

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica**

**AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA VIA DO ÓXIDO NÍTRICO NA
ISQUEMIA E REPERFUSÃO NORMOTÉRMICA RENAL: ESTUDO
EXPERIMENTAL EM RATOS.**

ERNANI LUIS RHODEN

Orientador: Luiz Pereira-Lima

TESE DE DOUTORADO, 2001

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica**

**AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA VIA DO ÓXIDO NÍTRICO NA
ISQUEMIA E REPERFUSÃO NORMOTÉRMICA RENAL: ESTUDO
EXPERIMENTAL EM RATOS.**

Autor: Ernani Lis Rhoden

Orientador: Luiz Pereira-Lima

TESE DE DOUTORADO, 2001

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada para a Biblioteca da Universidade Federal do Rio Grande Sul (UFRGS) e Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Rhoden, Ernani Luis

Avaliação do envolvimento da via do óxido nítrico na isquemia e reperfusão normotérmica renal: estudo experimental em ratos/ Ernani Luis RHODEN. Porto Alegre: HCPA/UFRGS, 2001.
163p. 29,7cm

Tese(Doutorado)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica.

Área de Concentração: Clínica Médica
Orientador: Pereira-Lima, Luiz.

Descritores: 1. Radicais livres do oxigênio 2. Óxido nítrico 3. Isquemia e reperfusão renal 4. Lipoperoxidação.

UFRGS/HCPA

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira-Lima

Professor Titular de Cirurgia Geral da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas De Porto Alegre (FFFCMPA).

Professor Adjunto da Disciplina de Cirurgia Geral da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Doutor Livre-Docente em Cirurgia.

PENSAMENTO

"A maior recompensa por se fazer é a oportunidade de fazer mais"

(Jonas Salk, 1914-1995)

DEDICO ESTE TRABALHO

Aos meus pais, Danilo e Síría, por terem iluminado com amor os meus caminhos e sonhado com aquilo que sou.

A minha Esposa Cláudia e para nossas filhas, Luiza, Fenanda e Camila pelo convívio de carinho e amor sempre presentes.

AGRADECIMENTOS

Ao fim de mais uma jornada de trabalho, que neste caso representa a formação no Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) é necessário agradecer àquelas pessoas, movidas por um objetivo comum, colaboraram para a possibilidade de conclusão desta tese.

Ao Professor Doutor Flávio Dani Fuchs, Coordenador do Curso de Pós-Graduação da Clínica Médica da UFRGS e HCPA, pelo apoio oferecido durante a realização do Curso.

Ao Professor Doutor Cláudio Zettler, do serviço de Patologia da FFFCMPA, pela incansável dedicação no auxílio para as análises histológicas referentes ao presente trabalho.

A Professora Doutora Cláudia Ramos Rhoden, da Disciplina de Farmacologia da FFFCMPA, pela auxílio sempre que solicitado em todas as etapas do estudo.

A Professora Doutora Adriane Klein-Belló, da Disciplina de Fisiologia da UFRGS, pela gentil presteza de ter oferecido o laboratório de fisiologia para a

execução de várias etapas necessárias à concretização desta tese, particularmente no que se refere a determinações da lipoperoxidação celular.

A Professora Doutora Helena Barros, da Disciplina de Farmacologia da FFFCMPA, pela oportunidade oferecida de realizar os experimentos, desta tese, no laboratório da referida disciplina.

Aos Acadêmicos Marcio Lucas, do Curso de graduação em Medicina da FFFCMPA, e Alexandre Maslinkiewicz, do Curso de Farmácia da UFRGS, pela dedicação e auxílio em todas as etapas que se fizeram necessárias para que este trabalho pudesse ter sido concretizado.

A Bioquímica Maria Letícia Vasquez, pela incansável colaboração na determinações bioquímicas no presente trabalho.

Ao Funcionário do Biotério da FFFCMPA, Sr. Serapião Martins Pereira, pela pronta disponibilidade no atendimento às solicitações no que se referiu ao fornecimento, seleção, preparo e cuidados com os animais utilizados neste experimento.

As secretárias Helena, Débora, Luciano e Letícia, Curso de Pós-graduação em Clínica Médica, pela presteza com que sempre receberam as solicitações realizadas durante a realização do curso de mestrado e doutorado.

A todos os colegas do Curso de Pós-Graduação pelo incentivo, tão necessário, dispendido durante as etapas que se fizeram necessárias para a conclusão das atividades desenvolvidas durante Curso.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
2.REVISÃO DA LITERATURA	
2.1 Generalidades e toxicidade do oxigênio	1
2.2 Fontes das Espécies Ativas do Oxigênio	7
2.3 Principais Espécies Ativas do Oxigênio	8
2.4 Sítios de ação das Espécies Ativas do Oxigênio	13
2.5 Sistemas de defesa contra as Espécies Ativas do Oxigênio	14
2.6 Mecanismos envolvidos no dano tecidual decorrente da isquemia e reperfusão e sua relação como fonte de Espécies Ativas do Oxigênio (EAO)	20
2.6.1 Via da Xantina oxidase	32
2.6.2 Via do óxido Nítrico e do ácido Araquidônico	38
2.7 Efeitos de Substâncias farmacológicas no controle e efeitos das Espécies Ativas do Oxigênio.	50
2.8 Efeito da isquemia e reperfusão na injúria renal	55
3.0 OBJETIVO	102
4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
5.0 TRABALHOS ENVIADOS PRA PUBLICAÇÃO	120
5.1 Trabalho 1	121
5.2 Trabalho 2	165

5.3 Trabalho 3	207
6.0 ANEXOS	255

A isquemia-reperfusão renal é um fenômeno complexo que envolve vários mecanismos fisiopatológicos tais como a vasoconstrição renal, o dano tubular extenso e lesão glomerular. Esta situação clínico-cirúrgica é um evento presente em transplantes renais, revascularizações cirúrgicas das artérias renais, tratamentos de aneurismas supra-aórticos, nefrectomias parciais e nefrolitotomias entre outros (BIRD et al., 1988).

É amplamente reconhecido que o fenômeno isquêmico-reperfusional em órgãos ou tecidos está associado a uma série de eventos complexos que envolvem uma ampla gama de elementos celulares, fatores teciduais e humorais entre outros, com diferentes mecanismos de ação e potenciais lesivos a célula e ao órgão como um todo (CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996).

Recentemente, atenção especial tem sido dirigida para o período reperfusional que, segundo alguns autores (GARCIA-CRIADO et al., 1998; CAMELO et al., 1996; CUNNINGHAM et al., 1974; GRANGER et al., 1981; McCORD, 1983; PARKS et al., 1983; PALLER et al., 1984; McCORD, 1985; HASSELGREN, 1987; MENEGHINI, 1987; ABROSIO et al., 1995; PRILLAMAN & TURNER, 1997) é, na realidade, tão ou mais deletério que o período isquêmico, propriamente dito. Vários são os mecanismos propostos para explicar o dano induzido ao órgão ou tecido pelo fenômeno isquêmico-reperfusional e, entre os quais, podem ser incluídos a anóxia, o influxo celular de cálcio, a depleção do trifosfato de adenosina (ATP), a disfunção mitocondrial, a liberação de Espécies Ativas do Oxigênio (EAO) durante a reperfusão, o acúmulo de neutrófilos e outros elementos celulares leucocitários e não-leucocitários, com subsequente liberação adicional de

EAO e enzimas líticas (BONVENTRE, 1993; CAMELO et al., 1996; BUEGE & AUST, 1978; HASSELGREN, 1987; GONZALES-FLECHA, LLESUY et al., 1985; DEFRAIGNE et al., 1994).

Portanto, a isquemia e reperfusão de órgãos está associada a vários eventos que envolvem a quase totalidade dos componentes celulares. Contudo, a evidência de qual(is) o(s) mecanismo(s) que finalmente torna irreversível a morte celular não é clara e permanece como fonte inesgotável de pesquisas, tendo em vista a importância que estes aspectos representam para a biologia orgânica e conseqüente aplicação clínica (KARWINSKI et al., 1991; KARWINSKI et al., 1993; HIGA et al., 1998).

Vários autores (HANSSON et al., 1982; McCORD, 1985; HASSELGREN, 1987; CROSS et al., 1987; GALAT et al., 1990; ORTOLANI et al., 1995; LOPEZ-NEBLINA et al., 1996) consideram o envolvimento das EAO como um dos mecanismos mais importantes na lesão e morte celular quando se trata da injúria decorrente do fenômeno em tela. Especificamente, estas EAO são originadas durante o período reperfusional quando o oxigênio molecular em altas concentrações atinge zonas teciduais previamente isquêmicas e, portanto, metabolicamente alteradas, e não adequadamente preparadas para transformação bioquímica do mesmo (GRANGER et al., 1981; BULKEY, 1983; COHEN, 1992; ORTOLANI et al., 1995; TAKEMOTO et al., 1994).

As EAO, moléculas altamente reativas oriundas de uma inadequada metabolização do oxigênio molecular, em função de suas propriedades oxidativas podem agir diretamente sobre os ácidos graxos presentes nos fosfolípidos constituintes das membranas celulares (GERSCHMAN, 1981; BULKEY, 1983; PALLER et al., 1984). Este fenômeno também pode se processar, indiretamente, através de radicais lipídicos peroxidados, além de outros produtos da fragmentação lipídica, que por si só são agentes oxidantes (BULKEY, 1983; BELLÓ-KLEIN, 1994).

Além disso, uma das características mais importantes das EAO é a sua propriedade de gerar reações em cadeia para produzir espécies radicais, resultando em uma amplificação do processo em sequência que culmina com um efeito destrutivo sobre a células adjacentes (BULKEY, 1983; MENEHINI, 1987).

Mais especificamente, estas espécies radicais podem afetar, além da membrana celular, os constituintes intracelulares como as membranas das organelas citosólicas, entre as quais podem ser destacadas as mitocondriais e os lisossomas (MENEHINI, 1987; WILLET et al., 1995; NICOLLI et al., 1995). Este processo pode levar a ruptura lisossômica, com a conseqüente liberação de enzimas citotóxicas, que podem potencializar a lesão celular induzida pelo radical livre (BULKEY, 1983; GERSHMAN, 1981; McCORD, 1983; SOUTHARD et al., 1987; NAUTA et al., 1990; MATIELI, 1994; TAKEMOTO et al., 1994; NICOLLI et al., 1995; PRILLAMAN & TURNER , 1997). O dano celular que se segue à ruptura lisossomial é provavelmente devido à liberação de espécies radicais tóxicas e enzimas hidrolíticas (BULKEY, 1983). Por sua vez, as mitocôndrias que normalmente são envoltas por membranas, além de serem vulneráveis a tal ação oxidativa funcionam, também, como uma contínua fonte de geração de EAO através do mecanismo denominado de cadeia de transporte de elétrons e, a ruptura da barreira mecânica imposta pela sua membrana permite o extravazamento de espécies radicais para o meio citosólico (BULKEY, 1983; McCORD, 1985). Todos estes eventos processam-se de forma sequencial e contínua em um meio já deficiente de mecanismos celulares de defesas,

denominadas de *scavengers* (enzimáticos ou não-enzimáticos) ou levando a um consumo excessivo dos mesmos, por uma sobrecarga de espécies oxidativas oriundas do fenômeno isquêmico-reperfusional, que tem como consequência a lesão e morte celular.

