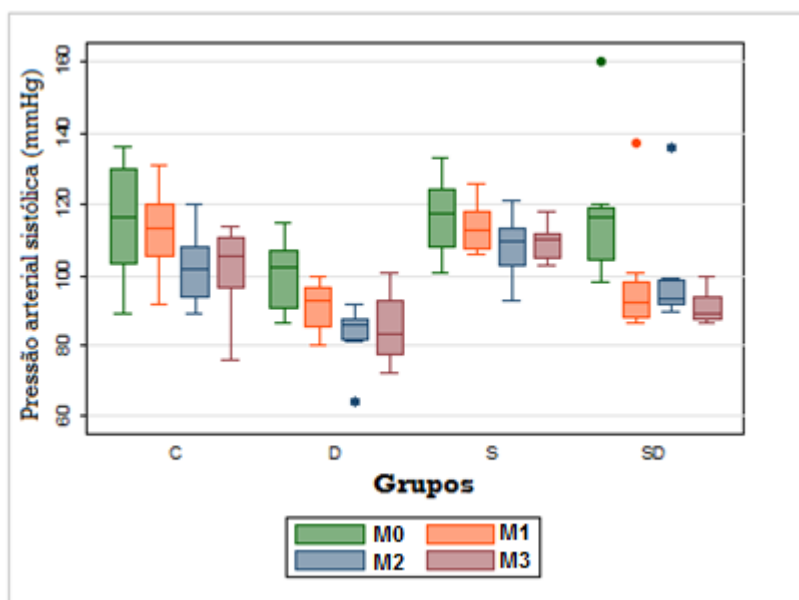


FIGURA 10 - Pressão arterial sistólica (mmHg) por grupos e momentos.

As linhas da caixa representam mediana e percentis (linha superior e inferior). C – controle; D – Dexmedetomidina; S – Sham; SD – Sham com dexmedetomidina.

Comentários: na comparação entre os grupos, a PAS do Grupo D foi menor que as dos grupos S e C em M1, M2 e M3. Comparação entre os momentos, a PAS diminuiu em M2 e M3 relativamente ao M0 nos grupos D e SD.

5.3 Pressão arterial diastólica

TABELA 5 - Valores de mediana e percentis (25-75%) de pressão arterial diastólica (PAD) (mmHg) segundo grupos e momentos

Grupos	Momentos				p
	M0 [#]	M1 [#]	M2 [#]	M3 [#]	
C*	84,65(66-98,5)	83(60,25-84,75)	57,5(45-67,5)	57,5(49-74)	0,04
D*	68(63,25-80,25)	52(47,75-57)	37,5(34,5-41,25)	46,5(36,25-54,75)	<0,0001
S*	90(82,50-95,50)	79(75,5-85,5)	78(66,5-84,5)	70(65-79)	<0,02
SD*	85,5(74,5-93,75)	49,5(47,25-67)	53,5(45,75-57,5)	53(47,5-56,75)	0,004
p	0,08	0,0022	0,002	0,001	

#Análise de variância de Kruskal-Wallis – pós-teste de Dunn. Mediana (percentis 25-75%). M1: C>D, S>D, SD>D (p=0,0022); M2: D<S (p=0,002); M3: S>SD, SD>D (p=0,001). *Teste de Friedman. Grupo C: M0>M2, M0>M3 (p=0,04); Grupo D: M0>M2, M0>M3 (p<0,0001); Grupo S: M0>M3 (p=0,02); Grupo SD: M0>M1, M2, M3 (p=0,004).

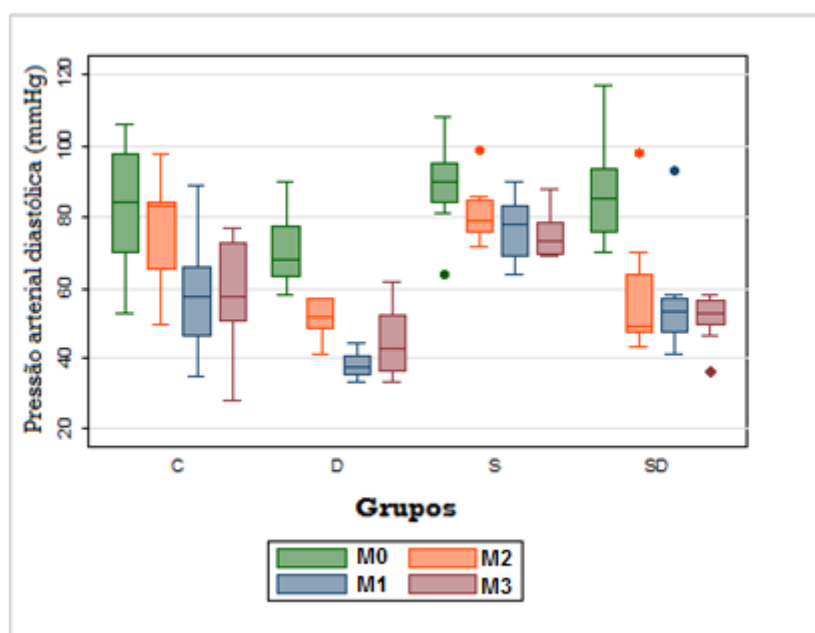


FIGURA 11 - Pressão arterial diastólica por grupos e momentos.

As linhas da caixa representam mediana e percentis (linha superior e inferior). C – controle; D – Dexmedetomidina; S - Sham; SD - Sham com dexmedetomidina.

Comentários: na comparação entre os grupos, PAD em M1 foi menor no Grupo D em comparação aos grupos C, S e SD. Também foi menor em M2 no grupo D em relação ao grupo S e em M3 foi menor no grupo D em relação ao S e no Grupo SD foi menor que grupo S. Na comparação entre os momentos, PAD em M0 foi maior que M2 e M3 nos grupos C, D e SD e no grupo S, PAD em M0 maior que em M3.

5.4 Pressão arterial média

TABELA 6 - Valores de mediana e percentis (25-75%) de pressão arterial média (PAM) (mmHg) segundo grupos e momentos

Grupos	Momentos				p
	M0 [#]	M1 [#]	M2 [#]	M3 [#]	
C*	101(89,5-111)	97,5(86,25-101)	74(61,5-84)	82(71,75-86,25)	0,004
D*	80,6(76-93,5)	66,5(62,75-72)	52(48-55,5)	56(50,25-59,75)	<0,001
S*	103(98,75-109,5)	94,5(92,75-100)	91(85,25-94,25)	90(87,75-92,75)	0,04
SD*	100,5(90,5-107,25)	67,5(62,25-82,5)	69(64,25-70,75)	68,5(62,75-70,25)	0,006
p	0,06	0,002	0,004	0,002	

#Análise de variância de Kruskal-Wallis – pós-teste de Dunn. Mediana (percentis 25-75%). M1: C>D, D<SD (p=0,002); M2: D<SD (p=0,004); M3: D<SD, S>SD (p=0,002). *Teste de Friedman. grupo C: M0>M2, M0>M3 (p=0,004); grupo D: M0>M2, M0>M3 (p<0,001); grupo S: M0>M3 (p=0,04); grupo SD: M0>M1, M0>M3 (p=0,006).