Estudos recentes efetuados em distintos centros de pesquisa, têm voltado sua atenção, de forma especial, para uma melhor compreensão da ação do Óxido Nítrico (NO) em vários processos e eventos metabólicos, bem como, fisiopatológicos (MONCADA et al., 1991; GROSS et al., 1995; ISOBE et al., 1999; DEMIRYUREK et al., 1998; KOBAYASHI et al., 1995; CAMELO et al., 1996; MUMTAZ et al., 2000; SHOSKES et al., 1997; LOPEZ-NEBLINA et al., 1996; GARCIA-CRIADO et al., 1998; MYERS et al., 1995; CRISTOL et al., 1996). Entre estes, destaca-se a possível participação do NO no fenômeno isquêmico/reperfusional, além da relação do mesmo com as EAO nos eventos patológicos que ocasionam a lesão de órgãos e tecidos envolvidos neste processo (ISOBE et al., 1999; DEMIRYUREK et al., 1998; MYERS et al., 1995; MUELLER et al., 2000).

De uma maneira geral e simplificada a atividade biológica do NO pode explicada através de 3 mecanismos principais: 1) NO é eliminado pela reação com a oxihemoglobina para dar origem a metahemoglobina e nitrato; 2) NO ativa a guanilato ciclase dando origem a formação da guanosina monofosfatada cíclica (GMPc); 3) NO age como *scavenger* do radical superóxido ou transforma-se em peroxinitrito pela sua reação com a referida EAO (DEMIRYUREK et al., 1998).

Mais especificamente, entre os diversos potenciais efeitos do NO no fenômeno isquêmico-reperfusional podem ser destacados: 1) a inibição da agregação plaquetária secundária ao aumento intracelular de GMPc e assim impedindo a trombose vascular durante o período reperfusional; 2) o bloqueio da aderência e migração monocitária; 3) a inibição da ativação leucocitária que leva a adesão neutrófilica-endotelial e geração de EAO; 4) a inibição da liberação de produtos com ação citotóxica e vasoconstritora (leucotrienos, citocinas e prostaglandinas); 5) a sua ação direta contra a expressão de moléculas de adesão celular e EAO e, 6) a sua ação vasodilatadora que interfere na microcirculação após a reperfusão (GARCIA-CRIADO et al., 1998; HIGA et al., 1998; HANSEN et al., 1997; LAND et al., 1997; CHIEN et al., 1999; BRETAN et al., 1997; SUBRAMANIAN et al., 1999; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1999; EL-WAHSH et al., 1997; LAND, 1998).

Entretanto, no fenômeno isquêmico-reperfusional supõe-se que o NO tenha um papel ambíguo, ou seja, durante o período isquêmico, propriamente dito, ele parece proteger o tecido devido as suas propriedades vasodilatadoras e sua ação moduladora na agregação leucocitária endotelial, reduzindo o acúmulo dos mesmos para o local conflagrado pelo processo inflamatório desencadeado; contudo, durante o período de re-oxigenação, do tecido previamente isquêmico, o NO poderia reagir com moléculas instáveis de oxigênio (EAO), tais como o radical superóxido, funcionando, por um lado, como *scavenger* neutralizando a sua atividade e, por outro lado, originando o peroxinitrito (ONOO-), um potente agente instável e com alto poder oxidativo, causando, por conseguinte, peroxidação lipídica ao nível dos ácidos graxos das membranas fosfolipídicas celulares (MONCADA et al., 1991; GROSS et al., 1995; DIMIRYUEK et al., 1998; RHODEN, et al., 1998 j; LAND and ZWEIER., 1997; LAND, 1998).

Vários autores (BUEGE & AUST, 1978; HASSELGREN, 1987; GONZALES-FLECHA, et al., 1991; MONCADA et al., 1991; GROSS et al., 1995; ISOBE et al., 1999; DEMIRYUREK et al., 1998; KOBAYASHI et al., 1995; CAMELO et al.,

1996; MUMTAZ et al., 2000; SHOSKES et al., 1997; LOPEZ-NEBLINA et al., 1996; GARCIA-CRIADO et al., 1998; MYERS et al., 1995; CRISTOL et al., 1993; RHODEN, et al., 1997 i; RHODEN et al.,1999 k; RHODEN, et al., 2000 p) têm demonstrado que a isquemia renal seguida da reperfusão causa um rápido aumento na tensão tecidual de oxigênio, que promove a lipoperoxidação das membranas celulares das células renais, com conseqüente lesão celular e, por conseguinte, severas repercussões sobre a integridade funcional e tecidual do respectivo órgão. Tais aspectos deletérios sobre os rins podem ser avaliados através de vários métodos que incluem a avaliação funcional, determinação dos produtos finais da ação oxidativa sobre os componentes lipídicos das membranas celulares e, também, através de estudos histológicos.

2.0 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 GENERALIDADES E TOXICIDADE DO OXIGÊNIO

Delgadas membranas lipoproteicas envolvem a célula (membrana celular), o citoplasma (membrana citoplasmática), o núcleo (membrana nuclear) e as diferentes organelas intracitoplasmáticas, com o objetivo de manter a arquitetura celular e os processos metabólicos que dependem da integridade das mesmas (MAYES, 1980; GUYTON, 1991; LEHNINGER et al., 1995). Elas são denominadas membranas lipoproteicas porque apresentam na sua constituição uma dupla camada formada por lipídios e porque mergulhadas no seu interior encontram-se moléculas proteicas (GUYTON, 1991; LEHNINGER, 1995; COTRAN et al., 1989; NELSON et al., 1995).

Desta maneira, os lipídios constituem uma barreira que impede o livre movimento da água de um compartimento celular para outro, enquanto as moléculas proteicas interrompem esta barreira, proporcionando assim vias de passagem para várias substâncias, além de exercer funções enzimáticas essenciais à vida celular (MAYES, 1980; GUYTON, 1991; LEHNINGER, 1995; COTRAN et al., 1989; NELSON et al., 1995).

Portanto, além da estrutura individualizada e bem definida de cada unidade celular, vários processos metabólicos ocorrem tanto para manter a arquitetura celular como para manter a atividade funcional específica da célula em determinado órgão (MAYES, 1980; LEHNINGER, 1995; COTRAN et al., 1989; NELSON et al., 1995).

Além disso, a célula, para executar as suas funções específicas, depende de energia, fundamentalmente sob forma de adenosina trifosfatada (ATP), e diversos mecanismos metabólicos estão envolvidos no processo de geração da mesma (GUYTON, 1991; LEHNINGER, 1995). O ATP é uma combinação de adenina, ribose e três radicais fosfato, unindo-se dois últimos radicais restante da molécula através de ligações de grande energia. Após a perda de um radical fosfato do ATP, o composto torna-se adenosina difosfatada (ADP) e, após a perda do segundo radical fosfato, o mesmo passa a ser adenosina monofosfatada (AMP). Tais situações ocorrem continuamente durante o metabolismo da célula envolvido na execução de suas funções específicas (GRANGER et al., 1981; LEHNINGER, 1995). Além disso, diferentes processos metabólicos, como o ciclo do ácido cítrico (Ciclo de Krebs), o ciclo das pentoses, a fosforilação oxidativa e a cadeia de transporte de elétrons, entre outros, são importantes fontes geradoras de energia celular (LEHNINGER, 1995).

A complexidade destes eventos em nível celular é extrema, envolvendo uma série bastante ampla de rotas metabólicas apenas para a geração de energia

para que a célula execute as suas funções em um determinado órgão. Há participação do oxigênio em todos os eventos funcionais que se processam em nível celular, basicamente em seres aeróbicos, e ela permeia praticamente todos os eventos funcionais que se processam neste plano, como fonte energética para diferentes processos metabólicos e, por conseguinte, para a funcionalidade dos órgãos (MAYES, 1980; GUYTON, 1991).

Entretanto, o metabolismo do oxigênio leva também a formação de substâncias potencialmente deletérias. As bases da toxicidade do oxigênio foram estabelecidas em 1871 por Paul Bert, ao expor plantas e animais a altas concentrações dele, com a demonstração de efeitos deletérios sobre os mesmos, de uma maneira universal (apud BELLÓ-KLEIN, 1994).

Atualmente, está claramente estabelecido que processos enzimáticos e não-enzimáticos que ocorrem em nível celular, permeados pelo oxigênio, levam a uma contínua produção de espécies ativas do oxigênio (EAO), que necessitam ser detoxificadas pelo organismo, em função do seu potencial efeito lesivo (MENEHINI, 1987; CROSS et al., 1987; ABROSIO et al., 1995; WOHAIEB et al., 1987; RHODEN, et al., 1998 a; RHODEN, 1997 b). De forma simplificada, as EAO podem ser formadas pela perda de um elétron de um não-radical ou pelo ganho de um elétron por um não-radical, de forma a ficarem com um elétron desemparelhado na camada mais externa, gerando instabilidade química e grande poder de reação (BULKEY, 1983; MENEHINI, 1987).

As EAO podem estar implicadas como elementos fisiopatológicos em várias situações, destacando-se, entre estas, a ação de agentes tóxicos exógenos (radiação ionizante, agentes quimioterápicos, tetracloreto de carbono, paraquat,

carcinógenos químicos), síndromes de hiperoxigenação (toxicidade pulmonar por oxigênio hiperbárico, fibroplasia retrolental), síndromes isquêmico-reperfusionais (infarto do miocárdio, cardioplegia cirúrgica, preservação de órgãos para transplantes, isquemia intestinal, enterocolite necrotizante, isquemia cerebral, transferência de retalhos livres de pele e músculos), desordens inflamatórias (glomerulonefrites, vasculites e doenças autoimunes), choque hemorrágico, sobrecarga de ferro (hemocromatose, talassemias), deficiências nutricionais, álcool, câncer e amiloidose, entre outros (OHKAWA et al., 1979; GERSCHMAN, 1981; CROSS et al., 1987; PUNCH et al., 1992 ; PARKS et al., 1983; POLI, 1993; NILSSON et al., 1993; WILLET et al., 1995). Doenças dos sistemas sangüíneo, respiratório, cardiovascular, urinário, gastrintestinal, nervoso central, visual e cutâneo têm sido referidas como tendo associação ou mediação por EAO (ABROSIO et al., 1995; BOROS et al., 1995; ORTOLANI et al., 1995).