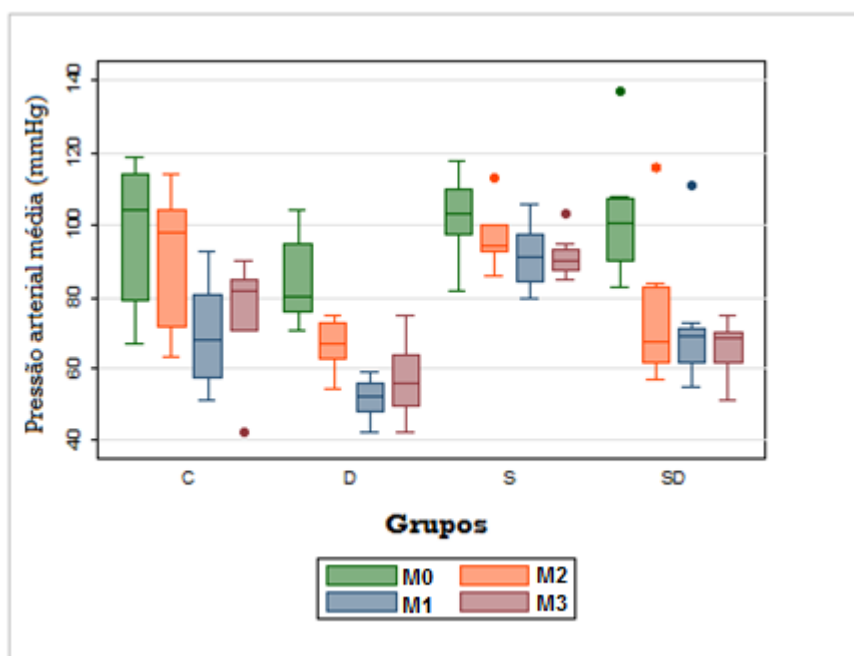


FIGURA 12 – Pressão arterial média por grupos e momentos.

As linhas da caixa representam mediana e percentis (linha superior e inferior). C – controle; D – Dexmedetomidina; S – Sham; SD – Sham com dexmedetomidina.

Comentários: comparando-se os grupos, observa-se que não houve diferença de PAM em M0 entre os grupos e que nos momentos seguintes houve queda da PAM em todos os grupos, porém mais acentuada nos grupos D e SD, embora sem significância estatística em alguns momentos. Já na comparação entre os momentos, em todos os grupos a PAM de M3 foi menor que em M0 com significância estatística.

5.5 Temperatura

TABELA 7 - Valores de mediana e percentis (25-75%) da temperatura (T) (°C), segundo grupos e momentos

Grupos	Momentos				p
	M0 [#]	M1 [#]	M2 [#]	M3 [#]	
C*	37,05(36,17-37,52)	37,35(36,32-38,02)	36,75(36,42-36,87)	36,55(36,32-37,55)	0,50
D*	36,45(36,22-37,8)	37,55(36,72-38,1)	37,45(36,7-38,07)	37,8(36,5-38,17)	0,15
S*	37,4(36,22-37,87)	37,85(37,35-38,35)	37,85(37,15-38,25)	37,8(37,5-38)	0,14
SD*	37,1(35,8-37,57)	38,3(37,4-38,5)	38,15(36,97-38,10)	37,5(36,87-37,87)	0,005
p	0,90	0,18	0,13	0,11	

#Análise de variância de Kruskal-Wallis – pós-teste de Dunn. Mediana (percentis 25-75%). *Teste de Friedman. Grupo SD: M0<M1, M0<M2 (p=0,005).

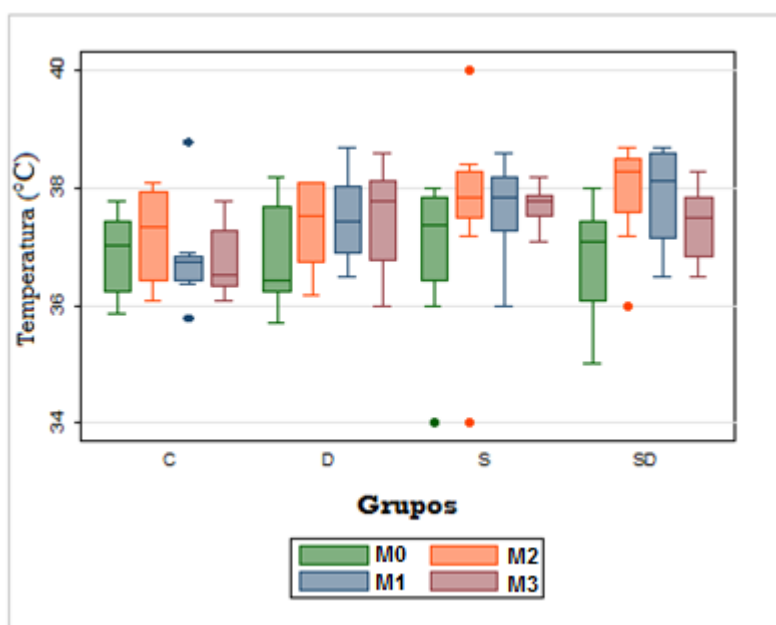


FIGURA 13 - Temperatura (°C) segundo grupos e momentos.

As linhas da caixa representam mediana e percentis (linha superior e inferior). C – controle; D – Dexmedetomidina; S – Sham; SD – Sham com dexmedetomidina.

Comentários: não houve diferença estatística significativa na comparação entre os grupos. Entre os momentos, houve diferença apenas no grupo SD, onde M0 foi menor que M1 e M2 com significância estatística, porém não abaixo dos valores fisiológicos de temperatura.

5.6 Frequência cardíaca

TABELA 8 - Valores de mediana e percentis da frequência cardíaca (FC) (bpm) segundo grupos e momentos

Grupos	Momentos				p
	M0 [#]	M1 [#]	M2 [#]	M3 [#]	
C*	250(250-250)	250(250-250)	250(250-250)	250(250-250)	0,95
D*	250(250-250)	250(237-250)	227(216-247,5)	238(223-250)	0,07
S*	250(242,5-250)	250(250-250)	250(250-250)	250(250-250)	0,82
SD*	250(250-250)	250(235,5-250)	250(234-250)	245(224-250)	0,36
p	0,26	0,69	0,005	0,03	

#Análise de variância de Kruskal-Wallis – pós-teste de Dunn. Mediana (percentis 25-75%). M2: D<S (p=0,005); M3: D<S (p=0,03). *Teste de Friedman.

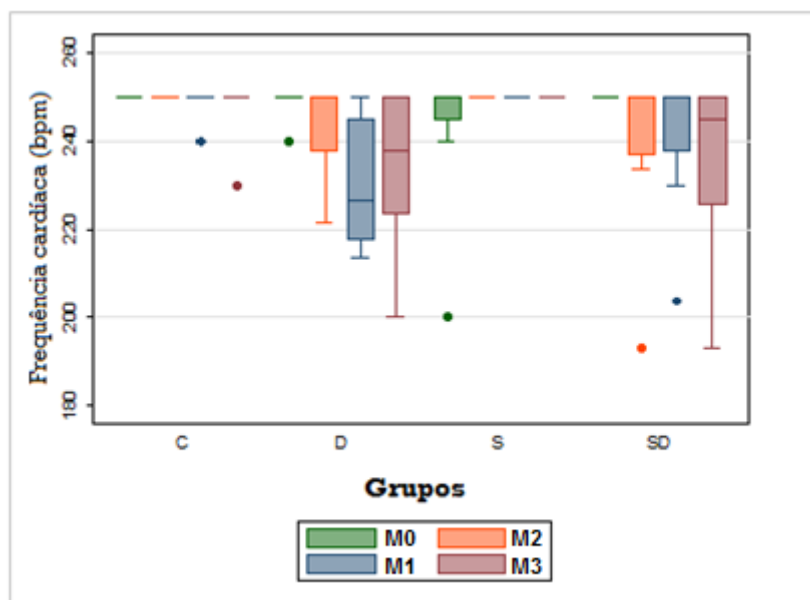


FIGURA 14 - Frequência cardíaca (bpm) segundo grupos e momentos.

As linhas da caixa representam mediana e percentis (linha superior e inferior). C – controle; D – Dexmedetomidina; S – Sham; SD – Sham com dexmedetomidina.

Comentários: na comparação entre os grupos, houve queda da FC apenas em M3 e M4 do grupo D em relação ao grupo S. Na comparação entre os momentos, não houve diferença com significância estatística.

5.7 NGAL

TABELA 9 - Valores de mediana e percentis de lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos (NGAL) (ng/mL) segundo grupos e momentos

Grupos	Momentos				p
	M1 [#]	M2 [#]	M3 [#]	M4 [#]	
C*	10,81(5,42-11,70)	12,71(10,66-15,38)	14,87(11,76-16,37)	400(372,16-400)	0,005
D*	48,81(38,42-61,91)	81,48(43,80-94,10)	60,05(43,70-87,85)	398,32(381,43-398,47)	0,001
S*	5,10(0,00-15,34)	5,98(00-15,64)	0,00(00-7,72)	162,69(135,84-169,72)	0,001
SD*	29,39(0-68,40)	29,32(8,19-71,50)	31,55(11,86-58,62)	167,28(165,53-173,41)	0,007
p	0,26	0,69	0,005	0,03	

#Análise de variância de Kruskal-Wallis – pós- teste de Dunn. Mediana (percentis 25-75%). M3: D>S (p=0,005); M4: C>SD, C>S, D>S (p=0,03). *Teste de Friedman – grupo C: M1<M4 (p=0,005); grupo D: M1<M4, M2<M4 (p=0,001); grupo S: M1<M4, M3<M4 (p=0,001); grupo SD: M1<M4 (p=0,007).

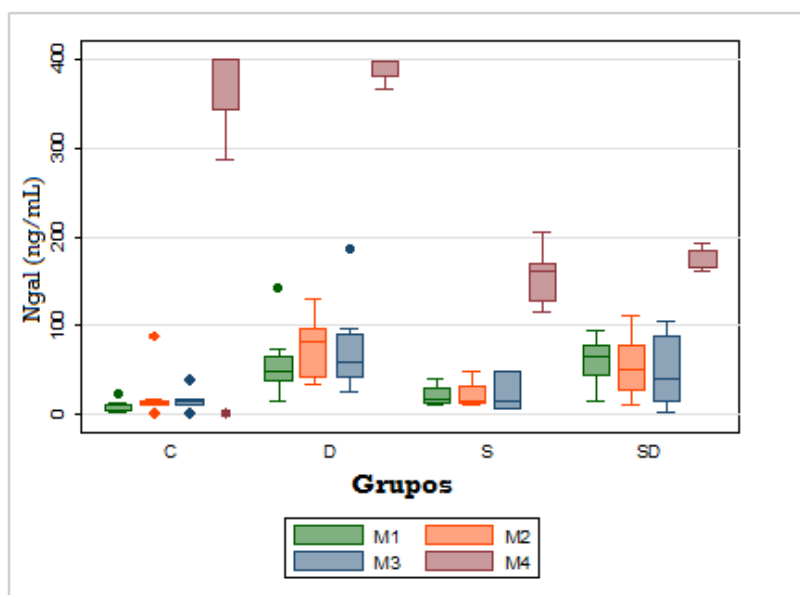


FIGURA 15 - Lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos (NGAL) (ng/ml) segundo grupos e momentos

As linhas da caixa representam mediana e percentis (linha superior e inferior). C – controle; D – Dexmedetomidina; S – Sham; SD – Sham com dexmedetomidina.

Comentários: não houve diferenças entre os grupos em M1 e M2. Em M3, o grupo D foi maior que grupo S e no M4 o grupo C foi maior que SD e S e o grupo D foi maior que grupo S. Comparando-se os momentos, M1 foi menor que M4 em todos os grupos. Nota-se que não houve diferença do NGAL em M4 nos grupos C e D e, ainda, que os grupos C e D foram maiores que S e SD neste momento.

5.8 Interleucina 1 α (IL-1 α)

TABELA 10 - Valores de mediana e percentis de interleucina 1 α (IL-1 α) (pg/mL) segundo grupos e momentos

Grupos	Momentos		p
	M1 [#]	M4 [#]	
C [#]	44,25(35,12-64,62)	49,25(30,25-91)	0,67
D [#]	51,75(28,87-69,12)	62 (42,12-88)	0,07
S [#]	78(44-131)	51(32-71)	0,20
SD [#]	151(82,75-239,25)	90(49-271)	0,75
p	0,009	0,36	

#Análise de variância de Kruskal-Wallis – pós-teste de Dunn. Mediana (percentis 25-75%). M1: C<SD, D<SD (p=0,009); *#Teste de Wilcoxon.

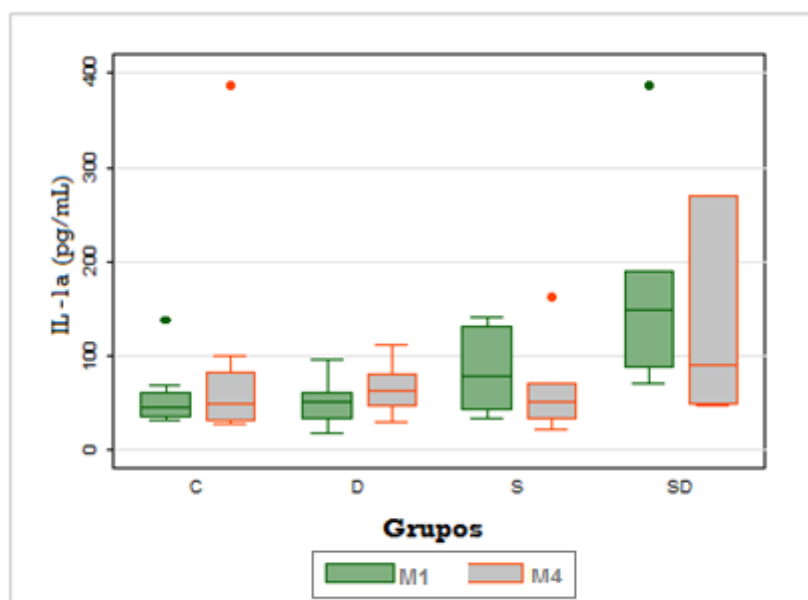


Figura 16 – Interleucina 1 α (IL-1 α) (pg/mL) segundo grupos e momentos.

As linhas da caixa representam mediana e percentis (linha superior e inferior). C – controle; D – Dexmedetomidina; S – Sham; SD – Sham com dexmedetomidina.

Comentários: no momento M1, os níveis de IL-1 α do grupo SD eram superiores aos dos grupos C e D, com significância estatística. Em M4 não havia diferença estatisticamente significativa entre os níveis de IL-1 α entre os grupos.

5.9 Interleucina 1 β (IL-1 β)

TABELA 11 - Valores de mediana e percentis de interleucina 1 β (IL-1 β) (pg/mL) segundo grupos e momentos

Grupos	Momentos		p
	M1 [#]	M4 [#]	
C ^{*#}	75(51,5-96,5)	109(80,87-119,12)	0,04
D ^{*#}	78(44,12-142,87)	114(86,75-164,25)	0,29
S ^{*#}	82(63-89)	76(67,5-88)	0,86
SD ^{*#}	100,25(67,25-278)	95(90-143)	0,24
p	0,54	0,12	

#Análise de variância de Kruskal-Wallis – pós-teste de Dunn. Mediana (percentis 25-75). *#Teste de Wilcoxon

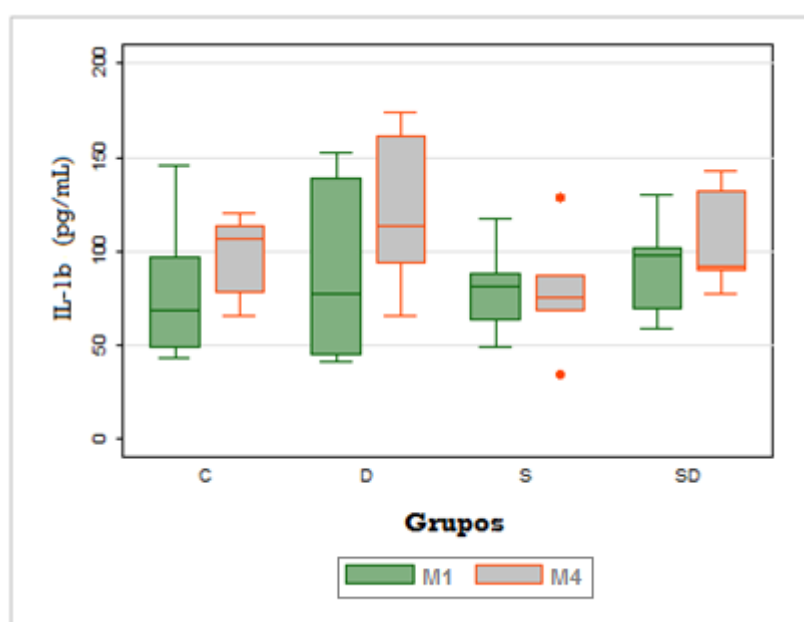


FIGURA 17 – Interleucina 1 β (IL-1 β) segundo grupos e momentos.