A redução completa do oxigênio a água é o mecanismo de controle, desenvolvido pelos seres aeróbios, sobre este elemento, o que permite que os mesmos possam sobreviver em meios ricos em oxigênio. Portanto, a compreensão das etapas pelas quais este fenômeno se processa é de fundamental importância no que se refere à formação das EAO (DEL MAESTRO, 1980; BULKEY, 1983; WOHAIEB et al., 1987). De forma sumarizada, esta redução envolve a adição de quatro elétrons a cada molécula de oxigênio, podendo este processo ocorrer de forma tetra ou monovalente (BULKEY, 1983). Na primeira situação, responsável pelo metabolismo (redução) de 95% do oxigênio, o mesmo recebe quatro elétrons de uma só vez, formando água, sendo

esta reação mediada pela via do citocromo oxidase e utilizada para gerar a adenosina trifosfato (ATP), processo conhecido, também, como glicólise aeróbica (DEL MAESTRO, 1980; BULKEY, 1983). Nos 5% restantes, o processo ocorre de forma monovalente, isto é, o O_2 recebe um elétron de cada vez (mono, di e tri-redução), formando uma série de elementos intermediários tóxicos e reativos denominados EAO, cujos principais representantes são o radical superóxido ($\cdot O_2^-$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\cdot OH$), respectivamente (DEL MAESTRO, 1980; McCORD, 1983; FRANSSEN et al., 1995; WOHAIEB et al., 1987; RHODEN, 1997 b) (Figura 1). Estes são também conhecidos como radicais livres de oxigênio, denominação não totalmente correta, tendo em vista que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é uma espécie radical. Assim, entende-se por radical livre qualquer espécie química capaz de existência independente e que contém um ou mais elétrons desemparelhados (McCORD, 1983; CROSS et al., 1987; ABROSIO et al., 1995). Logo, inclui vários outros radicais, como do átomo de hidrogênio, de íons de metais de transição, óxido nítrico, dióxido de nitrogênio, etc. (CROSS et al., 1987).

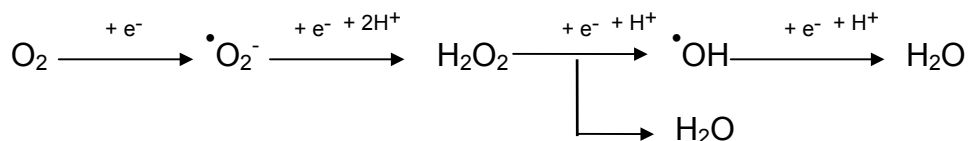


Figura 1 - Mecanismo univalente para redução do oxigênio molecular à água: o oxigênio molecular é reduzido inicialmente em radical superóxido ($\cdot O_2^-$), e deste em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Finalmente, a adição de mais um elétron e a reação com um próton de hidrogênio do meio levam à formação de água e do potente radical hidroxil ($\cdot OH$). A redução final univalente e a adição de outro próton

convertem o radical hidroxil em água. Os radicais $\cdot\text{O}_2^-$ e $\cdot\text{OH}$ são espécies ativas do oxigênio(EAO), cada uma contendo, por definição, um elétron desemparelhado em sua camada mais externa, o que lhes proporciona uma potente atividade reativa. (Adaptado de DEL MAESTRO, 1980).

Cabe ressaltar que a toxicidade do oxigênio não se deve apenas aos radicais livres dele derivados, mas também a outros estados do oxigênio, como H_2O_2 e o oxigênio *singlet* (estado excitado do oxigênio molecular). Neste estado, ele pode se apresentar sob duas formas: sigma (mais reativo, pois possui 2 elétrons desemparelhados) e delta (menos reativo, pois não apresenta elétrons desemparelhados). A descoberta de enzimas (superóxido dismutase) que atuam especificamente diminuindo este radical em células aeróbicas, sustenta a teoria de que o superóxido é o grande responsável pela toxicidade do oxigênio, já que estas enzimas são essenciais para a sobrevivência dos seres vivos na presença de O_2 (DEL MAESTRO, 1980; BULKEY, 1983; McCORD, 1983). Na realidade, as EAO e os mecanismos de controle ou remoção das mesmas podem ter sido elementos fundamentais que nortearam o processo evolutivo das espécies quando da presença inicial de oxigênio na atmosfera (DEL MAESTRO, 1980; BULKEY, 1983).

Portanto, o equilíbrio entre a formação contínua de EAO e os mecanismos de detoxificação destes elementos ocorrem paralelamente a nível celular com o intuito de promover a manutenção de sua integridade e, conseqüentemente, a do órgão (BULKEY, 1983; McCORD, 1983; McCORD, 1985). Esta relação e a sucessão de eventos metabólicos somente são mantidas quando as condições fundamentais são preservadas, ou seja, a arquitetura celular e das membranas que envolvem as células e suas estruturas intracelulares e o contínuo suprimento de sangue e, por

consequente, de nutrientes para o metabolismo celular (BULKEY, 1983; McCORD, 1983; McCORD, 1985).

2.2 - FONTE DAS ESPÉCIES ATIVAS DO OXIGÊNIO (EAO)

As principais fontes das EAO, nos seres vivos aeróbicos, podem ser divididas em endógenas e exógenas (DEL MAESTRO, 1980; CROSS et al., 1987). Entre as primeiras, temos a atividade mitocondrial (cadeia de transporte de elétrons), microssomal (cadeia de transportes de elétrons), dos cloroplastos (cadeia de transporte de elétrons), das enzimas oxidantes (xantina oxidase, ciclooxigenase, lipoxigenase, monoaminoxidase, galactose oxidase), das células fagocíticas (neutrófilos, monócitos, macrófagos) e das reações auto-oxidantes (Fe^{2+} , adrenalina), entre outras (GRENE & PALLER, 1992). Entre as fontes exógenas destacam-se as substâncias com potencial redox (paraquat, doxorubicina, entre outras), drogas oxidantes (paracetamol, tetracloreto de carbono), fumo, radiação ionizante, luz solar e substâncias oxidantes do glutathione (CROSS et al., 1987; POLI, 1993).

2.3 - PRINCIPAIS ESPÉCIES ATIVAS DO OXIGÊNIO (EAO)

Fundamentalmente são três as principais EAO oriundas do metabolismo aeróbico, ou seja: o radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) (BULKEY, 1983; PALLER et al., 1984; MATIELI, 1994; NUNES et al., 1995).

O radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) pode atuar como agente redutor, doando o seu elétron excedente, ou como agente oxidante, situação na qual recebe elétrons e é reduzido a água (DEL MAESTRO, 1980; NUNES et al., 1995). A sua principal atividade citotóxica resulta de um ataque direto ou indireto, em nível molecular, pelo próprio radical ou, secundariamente, através da geração de outros radicais (H_2O_2 e $\cdot\text{OH}$), como, por exemplo, na reação de Haber-Weiss, catalisada por metais, que leva à formação do potente radical $\cdot\text{OH}$ através da reação (McCORD, 1983) (Figura 2).

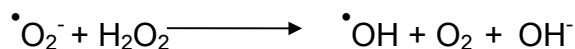


Figura 2 - Reação de Haber-Weiss: demonstra a interação entre o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), numa reação catalisada por metais de transição, como, por exemplo, o ferro da hemoglobina, originando o potente radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), o oxigênio molecular (O_2) e a hidroxila (OH^-) (Adaptado de DEL MAESTRO, 1980).

Por outro lado, também pode reagir com lipídios hidroperóxidos para formar radicais alcóxil ($\text{RO}\cdot$) (BULKEY, 1983). A mais importante reação que envolve o $\cdot\text{O}_2^-$ é a sua dismutação a H_2O_2 (DEL MAESTRO, 1980; MENEGHINI, 1987). É importante salientar que células inflamatórias possuem na sua superfície NADPH redutase, que catalisa a formação de $\cdot\text{O}_2^-$. Parte desta produção é liberada para o meio extra-celular, onde pode ocorrer uma dismutação espontânea, originando H_2O_2 (NUNES et al., 1995). A habilidade destas células de promover estas reações é um importante fator para a morte de bactérias, uma vez que, em

indivíduos nos quais estas ocorrem, como, por exemplo, na doença granulomatosa crônica, infecções recorrentes são freqüentes (BULKEY, 1983; MENEHINI, 1987). Entretanto, o mecanismo da atividade bactericida ainda não está completamente esclarecido, mas relaciona-se, possivelmente, à formação de outras EAO (radical hidroxil e oxigênio *singlet*) e hipoclorito (MENEHINI, 1987) .

A formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ocorrer por processo direto ou indireto (DEL MAESTRO, 1980; NUNES et al., 1995). O primeiro relaciona-se à ação de oxidases encontradas nos peroxissomas (D-aminoácido oxidase, xantina oxidase, uricase, alfa-hidroxiácido oxidase e glicolato oxidase) envolvidas nas reações de oxidação de ácidos graxos, produção de hormônios esteróides, produção de lipídios em glândulas sebáceas, fagocitose, termogênese etc., correspondendo a uma redução divalente do O_2 (DEL MAESTRO, 1980). O segundo processo relaciona-se à dismutação do ânion radical superóxido, previamente formado, através da redução univalente do O_2 , resultante da oxidação aeróbica de substratos com subsequente ação da SOD.

Entretanto, existem ainda controvérsias sobre a real toxicidade do H_2O_2 , demonstrada em diferentes sistemas celulares. Entretanto, no momento, enfatiza-se que esta EAO pura não é reativa (WILLET et al., 1995). Por outro lado, a sua toxicidade se tornaria relevante quando ocorre o seu contato com formas reduzidas de metais de transição (Fe^{+2} ou Cu^{+1}), originando o radical hidroxil, através da reação de Fenton (MENEHINI, 1987; NUNES et al., 1995) (Figura 3).

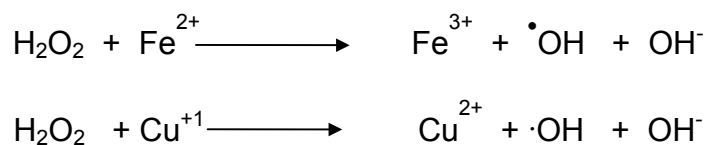


Figura 3 - Reação de Fenton: mecanismo de geração do potente radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) através da reação do radical H_2O_2 com metais de transição como o íon ferroso e cuproso. (DEL MAESTRO, 1980).