As linhas da caixa representam mediana e percentis (linha superior e inferior). C – controle; D – Dexmedetomidina; S – Sham; SD – Sham com dexmedetomidina.

Comentários: as dosagens de IL-1 β nos grupos nos diferentes momentos não apresentaram diferenças com significância estatística.

5.10 Interleucina 6 (IL-6)

TABELA 12 - Valores de mediana e percentis (25-75%) de interleucina 6 (IL-6) (pg/mL) segundo grupos e momentos

Grupos	Momentos		p
	M1 [#]	M4 [#]	
C ^{*#}	41,5(31-160,25)	35(27,62-62)	0,67
D ^{*#}	41(24,75-62)	47,5(28,6-109,6)	0,07
S ^{*#}	103(80-125)	58(27-64,5)	0,20
SD ^{*#}	173,75(103,62-262,12)	102(48-178)	0,75
p	0,03	0,27	

#Análise de variância de Kruskal-Wallis – pós-teste de Dunn. Mediana (percentis 25-75%). M1: D<SD (p=0,03).

*#Teste de Wilcoxon.

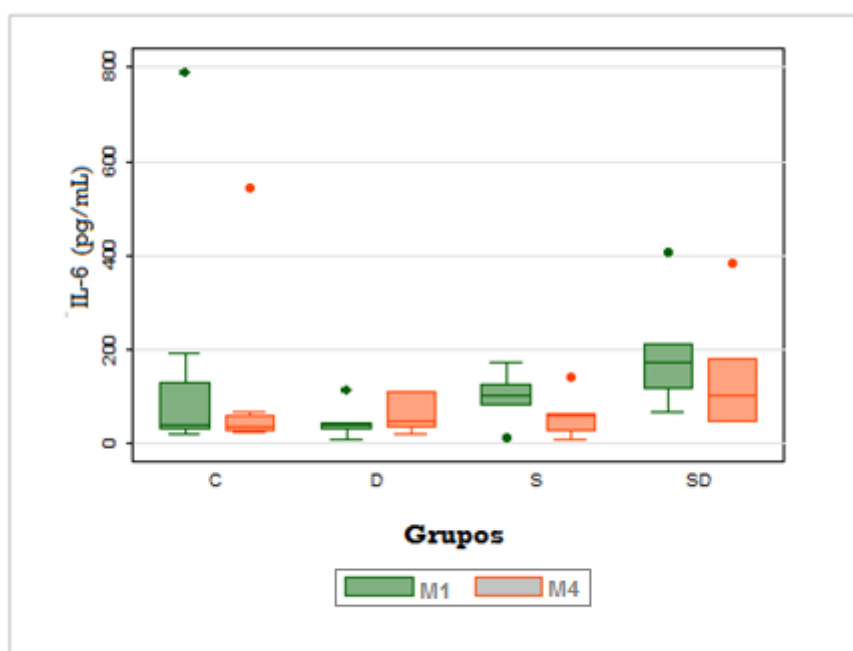


FIGURA 18 - Interleucina 6 (IL-6) segundo grupos e momentos.

As linhas da caixa representam mediana e percentis (linha superior e inferior). C – controle; D – Dexmedetomidina; S – Sham; SD – Sham com dexmedetomidina.

Comentários: no momento M1, os valores de IL-6 do grupo SD eram superiores aos do grupo D com significância estatística. Em M4, não houve diferença entre os grupos.

5.11 Interleucina 10 (IL-10)

TABELA 13 - Valores de mediana e percentis de interleucina 10 (IL-10) (pg/mL) segundo grupos e momentos

Grupos	Momentos		p
	M1 [#]	M4 [#]	
C [#]	42,75(30,37-69,5)	27,75(20,5-46,87)	0,26
D [#]	37,75(21,62-66,75)	49(27-96,5)	0,34
S [#]	90(20-109)	54(22-64)	0,17
SD [#]	188(124,25-304,12)	89,5(51-170)	0,24
p	0,01	0,06	

#Análise de variância de Kruskal-Wallis – pós-teste de Dunn. Mediana (percentis 25-75%). M1: C<SD, D<SD (p=0,01); *#Teste de Wilcoxon

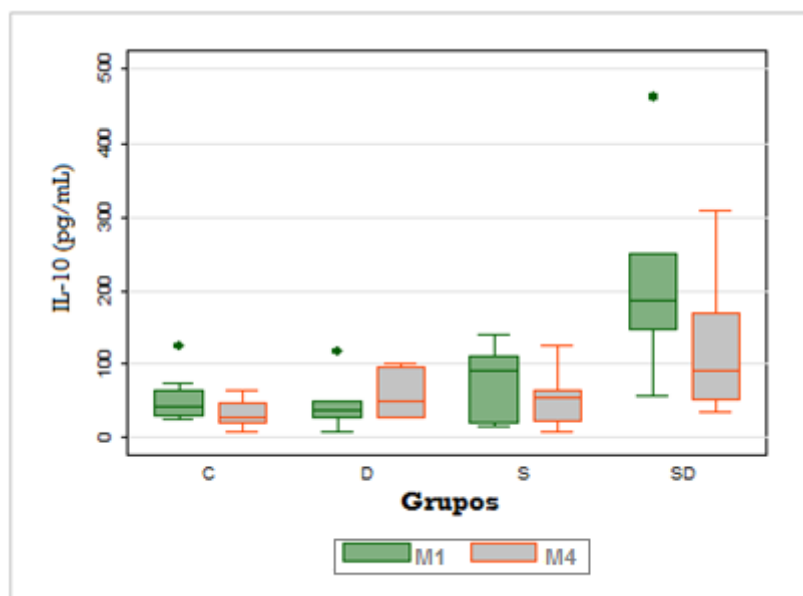


FIGURA 19 - Interleucina 10 (IL-10) segundo grupos e momentos.

As linhas da caixa representam mediana e percentis (linha superior e inferior). C – controle; D – Dexmedetomidina; S – Sham; SD – Sham com dexmedetomidina.

Comentários: ao analisar os dados de dosagens de IL-10 observa-se que em M1 os níveis desta interleucina no grupo SD eram superiores aos dos grupos C e D com significância estatística. Ao final do experimento, em M4, não houve diferenças nos níveis plasmáticos de IL-10 entre os grupos.

5.12 Fator de necrose tumoral α (TNF- α)

TABELA 14 - Valores de mediana e percentis de fator de necrose tumoral α (TNF- α) (pg/mL) segundo grupos e momentos

Grupos	Momentos		p
	M1 [#]	M4 [#]	
C ^{*#}	37(21,75-90,25)	22,75(16,75-39,12)	0,26
D ^{*#}	31,25(19,87-43,37)	36,5(26-56,62)	0,09
S ^{*#}	60,5(13-92)	30,5(12-39)	0,17
SD ^{*#}	131(69-165)	80(31,62-150,25)	0,34
p	0,07	0,04	

#Análise de variância de Kruskal-Wallis – pós-teste de Dunn. Mediana (percentis 25-75%). *#Teste Wilcoxon–M4: C<SD (p=0,04).

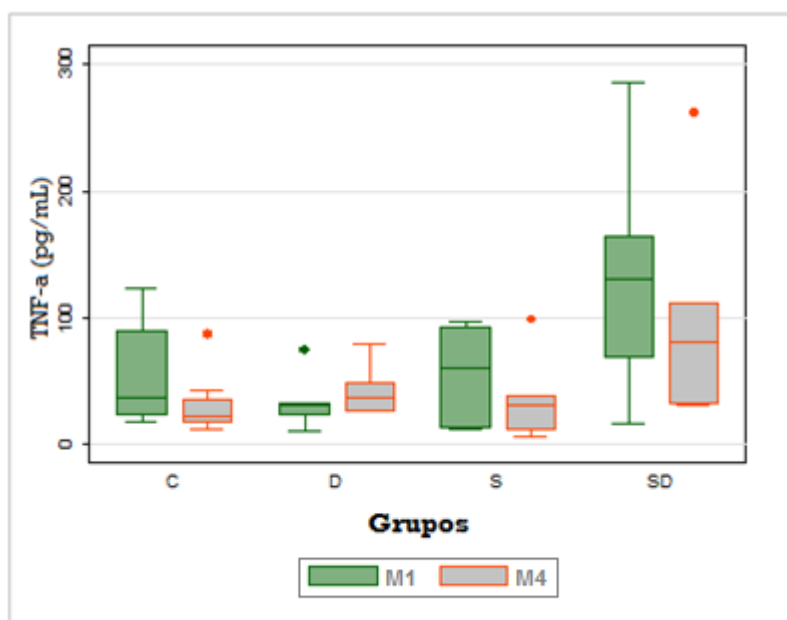


FIGURA 20 - Fator de necrose tumoral α (TNF- α) segundo grupos e momentos.

As linhas da caixa representam mediana e percentis (linha superior e inferior). C– controle; D– Dexmedetomidina; S– Sham; SD– Sham com dexmedetomidina.

Comentários: com relação aos níveis plasmáticos de TNF- α , em M1 não havia diferenças significativas entre os grupos. Em M4, houve redução desta interleucina, em números absolutos, em todos os grupos, porém sem significância estatística. No grupo SD, houve redução e, neste momento os níveis foram menores que os do grupo C, com significância estatística.

5.13 Histologia renal

TABELA 15 - Histologia renal segundo escore de necrose tubular segundo Park et al. Segundo grupos

Grupos	Rim		p
	Esquerdo (RE) [#]	Direito(RD) [#]	
C**	3(2-3,75)	0(0-0)	0,004
D**	3(1-3,75)	0(0-0)	0,002
S**	0(0-0)	0(0-0)	-
SD**	0(0-0)	0(0-0)	-
p	0,0001	0,39	

C – controle; D – dexmedetomidina; S – sham; SD – Sham com dexmedetomidina. [#]Análise de variância de Kruskal-Wallis – pós teste de Dunn. Mediana (percentis 25-75%). RE: C>S, C>SD, D>S, S>SD (p=0,0001). **Teste de Mann-Whitney – grupo C: RE>RD (p=0,004); grupo D: RE>RD.

Comentários: todos os animais apresentaram escore 0 para classificação histológica para necrose tubular aguda dos rins direitos. Os rins esquerdos dos animais dos grupos S e SD não sofreram processo de isquemia e reperfusão e também apresentaram escore 0 (sem lesão). Os rins esquerdos dos animais do grupo C e D apresentaram lesão de moderada a grave, sem diferença com significância estatística entre elas.

6 DISCUSSÃO

Neste experimento utilizou-se o modelo de isquemia e reperfusão renal em ratos, desenvolvido no Laboratório experimental do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu. Foi realizada nefrectomia direita para que não houvesse compensação renal contralateral. A isquemia transitória no rim direito foi realizada com *clamp* atraumático para evitar lesão da artéria renal e garantir reperfusão do órgão

Existe relato de que há atenuação da doença e facilitação da recuperação com a realização da nefrectomia prévia contralateral⁶⁶.

A produção de fatores humorais, que estimulam o crescimento das células renais, aumenta, seguindo a nefrectomia prévia e acelera o reparo das mesmas. A atividade da renina plasmática e o conteúdo da renina no rim pós-isquêmico aumentam significativamente em ratos não nefrectomizados. Os fatores responsáveis pela vasoconstrição renal (tromboxano A2, endotelina, etc.) parecem estar em maior concentração nos ratos não nefrectomizados⁶⁷.

Em outro estudo, não houve diferenças entre os rins pré-condicionados por isquemia ou não, em animais que não sofreram nefrectomia unilateral⁶⁸. No presente estudo, foi realizada a nefrectomia direita para que não houvesse interferência sobre o resultado do rim esquerdo, submetido à isquemia

Os animais eram todos adultos, foram alocados aleatoriamente em quatro grupos distintos e não houve diferença significativa de peso entre os grupos (Tabela 3, Figura 9).

Existe importante efeito da temperatura sobre a gravidade da lesão de isquemia-reperfusão⁶⁹. Na ausência de isquemia renal a hipertermia não tem efeito sobre a função e morfologia renais ou sobre os estoques renais de fosfato de alta energia, mas quando há instalação de isquemia, a hipertermia exerce efeitos deletérios.⁷⁰ Neste experimento, ratos em normo, hipo e hipertermia, foram submetidos à isquemia renal total de 25-40 minutos. Com 25 minutos de isquemia, a lesão isquêmica nos ratos normotérmicos regrediu após 24-48 horas da interrupção do fluxo sanguíneo. Em ratos hipertérmicos

(temperatura maior que 38°C) 25 minutos de isquemia causaram lesão renal intensa e nos hipotérmicos (32-35°C) a lesão foi branda e de rápida recuperação. Outros autores comprovaram a interferência da temperatura sobre a gravidade da lesão de isquemia.⁶⁹

A temperatura corporal dos animais sofreu diversas influências durante o experimento. Administraram-se soluções parenterais à temperatura ambiente, houve abertura da cavidade abdominal e não houve controle sobre ventilação com reinalação e aquecimento dos gases. Isso faz com que ocorra perda de calor. A manutenção da temperatura foi realizada com a colocação de mantas térmicas sob e sobre os animais e a temperatura retal foi monitorizada. Não se observou diferenças de temperatura entre os grupos. No entanto, para o Grupo SD no momento M0, a temperatura foi mais baixa que em M1 e M2 ($p=0,005$), mas não se observou diferenças deste grupo com relação à função renal ou histologia. No entanto, em todos os momentos a temperatura corporal esteve dentro da faixa de normotermia e, desta forma, consideramos que não houve influência da temperatura sobre os resultados do experimento (Tabela 7, Figura 13).

A pressão arterial exerce papel determinante na perfusão renal. Observou-se que o grupo D a PAS foi menor em comparação aos grupos S e C ($P<0,001$). No grupo SD os valores também se reduziram, porém sem significância estatística. Nestes dois grupos, D e SD, a PAS também foi menor nos momentos M2 e M3 em relação ao M0 ($p<0,01$) (Tabela 4, Figura 10). Houve também redução da PAD no grupo D em comparação ao grupo S ($p<0,002$). Isso foi atribuído ao uso de dexmedetomidina, que exerce potente efeito sobre receptor α_2 , levando à redução do débito cardíaco, vasodilatação e consequente redução da PA^{48} (Tabela 5, Figura 11). Com relação à PAM, observou-se uma redução dos valores em todos os grupos, a partir do momento 0, principalmente no momento 3, em que todos os grupos tiveram diminuição com significância estatística. Comparando-se a PAM entre os grupos, observa-se que nos vários momentos a PAM foi menor nos grupos D e SD, grupos que receberam tratamento com dexmedetomidina. No entanto, analisando-se cautelosamente os dados, com exceção dos momentos M2 e M3 do grupo D, todos os valores se mantiveram dentro dos parâmetros de

autorregulação de perfusão renal. Este fenômeno mantém constante a perfusão do órgão quando em valores de PAM entre 60mmHg e 180mmHg. Entre os grupos citados, a PAM não esteve abaixo do valor 60mmHg e, desta forma, não haveria influência da PA sobre os resultados observados. Já no grupo D, houve momentos de diminuição da PAM a níveis discretamente abaixo da curva de autorregulação renal, durante período de clampeamento da artéria renal e logo após, durante a reperusão do órgão. Embora os valores obtidos estejam discretamente abaixo de 60mmHg, isto poderia levar a um período de hipoperfusão renal, prolongando o período de isquemia. No entanto, a análise dos resultados mostra que este grupo não apresentou resultados piores que os demais grupos e, portanto, esta diminuição da PAM não teve influência sobre o resultado final (Tabela 6, Figura 12).