A reatividade das EAO varia, sendo algumas altamente estáveis (H_2O_2) e, outras, que correspondem a maioria tendendo a ser extremamente reativas e instáveis ($\cdot\text{OH}$, $\bullet\text{O}_2^-$) (MENEHINI, 1987). Apresentam uma vida média muito curta e, devido à sua reatividade, a maioria dos radicais existe apenas em baixas concentrações (10^{-4} a 10^{-9}M). Além disso, não se distanciam de seu sítio de formação. Entretanto, reações à distância com efeitos biológicos podem ocorrer quando um radical livre reage com um composto não-radical formando outro radical livre, induzindo sucessivamente reações em cadeia, como é o caso da lipoperoxidação (LPO) (MENEHINI, 1987).

Estas reações em cadeia apresentam basicamente 3 estágios: iniciação, propagação e terminação (BELLÓ-KLEIN, 1994). No primeiro, a EAO promove um ataque a uma molécula orgânica (ex.: ácidos graxos da cadeia lateral de lipídios), retirando um átomo de hidrogênio de um grupamento químico. Isto leva à

formação de um radical centrado no carbono (-CH-), que tende a se estabilizar, por rearranjo molecular, formando um dieno conjugado que, por sua vez, ao se combinar com o oxigênio, produz lipídios peróxidos (radical peroxil). No estágio seguinte, a propagação, os radicais peroxil podem retirar hidrogênio de outra molécula lipídica, originando novos radicais reativos, ou se combinar com átomos de hidrogênio, produzindo lipídios hidroperóxidos. Estes últimos sofrem a fase de terminação, na qual, pela presença de complexos com metais (Fe e Cu), sofrem uma decomposição, originando aldeídos (malondialdeído), hidroperóxidos voláteis (pentano, etano) e outros produtos passíveis de serem identificados experimentalmente (OHKAWA et al., 1979; ZAGER & GMUR, 1989; NAUTA et al., 1990; COHEN, 1992; STEIN et al., 1993; MATHEWS et al., 1994; ORTOLANI et al., 1995). Nesta etapa de terminação, dois radicais peroxil podem reagir entre si formando uma tetróxido instável, que se decompõe, originando oxigênio *singlet* e carbonilas excitadas. Estas espécies excitadas retornam ao estado fundamental, emitindo quantas de luz visível. Este processo é conhecido como quimiluminescência e se constitui num importante método de quantificação da LPO (COHEN, 1992; BELLÓ-KLEIN, 1994; NUNES, 1995 (Figura 4).

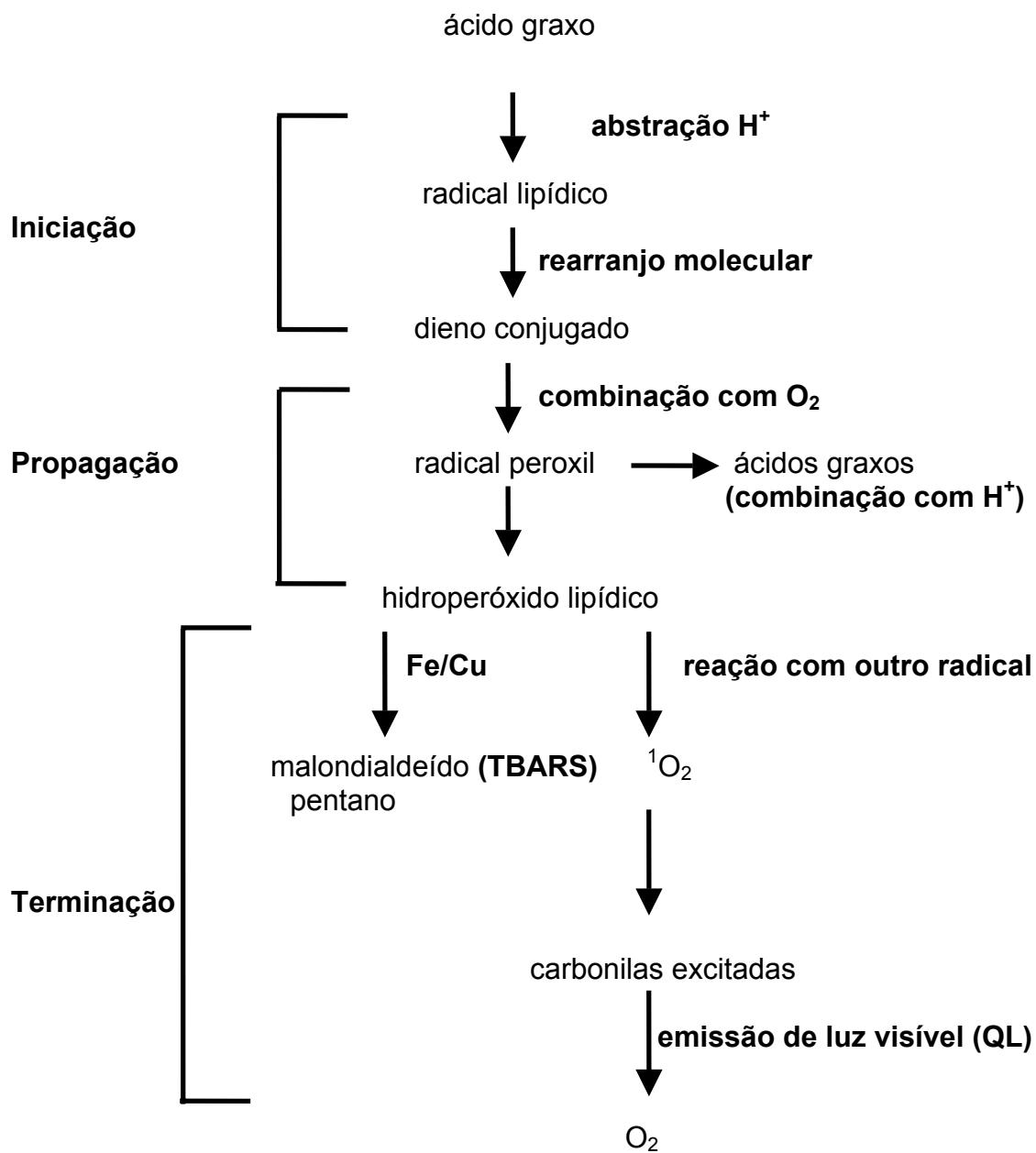


Figura 4 –Representação esquemática das três etapas da lipoperoxidação de membranas celulares em cadeia: a) Iniciação (ataque a uma molécula orgânica); b) Propagação (reações químicas que culmina com a formação do hidroperóxido); c) Terminação (reações catalisadas por metais produzindo aldeídos como o malondialdeído e emissão de quantas de luz visível). TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; e QL:Quimiluminescência (Adaptado de: DEL MAESTRO, 1980).

2.4- SÍTIOS DE AÇÃO DAS ESPÉCIES ATIVAS DO OXIGÊNIO (EAO)

As EAO formadas durante os processos metabólicos agem nos compartimentos extra e intracelular, assim como sobre as membranas das células e organelas dos organismos (BULKEY, 1983; ORTOLANI et al., 1995; ABROSIO et al., 1995; RHODEN, 1997 b). No espaço extracelular, as alterações estruturais e bioquímicas que estas espécies causam relacionam-se com o ataque aos glicosaminoglicanos, incluindo o ácido hialurônico, componente essencial do espaço intersticial e de líquidos especializados, como o vítreo e sinovial (DEL MAESTRO, 1980; BULKEY, 1983). Este ataque pode se estabelecer através de um mecanismo de despolarização oxidativo-redutiva ou ser induzido através da geração de EAO pela via da xantina oxidase (DEL MAESTRO, 1980). A degradação dos componentes do meio intersticial como o ácido hialurônico e colágeno interfere de forma significativa na permeabilidade celular e, por conseguinte, sobre as características estruturais dos tecidos vivos. Já no meio intracelular ocorre o mecanismo de LPO, que é um processo fisiológico e contínuo nas membranas celulares, sendo um fator de remoção celular e um passo essencial na biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos, bem como na fagocitose, pinocitose e lise de membranas de importantes organelas intracelulares, como as lisossomiais e mitocondriais (DEL MAESTRO, 1980; BULKEY, 1983; MENEGHINI, 1987; CROSS et al., 1987). A ruptura de organelas lisossomiais com a consequente liberação de enzimas líticas pode potencializar o dano celular induzido pela EAO (BULKEY, 1983). As membranas celulares, por

serem formadas, em grande parte, por lipídios insaturados e proteínas, são particularmente vulneráveis ao ataque oxidativo (BULKEY, 1983; PALLER et al., 1984; CROSS et al., 1987; ZAGER & GMUR, 1989; GREENE & PALLER, 1992). Este causa gradual perda de fluidez da membrana, aumento do potencial de membrana e aumento da permeabilidade iônica (por exemplo ao Ca^{++}). Se prolongada, pode ocasionar desintegração da membrana celular (HANSSON et al., 1982; PALLER et al., 1984). As enzimas ligadas à membrana celular, assim como os receptores de várias substâncias, podem ser inativadas. Por exemplo, a ligação da serotonina aos seus receptores pode ser diminuída pela LPO (McCORD, 1983). Se a LPO atingir a membrana lisossomal, pode haver liberação de enzimas lisossômicas e fosfolipases Ca^{2+} dependentes, as quais podem acelerar a degradação das membranas (PALLER et al., 1984; ZAGER & GMUR, 1989; NAUTA et al., 1990; MARUBAYASHI et al., 1991; COHEN, 1992; MATHEWS et al., 1994; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996). Além disso, os aldeídos produzidos na etapa de terminação, conforme descrito acima e representado na Figura 4, podem ser citotóxicos (NAUTA et al., 1990).

2.5 - SISTEMAS DE DEFESA CONTRA AS ESPÉCIES ATIVAS DO OXIGÊNIO (EAO)

Na luta pela sobrevivência e adaptação a meios ricos em oxigênio, os seres aeróbicos desenvolveram uma série de mecanismos biológicos destinados ao controle e à inativação das EAO geradas durante o metabolismo do oxigênio. Estes aspectos podem ter sido eventos significativos que nortearam a evolução e sobrevivência das espécies nesses meios

(GERSCHMAN, 1981; HANSSON et al., 1982; BULKEY, 1983; McCORD, 1983; MENEHINI, 1987).

Para melhor compreensão destes fenômenos e, que são essenciais para compreensão do tema em tela, os mecanismos de defesa são divididos esquematicamente, entretanto, agem simultaneamente e de forma coordenada. Além disso, a ação dos mesmos varia de acordo com a etapa do fenômeno oxidante. Ou seja, se a neutralização ocorrer na fase de iniciação ou propagação da LPO, havendo a formação de produtos menos tóxicos, a substância é chamada *scavenger* (DEL MAESTRO, 1980; BULKEY, 1983; BELLO-KLEIN, 1994). A substância pode, também, absorver a energia de excitação dos radicais, neutralizando-os. Neste caso é chamado de *quencher* (DEL MAESTRO, 1980; BELLO-KLEIN, 1994).

Os principais sistemas de defesa contra as EAO existentes nos seres aeróbicos podem ser divididos em enzimáticos e não-enzimáticos (DEL MAESTRO, 1980; PALLER et al., 1984; MENEHINI, 1987; HANSSON et al., 1990; BELLO-KLEIN, 1994; FRANSSEN et al., 1995). Dentre os sistemas enzimáticos podemos destacar três: a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (Gpx). (DEL MAESTRO, 1980; MENEHINI, 1987; HANSSON et al., 1990; KARWINSKI et al., 1993; BELLÓ-KLEIN, 1994; MATIELI, 1994).

A SOD é o principal sistema de defesa em células aeróbicas, combatendo os efeitos tóxicos do oxigênio (BULKEY, 1983; McCORD, 1983; SOUTHARD et al., 1987; MENEGHINI, 1987; GALAT et al., 1990; ORTOLANI et al., 1995; LEFEBVRE et al., 1995; DREWS et al., 1995; DI LISA et al., 1995). Está amplamente distribuída, na forma que contém cobre e zinco em seu sítio ativo (CuZn-SOD), presente no citosol das células eucarióticas ou na forma contendo manganês (Mn-SOD), localizada na matriz mitocondrial (DEL MAESTRO, 1980; BULKEY, 1983). Este complexo enzimático catalisa a dismutação do radical superóxido para formar peróxido de hidrogênio e oxigênio (BELLÓ-KLEIN, 1994) (Figura 5 e 8).

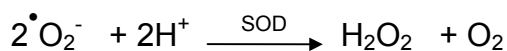


Figura 5 - Reação de dismutação: a superóxido dismutase é a enzima que catalisa a dismutação do radical superóxido ($\cdot\text{O}_2$), formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2), como forma de detoxificação (Adaptado de DEL MAESTRO, 1980).

Outra enzima extremamente importante é a catalase, hemoproteína peroxidase, específica para o H_2O_2 . Encontra-se amplamente distribuída em órgãos como fígado, rins, cérebro e nos eritrócitos (BULKEY, 1983; MENEGHINI, 1987; MATIELI, 1994; TAKAYAMA et al., 1994). A sua atividade no controle do H_2O_2 está representada abaixo:

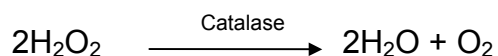


Figura 6 - Reação da catalase: o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formado pela dismutação do radical superóxido, é transformado em água e oxigênio molecular pela enzima catalase, detoxificando a EAO (Adaptado de DEL MAESTRO, 1980).

Uma terceira enzima com importante ação neste contexto é a glutathiona peroxidase, possuindo um ação peroxidase inespecífica para o H_2O_2 , podendo ou não utilizar selênio como cofator (DEL MAESTRO, 1980; MENEHINI, 1987; BELLÓ-KLEIN, 1994; MATIELI, 1994; RHODEN, 1997 b). Apresenta uma atividade significativa no fígado e nos eritrócitos, moderada no coração, rins e pulmões e baixa nos músculos (DEL MAESTRO, 1980). Esta enzima é requerida para a reação de hidroperóxidos (ROOH) com a glutathiona reduzida (GSH), originando glutathiona oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido, como demonstrado a seguir:

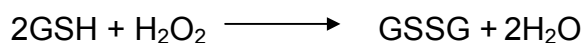


Figura 7 - Glutathiona peroxidase: catalisa a reação de hidroperóxidos (H_2O_2) com a glutathiona reduzida (GSH) para formar glutathiona oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido. (Adaptado de DEL MAESTRO, 1980).

Em condições fisiológicas normais a exposição de animais a concentrações aumentadas de O_2 freqüentemente ocasiona um elevação da atividade da SOD, CAT e GPx em muitos tecidos, o que significa que a quantidade presente destes

agentes anti-oxidativos normalmente é suficiente somente para equilibrar taxas normais de produção das EAO e, assim, preservar a integridade celular e por conseguinte dos órgãos (OREDSSON et al., 1995; DI LISA et al., 1995).

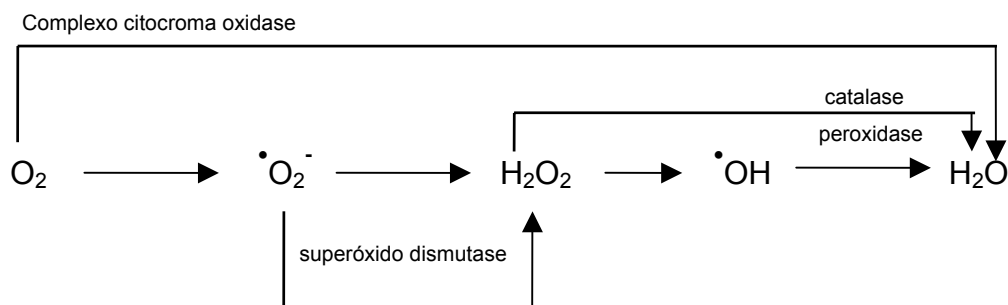


Figura 8 - Mecanismos endógenos de defesas enzimáticas para detoxificação de EAO geradas pela redução univalente do oxigênio molecular (O_2). O complexo citocroma oxidase é responsável pela detoxificação da maior parte do oxigênio reduzido tetravalentemente, prevenindo assim a liberação das EAO: superóxido ($\cdot O_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxil ($\cdot OH$). A redução univalente é realizada através: superóxido dismutase, que catalisa a dismutação do radical $\cdot O_2^-$ em H_2O_2 e oxigênio molecular (O_2), prevenindo o acúmulo de EAO. A catalase e as peroxidases catalisam a redução do peróxido de hidrogênio diretamente em água, sem a produção de intermediário tóxicos (Adaptado: DEL MAESTRO, 1980).

Por outro lado, os sistemas não-enzimáticos são divididos em: hidrofóbicos, hidrofílicos e estruturais. Neste contexto, os ácidos graxos poliinsaturados das membranas lipoproteicas compõem a região hidrofóbica das células. Assim, o alfa-tocoferol (vitamina E) e os beta-carotenos, presentes nas membranas celulares, fornecem átomos de hidrogênio e podem prevenir reações de peroxidação propagadas em cadeia nas mesmas, evitando a desestruturação da arquitetura

celular, atuando justamente na porção hidrofóbica (DEL MAESTRO, 1980; MENEGHINI, 1987; MATIELI, 1994; FRANSSEN et al., 1995; DEFRAIGNE et al., 1995). Podem também se acoplar, atuando como *quencher*s, ao O₂ e, desta forma, prevenir a formação de hidroperóxidos lipídicos, mantendo intacta a permeabilidade e estabilidade das membranas celulares (DEL MAESTRO, 1980; BELLÓ-KLEIN, 1994; MENEGHINI, 1987; NUNES et al., 1995).

Por outro lado, os sistemas hidrofílicos são representados por substâncias químicas que agem impedindo as reações dos radicais livres que se processam em meios iônicos e aquosos dos compartimentos celulares. Como principais representantes deste grupo temos o ácido ascórbico, cisteína, glutathione reduzida, ceruplasmina, transferrina, triptofano e histidina. A ação principal, deste seleto grupo de substâncias, concentra-se especialmente no controle do radical hidroxil (DEL MAESTRO, 1980; MENEGHINI, 1987; MATIELI, 1994; BELLÓ-KLEIN, 1994).

E, finalmente, entre os sistemas estruturais dos mecanismos não enzimáticos de controle das EAO destaca-se o colesterol que, intercalado no interior das membranas, pelo seu tamanho e estrutura protege os ácidos graxos da lesão peroxidativa (DEL MAESTRO, 1980).

Além disso, certos peroxissomos e mitocôndrias, com seus mecanismos especializados de *scavengers*, parecem ter papel importante no controle de reações causadas pelos radicais livres (DEL MAESTRO, 1980).

Portanto, antioxidantes endógenos protetores operam continuamente como mecanismos de defesa fisiológico contra as EAO geradas pelos processos metabólicos habituais com o intuito de preservar a integridade celular. Igualmente, em situações de estresse, como por exemplo na isquemia transitória, a sua ação é exigida com o objetivo de manter a integridade celular (HIRASAWA et al., 1978; MENEGHINI, 1987; CROSS et al., 1987; ZAGER & GMUR, 1989; NAUTA et al., 1990; GREENE & PALLER, 1992; BELLÓ-KLEIN, 1994; ORTOLANI et al., 1995; NUNES et al., 1995).

2.6- MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS ENVOLVIDOS NO DANO TECIDUAL DECORRENTE DA ISQUEMIA E REPERFUSÃO RENAL, E SUA RELAÇÃO COMO FONTE DE ESPÉCIES ATIVAS DO OXIGÊNIO (EAO)

A isquemia renal transitória é uma consequência inevitável de uma série de situações clínicas e procedimentos cirúrgicos. O exemplo mais característico da necessidade de interrupção transitória do afluxo sanguíneo ao órgão são os transplantes. Entretanto, este aspecto é também frequentemente observado em diversas situações clínicas onde se destaca a parada cardíaca seguida de ressuscitação. Por outro lado, diversas condições cirúrgicas podem e levam, frequentemente, a necessidade da interrupção sanguínea de uma forma transitória e, além disso, de forma normotérmica. Entre estes procedimentos cirúrgicos destacam-se as nefrectomias parciais, nefrolitotomias anatróficas, cirurgias vasculares renais e em aneurismas de aorta com comprometimento das artérias renais ou necessidade de interrupção do fluxo sanguíneo aórtico acima da emergência dos vasos renais (BAKER et al., 1985)

A atitude cirúrgica que leva a necessidade de isquemia transitória, principalmente em situações normotérmicas, causa uma interferência significativa na função e metabolismo celular

destes órgãos com consequentes danos teciduais (HANSSON et al., 1982; BULKEY, 1983; PALLER et al., 1984; McCORD, 1985; SOUTHARD et al., 1987).

O insuficiente suprimento sangüíneo ao órgão e, por conseguinte, às células deste reduz, rapidamente, o nível de energia das mesmas, levando, conseqüentemente, a falhas em determinadas etapas do metabolismo, com acúmulo de metabólitos nocivos às células (BULKEY, 1983; McCORD, 1983; HASSELGREN, 1987; CROSS et al., 1987; HANSSON et al., 1982; NICOLLI et al., 1995; ALEXANDER, 1996; LOPEZ-NEBLINA et al., 1996).