Com relação à frequência cardíaca, observou-se somente que no grupo D era menor que grupo S nos momentos M2 e M3 e foram atribuídas ao uso da dexmedetomidina. Talvez alterações maiores da FC não puderam ser avaliadas pois há limitação do método de mensuração da FC. O monitor utilizado tem como limite superior $FC=250\text{bpm}$ e os níveis normais de frequência cardíaca do rato são superiores a este. Acreditamos que a queda da FC não tenha nenhuma influência sobre o resultado do experimento, visto que não se traduziu em alterações hemodinâmicas importantes, sem alterar de forma significativa a perfusão renal, conforme foi discutido anteriormente (Tabela 8, Figura 14).

Estudamos os efeitos da dexmedetomidina sobre os rins submetidos à isquemia e reperusão em ratos, por meio da determinação plasmática do biomarcador lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos (NGAL), pela análise histológica dos rins e a resposta inflamatória sistêmica pela dosagem de interleucinas.

Os resultados obtidos neste experimento envolvem diversos mecanismos no estabelecimento da lesão renal, sua manutenção e recuperação. Vários fatores interferem diretamente nos resultados como a própria manobra de isquemia e reperusão, a administração da dexmedetomidina e o anestésico volátil utilizado.

A proteção renal com anestésicos voláteis já foi demonstrada. Em concentrações utilizadas na prática médica, os anestésicos halogenados sevoflurano, desflurano, isoflurano e halotano quando administrados antes e após a isquemia renal, protegem o rim deste tipo de lesão, reduzindo a ocorrência de necrose tubular aguda⁷¹. Além disso, a administração de sevoflurano em duas vezes a concentração alveolar média por 10 minutos antes do “by-pass” cardiopulmonar causou melhora da taxa de filtração glomerular determinada pela cistatina C⁷². Neste experimento utilizou-se o isoflurano em todos os grupos e sua influência foi homogênea e não interferiu nos resultados.

A dexmedetomidina é um fármaco que exerce potente efeito agonista sobre o receptor α_2 adrenérgico. O efeito protetor da dexmedetomidina contra lesão de isquemia e reperfusão já foi estudado e estabelecido em coração⁵⁰ e cérebro^{51,52} de ratos. No rim, há proteção contra lesão renal induzida por radiocontraste com uso de agonistas do receptor α_2 adrenérgico⁵⁴ e existe relato de melhora da função renal com uso desta droga em ratos submetidos à hemorragia aguda⁵⁵. Um estudo sobre alterações histológicas após isquemia e reperfusão em ratos demonstrou que o uso de dexmedetomidina se relacionou com glomérulos normais e edema discreto de células tubulares renais, indicando que esta droga pode reduzir a lesão renal neste cenário⁵⁶. Outro estudo demonstrou significativa redução nos níveis plasmáticos de creatinina e ureia em ratos submetidos à lesão renal de isquemia e reperfusão⁵⁷.

A NGAL é uma medida do estresse tubular e a maior parte da NGAL é sintetizada nos rins (néfron distal) em resposta à lesão renal sendo secretado na urina. É também sintetizada sistemicamente em resposta à lesão renal, filtrada pelos glomérulos, reabsorvida pelo epitélio do túbulo proximal e pouco secretada na urina.

Em nosso experimento, os níveis plasmáticos de NGAL foram superiores em M4 no grupo C em relação aos grupos S e SD e o grupo D foi maior que grupo S. Não houve diferença entre os grupos C e D e nem entre os grupos S e SD (Tabela 9, Figura 15). Isto demonstra que o uso da dexmedetomidina não teve efeito protetor sobre a função renal do rato neste modelo de isquemia e

reperfusão. Na literatura observamos que os trabalhos relacionando dexmedetomidina e lesão de isquemia e reperfusão renal são bastante heterogêneos. Os estudos utilizaram dexmedetomidina de formas diferentes, por via peritoneal ou intravenosa e em doses que variaram de 100µg/kg a 25µg/kg pela forma intraperitoneal e 1µg/kg em *bolus* intravenoso em 10min, seguido de infusão contínua de 1µg/kg/h. Quando utilizado na forma intraperitoneal nas doses descritas, houve redução da lesão^{56,57}. No trabalho em que foi utilizada a forma venosa em infusão contínua, não foi observada tal proteção¹⁴. Em nosso experimento utilizamos a via intravenosa em dose de 3µg/kg em *bolus* em 10min seguido de infusão contínua de 3µg/kg/h. Questionamos a possibilidade de influência da dose total administrada ou da via de administração sobre os resultados observados.

O tipo mais comum de insuficiência renal aguda é a necrose tubular aguda, que se caracteriza por diminuição da função renal, mas nem sempre acompanhada de lesão morfológica evidente¹⁶. No presente estudo, a avaliação histológica buscou evidências de NTA e revelou ausência de lesão nos rins direitos de todos os animais, demonstrando que este serviu como controle para a análise do rim contralateral, garantindo a confiabilidade do experimento. Os rins esquerdos dos grupos SD e S também não apresentaram nenhum grau de lesão à avaliação histológica. Já os grupos C e D apresentaram graus de lesão semelhantes, com 25 a 50% de necrose, caracterizando lesão de moderada a grave, segundo Park et al.⁶⁵ e demonstrando que o uso de dexmedetomidina não teve efeito protetor sobre a lesão de isquemia e reperfusão. Tal achado confirma os resultados encontrados na análise da NGAL plasmática, onde o uso da dexmedetomidina também não teve qualquer efeito protetor.

Ao analisar os efeitos da inflamação sobre o processo de isquemia e reperfusão, optamos por determinar os valores de citocinas inflamatórias que se relacionam a este processo. Foram analisadas IL-1α, IL-1β, IL-6 e TNF-α, além da IL-10 que modula inflação.

Patel et al. (2005) demonstraram que a IL-6 piora a lesão, amplifica a resposta inflamatória e piora a função renal causada pelo processo de

isquemia e reperfusão¹⁷, além de induzir produção de outras citocinas em células endoteliais. Em nosso experimento observou-se que em M1 o nível de IL-6 estava aumentado no grupo SD em relação aos demais grupos ($p=0,03$) e que no momento 4, após a isquemia e reperfusão renal, o nível desta interleucina se aproximou dos valores dos outros grupos, não havendo diferenças entre eles ($p=0,27$). Entre os grupos, não foram observadas diferenças no nível plasmático de IL-6 (Tabela 12, Figura 18).

As interleucinas IL-1 α e IL-1 β induzem a liberação de outras citocinas incluindo IL-6, TNF- α , INF- δ , IL-8 e a própria IL-1, entre outros, induzindo infiltração tecidual¹⁸. Dannahoo et al. (1999) fizeram uma revisão bibliográfica demonstrando a relação do TNF- α com a lesão de isquemia e reperfusão, tanto no início do processo quanto em sua manutenção²¹. Neste experimento optamos pela dosagem destas citocinas comprovadamente relacionadas à lesão de isquemia e reperfusão. Em nosso estudo, analisando os dados da dosagem da IL-1 α , observou-se que no momento inicial (M1), os valores encontravam-se elevados no grupo SD em relação aos demais grupos. No entanto, após o processo de isquemia e reperfusão estes valores se aproximaram dos demais grupos, sendo que em M4 não houve diferença estatística significativa entre estes 4 grupos. Os dados de IL-1 β foram semelhantes e não houve diferenças entre os grupos, nem entre os momentos analisados. Neste estudo, portanto, o uso da dexmedetomidina não interferiu nos níveis de IL-1 α ou IL-1 β .