Assim, a interferência nos mecanismos responsáveis pela produção energética da célula e influências deletérias sobre a atividade funcional das mesmas, e a isquemia é o exemplo mais característico, causa distúrbios de graus variados em nível de função celular e subcelular, como disfunção mitocondrial e alterações funcionais da membrana celular, e na síntese de proteínas (HASSELGREN, 1987; CROSS et al., 1987; TAKEMOTO et al., 1994; NICOLLI et al., 1995; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996).

As EAO têm sido referidas como tendo envolvimento significativo nos mecanismos de dano tecidual associados ao fenômeno isquêmico-reperfusional. Na realidade, a isquemia e reperfusão de órgãos têm sido amplamente reconhecida com fonte importante de EAO (HANSSON et al., 1982; BULKEY, 1983; PALLER et al., 1984; McCORD, 1985; SOUTHARD et al., 1987; PUNCH et al., 1992; ONILSSON et al., 1993). Este aspecto é salientado pela observação de que a isquemia é referida, em certas circunstâncias, como menos lesiva aos

tecidos do que o grande aporte de oxigênio que ocorre após restabelecida a circulação arterial, o que leva à formação das EAO e suas conseqüências (MENEHINI, 1987; HASSELGREN, 1987; McCORD, 1992; MATIELI, 1994; NUNES, 1995; RHODEN et al., 1996 d; RHODEN, 1997 a; RHODEN, et al., 1999 m; RHODEN et al., 2000 p).

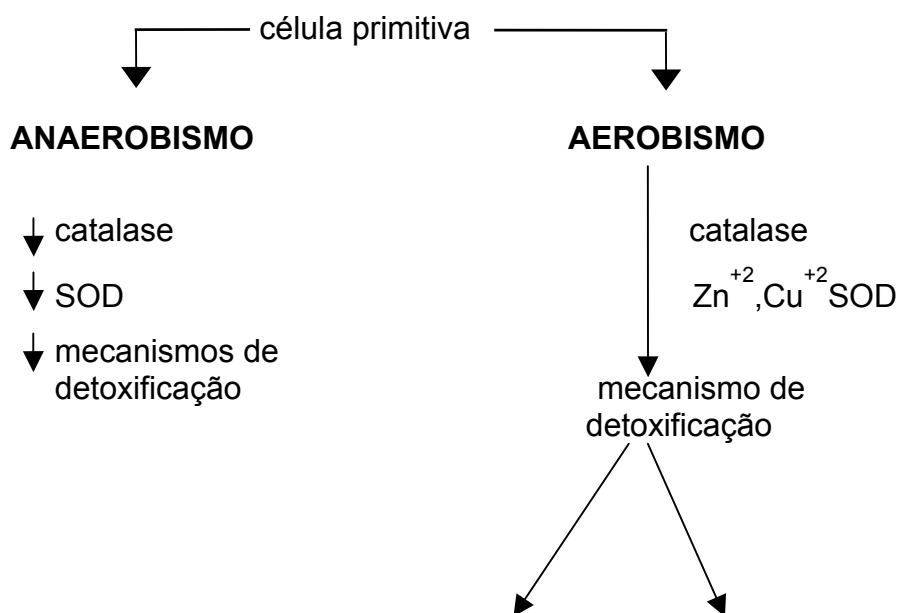
Após um período de isquemia, a formação das EAO cresce dentro de minutos da reperfusão, quando atinge um pico e, a seguir, declina lentamente para uma linha de base (NUNES, 1995; RHODEN, 1997 a; RHODEN, et al., 1999 m; RHODEN et al., 2000 p). As EAO danificam as membranas celulares através da peroxidação de ácidos graxos no interior da estrutura dos fosfolípídeos, por sua vez, elementos fundamentais da arquitetura das membranas celulares lipoproteicas (HANSSON et al., 1982; BULKEY, 1983; PALLER et al., 1984; NAUTA et al., 1990; COHEN, 1992; MATHEWS et al., 1994; RHODEN, et al., 1996 c; RHODEN et al., 1996 d). Durante este processo, radicais peróxido dos lipídios, hidroperóxido de lipídios e outros produtos da fragmentação dos mesmos são agentes oxidativos ativos (BULKEY, 1983; PUNCH et al., 1992). Assim, a reatividade do radical livre tem uma tendência para gerar reações em cascata para produzir espécies radicais ativas que terminam com efeitos destrutivos sobre as células (DEL MAESTRO, 1980; BULKEY, 1983; HASSELGREN, 1987; PUNCH et al., 1992; RHODEN, 1997 a).

Os mecanismos propostos como responsáveis pela geração das EAO, sob estas circunstâncias, incluem a lesão mitocondrial, a atividade da xantina oxidase,

a via do ácido araquidônico, o óxido nítrico ou o acúmulo de polimorfonucleares teciduais (PARKS et al., 1983; SOUTHARD et al., 1987; CROSS et al., 1987; GALAT et al., 1990; BROWSE et al., 1994; GRISHAM, 1995; MENGER, 1995; KOBAYASHI et al., 1995; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996; ALEXANDER, 1996; LOPEZ-NEBLINA et al., 1996; RHODEN, 1997 a; RHODEN, et al., 1999 n; RHODEN, et al., 2000 o).

Embora dividido didaticamente em vários mecanismos, como exposto acima, a ação das EAO, na realidade, é uma soma ou sequência de eventos inter-relacionadas. Diminuindo o aporte de oxigênio para níveis críticos ao ambiente aeróbico, ocorre, por parte das células, uma tentativa de adaptação para uma situação de metabolismo anaeróbico em que as reservas de glicose, glicogênio e energia sob forma de ATP tomam parte importante na habilidade celular para superar esta situação de estresse e a atividade mitocondrial diminui significativamente. No período de reperfusão, as células expostas a grandes tensões de oxigênio precisam de um rápido reajuste de seu metabolismo para uma situação de metabolismo aeróbico. Estas concentrações altas de oxigênio em uma situação de funcionamento inadequado das mitocôndrias (lesadas durante o período isquêmico) junto com a diminuição dos agentes de detoxificação das EAO resultam na geração de quantidades muito altas das mesmas, culminando com uma futura lesão das membranas e morte celular (Figura 9) (CROSS et al., 1987; NAUTA et al., 1990; COHEN, 1992; MATHEWS et al., 1994; NUNES, 1995; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996; LOPEZ-NEBLINA et al., 1996; RHODEN, 1997 a).

Provas inequívocas de que este fenômeno se processa em tais situações são os diversos experimentos já efetuados que demonstram uma concentração extremamente reduzida de malondialdeído, produto da peroxidação dos ácidos graxos, em homogeneizados de tecidos de órgãos submetidos à isquemia e não reperfundidos, e uma concentração progressivamente maior associada à reperfusão e ao reflexo desta oxidação ao nível da função do órgão em questão, assim como ao fato de substâncias sabidamente detoxificadoras de EAO possuírem a capacidade de reduzir este processo (PALLER et al., 1984; NORDSTRÖM et al., 1985; ZAGER & GMUR, 1989; GREENE & PALLER, 1992; RINALDI et al., 1995; RHODEN et al., 2000 p).



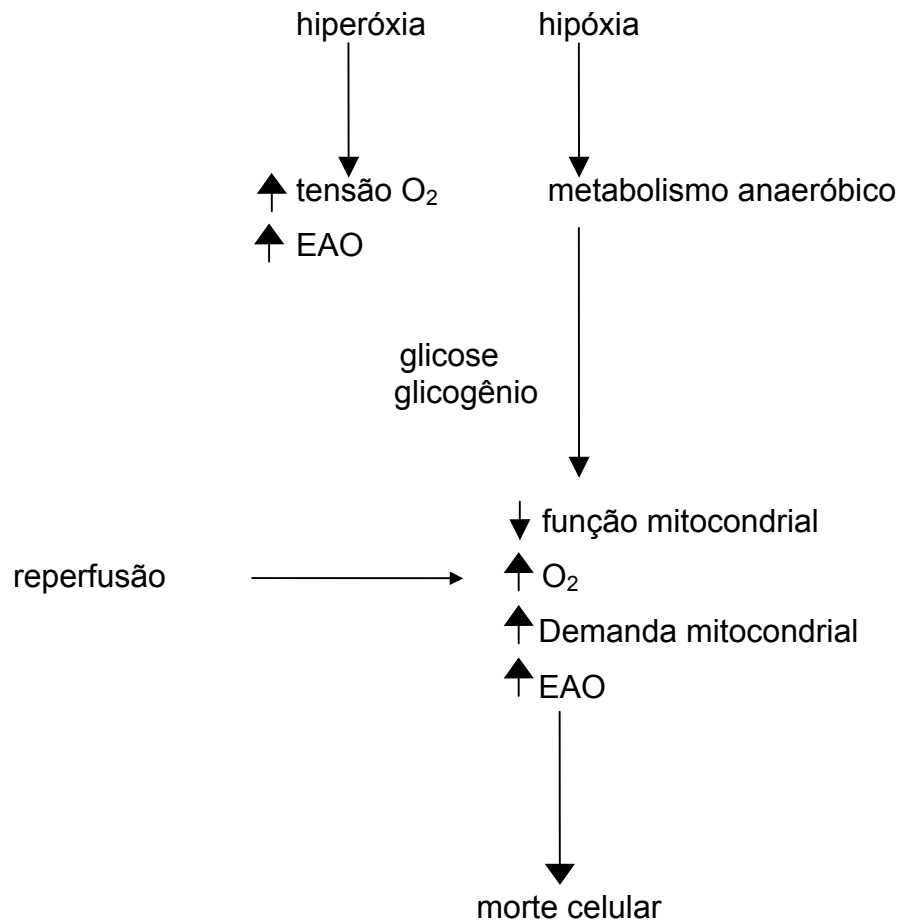


Figura 9 - Esquema geral de formação de Espécies Reativas do Oxigênio em situações de isquemia e reperfusão. EAO: espécies ativas do oxigênio; O_2 : oxigênio molecular; SOD: superóxido dismutase; Zn^{++} e Cu^{++} : íons metais de zinco e cobre. (Adaptado: DEL MAESTRO, 1980).

Na realidade para melhor compreender os aspectos descritos acima e tentar correlacioná-los dentro de um fenômeno que ocorre de uma forma sequencial algumas considerações a respeito do processo isquêmico reperfusional precisam ser revistos.

O dano decorrente da isquemia e reperfusão de um órgão ou tecido pode ser considerada como uma manifestação de uma resposta inflamatória iniciada pela liberação de uma série de mediadores local e sistemicamente (BOYLE et al., 1996).

A microcirculação sanguínea representa o primeiro sítio da ação deletéria do fenômeno isquêmico reperfusional. Durante a isquemia, fosfatos energizados são depletados e o transporte de íons através da membrana celular são reduzidos o que leva ao acúmulo intracelular de íons acompanhado de um influxo de água resultando em edema celular, em especial das células endoteliais (MASSBERG et al., 1998). A consequente perda de fluídos intra-vasculares resulta em uma hemoconcentração local e aumento da viscosidade sanguínea que, posteriormente, é ainda mais exacerbada pela mobilização leucocitária. A repleção capilar por neutrófilos, digestão proteolítica da membrana basal endotelial pela migração leucocitária (aumentando a permeabilidade vascular), micro-trombose intravascular e a vasoconstrição micro-vascular pela não liberação de prostaglandinas (PGI), adenosina e óxido nítrico envolvidos na modulação do tônus vascular tornam o restabelecimento do fluxo sanguíneo micro-vascular, no período reperfusional, mais difícil levando ao fenômeno denominado de “não-reperfusão” (MASSBERG et al., 1998; BOYLE et al., 1997; FÖRSTERMANN et al., 1994). O efeito do mesmo têm como consequência um prolongamento do período isquêmico e suas consequências (MENGER, 1995). Além disso, estudos mais recentes têm voltado sua atenção ao período reperfusional como fonte de complexos fenômenos que levam a um dano adicional ao sítio previamente

isquêmico (MASSBERG et al., 1998). Em outras palavras, embora a reperfusão de tecidos isquêmicos seja essencial para a sobrevivência dos mesmos, esta se acompanha de um dano adicional àquele iniciado pela isquemia (“reperfusão paradoxal”) (MENGER, 1995). Enquanto o fenômeno de “não reperfusão” envolve os capilares, a “reperfusão paradoxal” está associada com a adesão leucocitária à superfície endotelial das vênulas pós-capilares e subsequente ativação leucocitária, um processo que danifica a integridade celular do endotélio que permite o extravasamento de macromoléculas do espaço intra-vascular para o extra-vascular (MENGER, 1995; MUELLER et al., 2000; GUO et al., 2000; NÜSSLER, et al., 2000; LANGREHR, et al., 2000). Esta adesão leucocitária ao endotélio está significativamente elevada dentro de alguns minutos após ter sido restabelecida a reperfusão e permanece elevada por várias horas. Uma série de moléculas presentes na superfície dos leucócitos e ou células endoteliais são responsáveis pela primeira fase deste processo (*rolling*) e são denominadas de selectinas leucocitárias (L- selectina) e selectinas endoteliais (P- selectinas) . A esta etapa segue-se uma fase denominada de mais estável (interação estacionária adesiva ou interação leucocitária-endotelial secundária, *stricking*) mediada por moléculas de adesão celular superficial, como as imunoglobulinas (molécula de adesão intercelular-1, ICAM-1), integrinas $\beta 2$ (CD11/CD18) envolvidas em um processo em múltiplas etapas que leva a imigração e emigração leucocitária (MENGER, 1995). Além disso, uma série de mediadores liberados durante o fenômeno isquêmico reperfusional exercem efeitos quimiotáticos (citoquinas, interleucinas-IL, fator de necrose tumoral alfa- TNF α ,

fator de ativação plaquetária-PAF, e leucotrienos) liberados pelo endotélio pós-isquêmico e também por leucócitos residentes localmente (MENGER, 1995; BOYLE et al., 1997; MASSBERG et al., 1998; MUELLER et al., 2000; GUO et al., 2000; NÜSSLER, et al., 2000; LANGREHR, et al., 1993) (Figura 10).

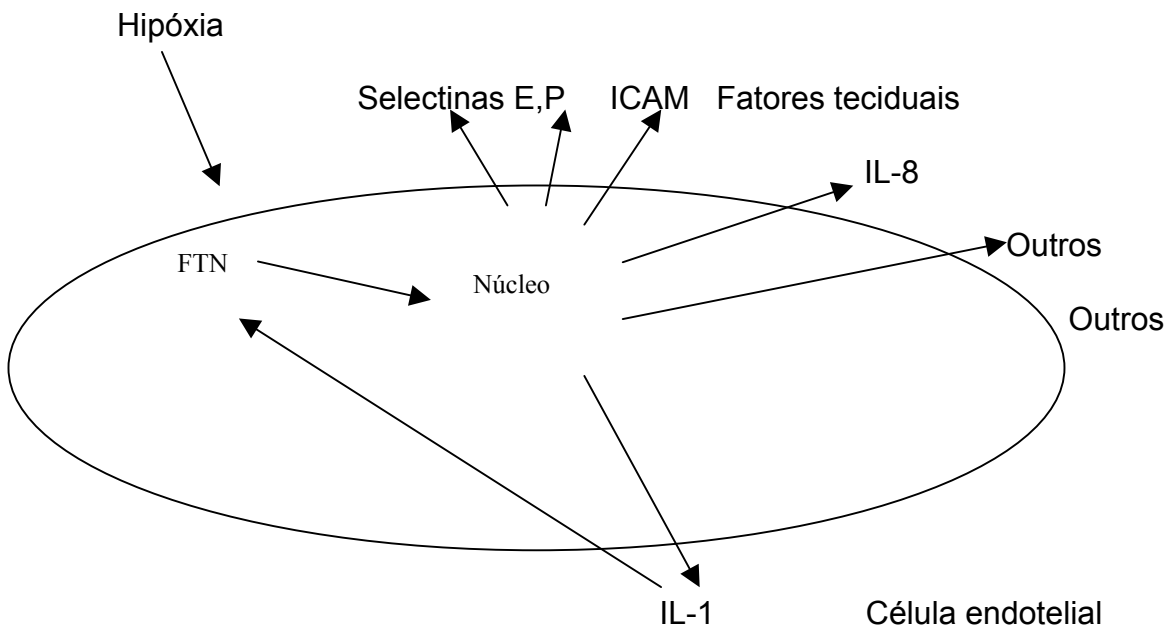


Figura 10- Ativação endotelial: a hipóxia leva a célula endotelial a ativar o fator de Necrose (FTN) que por sua vez estimula o núcleo a promover a transcrição de fatores de superfície endotelial. ICAM(Moécula de adesão intracelular); IL (interleucinas) (BOYLE et al., 1997).

Ainda no que se refere ao endotélio sabe-se que as suas células sob condições normais apresentam a propriedade de repelir os neutrófilos para a circulação, entretanto, as mesmas são substancialmente alteradas durante a hipóxia e, esta alteração leva a uma “ativação celular endotelial” que amplifica o processo inflamatório (BOYLE et al., 1997). Mais especificamente a ativação celular endotelial pode ser diferenciada em 2 fases: na primeira, em resposta a

abrupta restauração do fluxo sanguíneo para os tecidos previamente isquêmicos, estímulos, como das EAO e ativação de fragmentos do complemento, induzem dentro de segundos a minutos a expressão de proteínas pré-formadas dentro do endotélio que promovem a interação celular leucócito-endotelial; e na Segunda em um curso de várias horas, os fatores de necrose tumoral levam a ativação da transcrição de vários genes nas células endoteliais para síntese de produtos proteicos na superfície endotelial (BOYLE et al., 1997; NÜSSLER et al., 2000).

Recentemente, atenção têm sido direcionada para as EAO geradas no período reperfusional com a re-introdução do oxigênio molecular ao tecido previamente isquêmico. Acredita-se que estas EAO adicionem uma significativa disfunção microvascular, como por exemplo, através do recrutamento adicional de leucócitos, fenômeno que se inicia dentro de 3 minutos e atinge um pico em 2 a 3 horas após o início da reperfusão. Uma vez aderidas ao sítio principal da injúria, os neutrófilos são ativados para liberar EAO, que contribuem para um mecanismo de *feedback* positivo (BOYLE et al., 1996; BOYLE et al., 1997; MASSBERG et al., 1998; MENGER, 1995). As EAO assim geradas são citotóxicas devido a sua capacidade de reagir e danificar as células através de uma ação ao nível da membrana celular e ácidos nucleicos resultando em uma severa disfunção e morte celular. Aspecto de extrema importância, é a propriedade das EAO em reagir com os ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolípidos das membranas celulares, resultando na formação de hidroperóxidos, que por sua vez inibem uma série de sistemas enzimáticos. A ação direta das EAO ao nível do endotélio também ocorre

promovendo e estendendo o processo inflamatório, tornando a ativar a reação endotelial e re-iniciando o processo (BOYLE et al., 1997) (Figura 11).