A interleucina 10 tem relação estabelecida com a atenuação do processo inflamatório. Jung et al. (2012)¹⁹ demonstraram que o tratamento de tecidos isquêmicos com IL-10 leva à localização do processo inflamatório ao tecido lesado, aumento de marcadores de regeneração e redução dos níveis de ureia e creatinina. Em nosso experimento os valores de IL-10 também eram superiores em M1 no grupo SD em relação aos demais grupos ($p=0,01$) e se normalizaram em M4. Não houve diferença entre os momentos (Tabela 13, Figura 19).

Com relação ao TNF- α , não houve diferenças entre os grupos no momento M1. Esta é uma citocina com potente efeito pró-inflamatório e que

tem importante papel na gênese do processo inflamatório e lesão renal, além da indução de apoptose. Em M4, houve redução desta interleucina em todos os grupos, porém sem significância estatística quando comparada a M1. No entanto, no grupo SD, neste momento, os valores foram maiores que os do grupo C, com significância estatística. Acreditamos que o uso da dexmedetomidina não seja responsável por este efeito, visto que ele ocorreu em todos os grupos, talvez de forma menos pronunciada neste (Tabela 14, Figura 20).

O grupo SD apresentou valores elevados no momento inicial (M1) de citocinas pró-inflamatórias IL-1 α , IL-6 e TNF- α com diferença estatística significativa, além de dosagem aumentada de IL-10, citocina moduladora da inflamação. No entanto, não se observou diferenças nos resultados observados. A dosagem de NGAL deste grupo não apresentou diferença significativa em relação à do grupo S, grupo que também não foi submetido à isquemia e reperfusão. Além disso, a histologia dos rins direitos, retirados no início do procedimento, não demonstraram lesão. Ao final do experimento, a histologia renal esquerda também não apresentava lesão, e não houve diferenças em relação ao grupo S. Portanto, este aparente estado inicial de inflamação do grupo SD, demonstrado por níveis iniciais elevados de interleucinas pró-inflamatórias, parece não ter significado sobre o resultado final observado.

7 CONCLUSÃO

Em nosso experimento, a utilização de dexmedetomidina não se relacionou à proteção renal contra lesão de isquemia e reperfusão em ratos, analisados pela histologia renal, dosagens plasmáticas da NGAL e das interleucinas.

8 REFERÊNCIAS

1. Nguyen MT, Devarajan P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Pediatr Nephrol* 2008;23:2151-7.
2. Kellum JA, Levin N, Bouman C, Lameire N. Developing a consensus classification system for acute renal failure. *Curr Opin Crit Care* 2002;8:509-14.
3. Kellum JA, Bellomo R, Ronco C. Definition and classification of acute kidney injury. *Nephron Clin Pract* 2008;109:c182-7.
4. Ricci Z, Cruz D, Ronco C. The RIFLE criteria and mortality in acute kidney injury: A systematic review. *Kidney international* 2008;73:538-46.
5. Himmelfarb J, Ikizler TA. Acute kidney injury: changing lexicography, definitions, and epidemiology. *Kidney international* 2007;71:971-6.
6. Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure. *Lancet* 2005;365:417-30.
7. Mahon P, Shorten G. Perioperative acute renal failure. *Curr Opin Anaesthesiol* 2006;19:332-8.
8. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *The Journal of clinical investigation* 2011;121:4210-21.
9. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 2001;94:1133-8.
10. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000;190:255-66.
11. Shihab FS. Preconditioning: from experimental findings to novel therapies in acute kidney injury. *Minerva Urol Nefrol* 2009;61:143-57.
12. Sheridan AM, Bonventre JV. Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000;9:427-34.
13. Bonventre JV. Kidney ischemic preconditioning. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002;11:43-8.
14. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-36.
15. Baxter GF, Yellon DM. Ischaemic preconditioning of myocardium: a new paradigm for clinical cardioprotection? *Br J Clin Pharmacol* 1994;38:381-7.

16. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *The Journal of clinical investigation* 2004;114:5-14.
17. Patel NS, Chatterjee PK, Di Paola R, et al. Endogenous interleukin-6 enhances the renal injury, dysfunction, and inflammation caused by ischemia/reperfusion. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2005;312:1170-8.
18. Furuichi K, Wada T, Iwata Y, et al. Interleukin-1-dependent sequential chemokine expression and inflammatory cell infiltration in ischemia-reperfusion injury. *Critical care medicine* 2006;34:2447-55.
19. Jung M, Sola A, Hughes J, et al. Infusion of IL-10-expressing cells protects against renal ischemia through induction of lipocalin-2. *Kidney international* 2012;81:969-82.
20. Godet C, Goujon JM, Petit I, et al. Endotoxin tolerance enhances interleukin-10 renal expression and decreases ischemia-reperfusion renal injury in rats. *Shock* 2006;25:384-8.
21. Donnhoo KK, Shames BD, Harken AH, Meldrum DR. Review article: the role of tumor necrosis factor in renal ischemia-reperfusion injury. *The Journal of urology* 1999;162:196-203.
22. Faubel S, Lewis EC, Reznikov L, et al. Cisplatin-induced acute renal failure is associated with an increase in the cytokines interleukin (IL)-1beta, IL-18, IL-6, and neutrophil infiltration in the kidney. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2007;322:8-15.
23. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* 2004;8:R204-12.
24. Haase M, Haase-Fielitz A, Bellomo R, Mertens PR. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of acute renal disease. *Curr Opin Hematol* 2010.
25. Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. Biomarkers of acute kidney injury. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2008;48:463-93.
26. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* 2005;365:1231-8.
27. Mishra J, Ma Q, Prada A, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2003;14:2534-43.

28. Mori K, Lee HT, Rapoport D, et al. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *The Journal of clinical investigation* 2005;115:610-21.
29. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2009;54:1012-24.
30. Soni SS, Ronco C, Katz N, Cruz DN. Early diagnosis of acute kidney injury: the promise of novel biomarkers. *Blood purification* 2009;28:165-74.
31. Nickolas TL, O'Rourke MJ, Yang J, et al. Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury. *Annals of internal medicine* 2008;148:810-9.
32. Soni SS, Cruz D, Bobek I, et al. NGAL: a biomarker of acute kidney injury and other systemic conditions. *International urology and nephrology* 2010;42:141-50.
33. Dent CL, Ma Q, Dastrala S, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts acute kidney injury, morbidity and mortality after pediatric cardiac surgery: a prospective uncontrolled cohort study. *Crit Care* 2007;11:R127.
34. Bennett M, Dent CL, Ma Q, et al. Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery: a prospective study. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2008;3:665-73.
35. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of kidney disease. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation Supplementum* 2008;241:89-94.
36. Wagener G, Jan M, Kim M, et al. Association between increases in urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery. *Anesthesiology* 2006;105:485-91.
37. Haase-Fielitz A, Bellomo R, Devarajan P, et al. Novel and conventional serum biomarkers predicting acute kidney injury in adult cardiac surgery--a prospective cohort study. *Critical care medicine* 2009;37:553-60.
38. Haase-Fielitz A, Bellomo R, Devarajan P, et al. The predictive performance of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) increases with grade of acute kidney injury. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2009;24:3349-54.
39. Bagshaw SM, George C, Bellomo R. A comparison of the RIFLE and AKIN criteria for acute kidney injury in critically ill patients. *Nephrology, dialysis,*

- transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association 2008;23:1569-74.
40. Cruz DN, de Cal M, Garzotto F, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early biomarker for acute kidney injury in an adult ICU population. *Intensive care medicine* 2010;36:444-51.
 41. Shapiro NI, Trzeciak S, Hollander JE, et al. The diagnostic accuracy of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin in the prediction of acute kidney injury in emergency department patients with suspected sepsis. *Annals of emergency medicine* 2010;56:52-9 e1.
 42. 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 medicine* 2010;36:1333-40.
 43. Harbord RM, Deeks JJ, Egger M, Whiting P, Sterne JA. A unification of models for meta-analysis of diagnostic accuracy studies. *Biostatistics* 2007;8:239-51.
 44. Coursin DB, Maccioli GA. Dexmedetomidine. *Curr Opin Crit Care* 2001;7:221-6.
 45. Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, et al. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacological reviews* 1994;46:121-36.
 46. Brede M, Philipp M, Knaus A, Muthig V, Hein L. alpha2-adrenergic receptor subtypes - novel functions uncovered in gene-targeted mouse models. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 2004;96:343-8.
 47. Docherty JR. Subtypes of functional alpha1- and alpha2-adrenoceptors. *European journal of pharmacology* 1998;361:1-15.
 48. Ebert TJ, Hall JE, Barney JA, Uhrich TD, Colino MD. The effects of increasing plasma concentrations of dexmedetomidine in humans. *Anesthesiology* 2000;93:382-94.
 49. Ramsay MA, Luteran DL. Dexmedetomidine as a total intravenous anesthetic agent. *Anesthesiology* 2004;101:787-90.
 50. Okada H, Kurita T, Mochizuki T, Morita K, Sato S. The cardioprotective effect of dexmedetomidine on global ischaemia in isolated rat hearts. *Resuscitation* 2007;74:538-45.
 51. Sato K, Kimura T, Nishikawa T, Tobe Y, Masaki Y. Neuroprotective effects of a combination of dexmedetomidine and hypothermia after incomplete cerebral ischemia in rats. *Acta Anaesthesiol Scand*;54:377-82.

52. Hoffman WE, Kochs E, Werner C, Thomas C, Albrecht RF. Dexmedetomidine improves neurologic outcome from incomplete ischemia in the rat. Reversal by the alpha 2-adrenergic antagonist atipamezole. *Anesthesiology* 1991;75:328-32.
53. Engelhard K, Werner C, Eberspacher E, et al. The effect of the alpha 2-agonist dexmedetomidine and the N-methyl-D-aspartate antagonist S(+)-ketamine on the expression of apoptosis-regulating proteins after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Anesthesia and analgesia* 2003;96:524-31, table of contents.
54. Billings FTt, Chen SW, Kim M, et al. alpha2-Adrenergic agonists protect against radiocontrast-induced nephropathy in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;295:F741-8.
55. Marangoni MA, Hausch A, Vianna PT, Braz JR, Viero RM, Castiglia YM. Renal function and histology after acute hemorrhage in rats under dexmedetomidine action. *Acta Cir Bras* 2007;22:291-8.
56. Kocoglu H, Ozturk H, Yilmaz F, Gulcu N. Effect of dexmedetomidine on ischemia-reperfusion injury in rat kidney: a histopathologic study. *Ren Fail* 2009;31:70-4.
57. Gu J, Sun P, Zhao H, et al. Dexmedetomidine provides renoprotection against ischemia-reperfusion injury in mice. *Crit Care* 2011;15:R153.
58. Gu J, Chen J, Xia P, Tao G, Zhao H, Ma D. Dexmedetomidine attenuates remote lung injury induced by renal ischemia-reperfusion in mice. *Acta Anaesthesiol Scand* 2011;55:1272-8.
59. Bayram A, Esmaglu A, Akin A, et al. The effects of intraoperative infusion of dexmedetomidine on early renal function after percutaneous nephrolithotomy. *Acta Anaesthesiol Scand* 2011;55:539-44.
60. Wijeyesundera DN, Naik JS, Beattie WS. Alpha-2 adrenergic agonists to prevent perioperative cardiovascular complications: a meta-analysis. *The American journal of medicine* 2003;114:742-52.
61. Frumento RJ, Logginidou HG, Wahlander S, Wagener G, Playford HR, Sladen RN. Dexmedetomidine infusion is associated with enhanced renal function after thoracic surgery. *Journal of clinical anesthesia* 2006;18:422-6.
62. Curtis FG, Vianna PT, Viero RM, et al. Dexmedetomidine and S(+)-ketamine in ischemia and reperfusion injury in the rat kidney. *Acta Cir Bras* 2011;26:202-6.
63. Hiller SC. Monitored Anesthesia Care. In: Barash PG, ed. *Clinical Anesthesia*. 6th ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.

64. FDA. Guidance for Industry - Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. In: Food and Drug Administration; 2005.
65. Park Y, Hirose R, Dang K, et al. Increased severity of renal ischemia-reperfusion injury with venous clamping compared to arterial clamping in a rat model. *Surgery* 2008;143:243-51.
66. Cronin RE, de Torrente A, Miller PD, Bulger RE, Burke TJ, Schrier RW. Pathogenic mechanisms in early norepinephrine-induced acute renal failure: functional and histological correlates of protection. *Kidney international* 1978;14:115-25.
67. Luscher TF, Bock HA, Yang ZH, Diederich D. Endothelium-derived relaxing and contracting factors: perspectives in nephrology. *Kidney international* 1991;39:575-90.
68. Islam CF, Mathie RT, Dinneen MD, Kiely EA, Peters AM, Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney: the effect of preconditioning. *British journal of urology* 1997;79:842-7.
69. 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. *Transplantation proceedings* 2007;39:2983-5.
70. Zager RA, Altschuld R. Body temperature: an important determinant of severity of ischemic renal injury. *The American journal of physiology* 1986;251:F87-93.
71. Lee HT, Ota-Setlik A, Fu Y, Nasr SH, Emala CW. Differential protective effects of volatile anesthetics against renal ischemia-reperfusion injury in vivo. *Anesthesiology* 2004;101:1313-24.
72. Julier K, da Silva R, Garcia C, et al. Preconditioning by sevoflurane decreases biochemical markers for myocardial and renal dysfunction in coronary artery bypass graft surgery: a double-blinded, placebo-controlled, multicenter study. *Anesthesiology* 2003;98:1315-27.

ANEXO 1

NGAL RAPID ELISA KIT (037)

1 Preparação dos Reagentes:

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

Deionizada.

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

Deionizada.

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

HRP-conjugado NGAL - pronto para uso.

TMB Substrato – pronto para uso.

Stop Solution – pronto para uso.

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

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

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

HRP conjugated NGAL antibody em todos os poços.

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

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

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

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

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

Fazer a leitura no máximo em 30 minutos.

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

ANEXO 2

INTERLEUCINAS MULTIPLEX ATRAVÉS DO SISTEMA COM TECNOLOGIA XMAP LUMINEX DA BIORAD

As biotinas marcadas detectam os anticorpos conjugados com a bead (os ensaios usam beads microscópicas que contém determinadas cores no mapa de visualização. As beads possuem concentração de corantes. A streptavidina marca de forma fluorescente esses anticorpos (sistema biotina-streptavidina). A leitura é feita por um sistema parecido com citometria de fluxo. A amostra passa por uma câmera de fluxo e os lasers identificam o analito (passa uma bead por x). O laser verde detecta e quantifica o analito considerado, enquanto que o laser vermelho classifica.

- Reconstituir 500 ul o frasco de standard (preparo: ass 72ul de diluente no frasco S1 e 150ul nos foscos de S2 a S6. Em seguida, transferir 128ul no frasco S1 e tranferir 50ul do S1 para o S2 e sucessivamente até o S6).
- Lavar a placa com 100ul de assay buffer
- Preparar as beads (10X: 575ul beads + 5,175ul buffer). Adicionar 50ul de beads
- Lavar 2 vezes com 100ul de buffer
- Adicionar 50ul de amostras, padrões (standards)
- Incubar a placa por 30 min
- Lavar 3 vezes a placa com 100ul de wash buffer
- Adicionar anticorpos de detecção (300ul de Ab + 2.700 de diluente)
- Incubar a placa por 30 min
- Lavar a placa 3 vezes com 100 ul de wash buffer
- Adicionar 50ul de streptavidina/PE
- Incubar a placa por 15 min
- Lavar a placa 3 vezes
- Ressuspender a placa com 125ul de assay buffer (skaker 1100 rpm por 30 sgundos)
- Ler a placa (a leitura deve ser realizada no queipamento Bioplex - como igual a um citômetro de fluxo: laser verde e vermelho - identificação e quantificação)