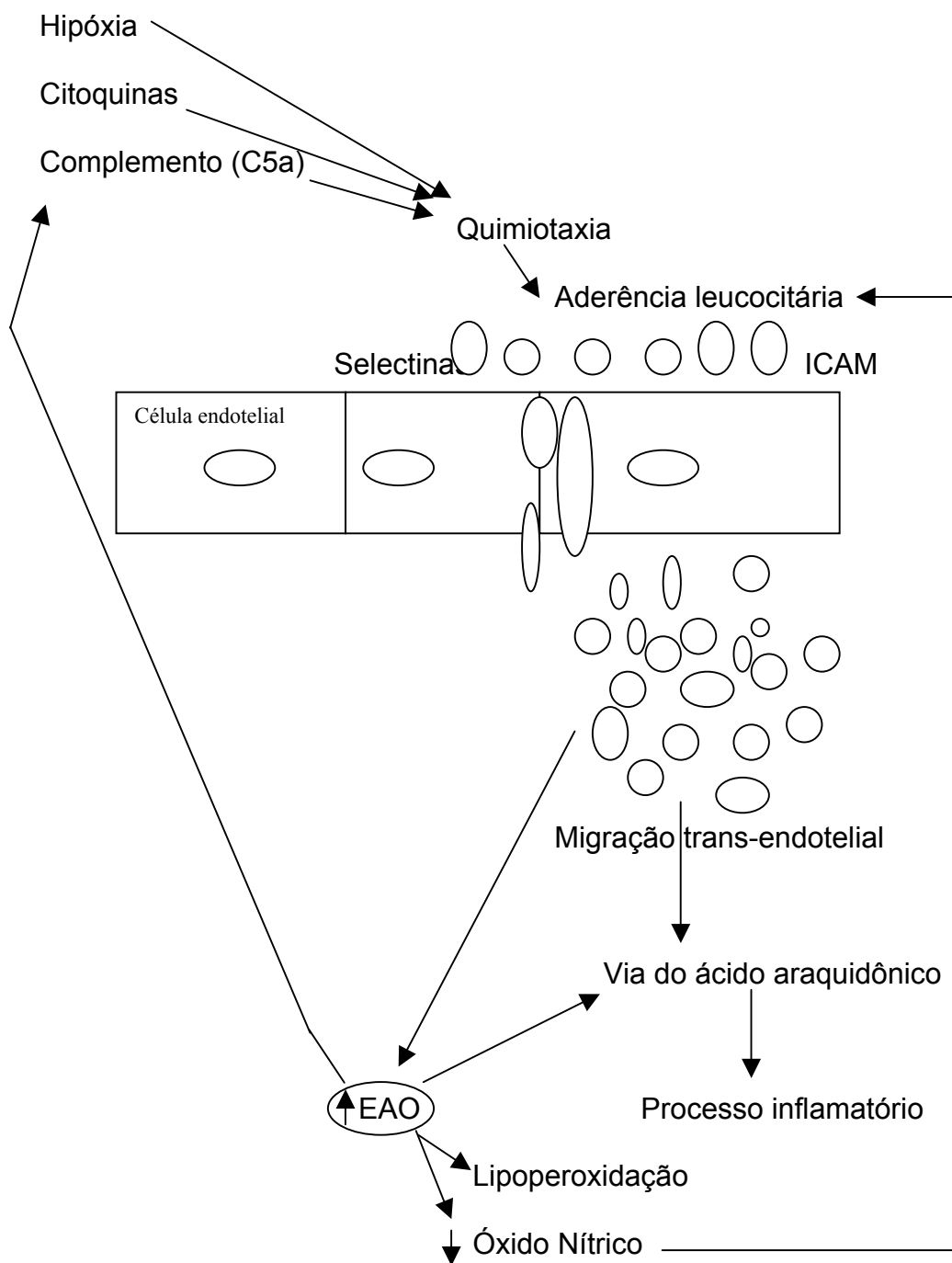


Figura 11- A adesão leucocitária é um processo de várias etapas no qual estão envolvidos uma série de fatores inflamatórios liberados pelo endotélio ativado que levam a migração neutrofílica e os eventos decorrentes (ativação via ácido araquidônico, EAO e interação com NO). ICAM (Molécula de adesão intracelular); EAO (Espécies ativas do oxigênio); IL (Interleucinas); : leucócitos (BOYLE et al., 1997).



A enzima xantina-oxidase apresenta uma participação significativa na produção destas EAO em nível endotelial. Um dos mecanismos através do qual as EAO geradas produzem o acúmulo leucocitário pode ser explicado pela redução da biodisponibilidade do NO, um potente anti-adesivo leucocitário conhecido. As citocinas e EAO podem aumentar a expressão de moléculas adesivas de leucócitos através da mobilização de proteínas de adesão pré-formadas de estoques intra-celulares como a P-selectina, além da possibilidade de indução da transcrição de gens e síntese “de novo” de moléculas adesivas que levam, em última análise, a um maior acúmulo leucocitário. Finalmente, a adesão/ativação, recrutamento leucocitário levam, por sua vez, a liberação de EAO e mediadores pró-inflamatórios (PAF, IL e leucotrienos), iniciando assim um círculo vicioso ao nível da microcirculação (BOYLE et al., 1996; BOYLE et al., 1997; MASSBERG et al., 1998).

2.6.1 - Via da Xantina Oxidase

O mecanismo da xantina oxidase é um dos mais amplamente estudado no que tange a formação de EAO no assim chamado fenômeno isquêmico-reperfusional (PARKS et al., 1983; SOUTHARD et al., 1987; ZAGER & GMUR, 1989; NAUTA et al., 1990; GREENE & PALLER, 1992; KARWINSKI et al., 1993; IMAMURA et al., 1995; RHODEN et al., 1997 a; LINAS et al., 1990). Inicialmente proposto e descrito por Granger et al., 1981, tem recebido muitos adeptos. Entretanto, outros não têm conseguido reproduzir os mesmos resultados,

questionando os seus mecanismos. De acordo com esta hipótese, a forma nativa da enzima xantina oxidase (tipo O) é a enzima xantina deidrogenase (tipo D), enzima que utiliza a nicotinamida adenina (NAD) como acceptor de elétrons e, portanto, não possui capacidade de gerar EAO (McCORD, 1985; McCORD, 1985; NAUTA et al., 1990). Em tecidos normais, 90% da atividade desta enzima existem sob a forma do tipo D (McCORD, 1985; CROSS et al., 1987; RHODEN, et al., 1996 e). Nas situações de isquemia, hipóxia ou qualquer estado de baixo nível energético a forma tipo D é convertida na forma tipo O, enzima que utiliza o oxigênio como acceptor de elétrons e, portanto, capaz de gerar ânions superóxidos, decorrente de uma oxidação sulfidrídica ou proteólise limitada (McCORD, 1985; SOUTHARD et al., 1987; CROSS et al., 1987; NAUTA et al., 1990; PUNCH, 1992; FREDERIKS et al., 1995; RHODEN, et al., 1996 e; RHODEN, et al., 1999 n; RHODEN, et al., 1996 f; RHODEN et al., 1999 k; ELION, 1978). Igualmente, nestas situações, ocorre um decréscimo do conteúdo de ATP, resultado do baixo nível energético ou do consumo de seus substratos em uma situação de anaerobiose (SOUTHARD et al., 1987; ZAGER & GMUR, 1989; GREENE & PALLER, 1992; GÜRKE, 1995). O ATP, na tentativa de manter a atividade energética da célula, é catabolizado em adenosina difosfatada (ADP), adenosina monofosfatada (AMP), inosina e, finalmente, em hipoxantina, que compõe substrato para a ação da xantina deidrogenase-oxidase (CUNNINGHAM et al., 1974; PARKS et al., 1983; PALLER et al., 1984; ZAGER & GMUR, 1989; MARUBAYASHI et al., 1991; COHEN, 1992; GREENE & PALLER, 1992; KARWINSKI et al., 1993; GÜRKE et al., 1995; LEFEBVRE et al., 1995; DI LISA et al., 1995; WILLET et al., 1995; RHODEN, et al., 1999 n). Além disso, com níveis

energéticos extremamente baixos a célula é incapaz de manter os gradientes iônicos transmembrana, elevando, por conseguinte, o cálcio citosólico (DI LISA et al., 1995; McCORD, 1985; HANSSON et al., 1990; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996).

Como exposto acima na ausência de oxigênio e conseqüente redução do nível de energia, as células perdem a capacidade de manter os gradientes iônicos e acúmulos substanciais de cálcio intracelular podem ocorrer (PALLER et al., 1984; CROSS et al., 1987; COHEN, 1992; TAKEMOTO et al., 1994; NICOLLI et al., 1995; WILLET et al., 1995; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996). Altas concentrações de cálcio citosólico podem ativar fosfolipases cálcio-dependentes, resultando em quebras na membrana celular, produção de ácidos graxos e lisofosfolipases tóxicas às células (McCORD, 1985; COHEN, 1992; STEIN et al., 1993; ABROSIO et al., 1995; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996). Proteases, nucleases, glicogênio fosforilase, adenilato ciclase, sódio-potássio ATPase são regulados pelo cálcio e aumentos intracelulares de sua concentração aumentarão a atividade da ATPase, desacoplando a fosforilização oxidativa, com conseqüente depleção energética e menor produção da mesma (McCORD, 1985; CROSS et al., 1987; COHEN, 1992; WILLET et al., 1995).

Portanto, poderia se supor que a elevação incontrolada do cálcio citosólico em tecidos isquêmicos iniciaria uma cascata de eventos deletérios à célula, constituindo causa principal de morte celular (TAKEMOTO et al., 1994; NICOLLI et al., 1995). Entretanto, esta hipótese não é totalmente verdadeira, pelo fato de não haver uma correlação consistente entre o cálcio livre e o conteúdo total do

mesmo, uma vez que muitos sítios e ânions são capazes de se ligar e seqüestrar este eletrólito. Além disso, as mitocôndrias, mesmo lesadas, são capazes de acumular este íon enquanto houver oxigênio e substratos. É também fato que não existe um consenso sobre o momento no qual uma célula isquêmica está irreversivelmente danificada, sabendo-se ainda que a concentração de cálcio em células mortas ou lesadas apresenta-se desuniforme em estudos histológicos (RHODEN, 1997,b).

Entretanto, aspecto concreto é a ocorrência do incremento de cálcio citosólico em células isquêmicas, não sendo, porém, prova suficiente ou inequívoca do seu envolvimento como mediador irreversível do dano celular. Talvez a sua relação como potencializador e participante de outros mecanismos lesivos seja o seu papel principal (HASSELGREN, 1987; HERTLE e GARTHOFF, 1985; TAKEMOTO et al., 1994).

Entre estes, citam-se que as concentrações citoplasmáticas elevadas de cálcio podem ser um dos fatores que disparam uma série de eventos bioquímicos, entre os quais destaca-se a ativação de proteases cálcio-dependentes, que, atuando sobre a xantina deidrogenase, convertem-na em sua forma oxidase (Tipo O) (McCORD, 1985; CROSS et al., 1987; HANSSON et al., 1990; STEIN et al., 1993; FREDERIKS et al., 1995; ABROSIO et al., 1995).

Entretanto, nesta fase a xantina oxidase ainda não é capaz de produzir as EAO. Durante o período isquêmico já pode ter ocorrido dano tecidual em função

das alterações iônicas do cálcio e da proteólise (lesão isquêmica) (ABROSIO et al., 1995). Entretanto, após restabelecida a reperfusão sanguínea arterial e, por conseguinte, ocorrendo um grande afluxo de oxigênio aos tecidos, a oxidação da hipoxantina e xantina é processada e altas proporções de EAO são formadas paralelamente, ultrapassando a capacidade de detoxificação pelos mecanismos endógenos descritos anteriormente (CHIEN et al., 1977; CUNNINGHAM et al., 1974; HANSSON et al., 1982; PARKS et al., 1983; PALLER et al., 1984; McCORD, 1985; HASSELGREN, 1987; SOUTHARD et al., 1987; HANSSON et al., 1990; PUNCH et al., 1992; FRANSSEN et al., 1995). O mecanismo de formação das EAO neste processo é explicado pelo fato da enzima xantina oxidase utilizar o oxigênio molecular (O_2) como um aceptor de elétrons, formando assim o radical superóxido ($\cdot O_2^-$) (KARWINSKI et al., 1993; PUNCH et al., 1992). Além disso, no período reperfusional as células não podem reutilizar a xantina e o ácido úrico para ressíntese do ATP, uma vez que a catálise da hipoxantina em xantina e uratos é irreversível (CUNNINGHAM et al., 1974; ZAGER & GMUR, 1989; NAUTA et al., 1990; GREENE & PALLER, 1992).

O radical superóxido ($\cdot O_2^-$) assim formado segue rotas metabólicas destinadas à formação de outros radicais (RHODEN, et al., 1999 n). Na realidade, a maior toxicidade do radical superóxido provém dos produtos de sua transformação, ou seja, de sua metabolização em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BULKEY, 1983). O peróxido assim formado pode ser detoxificado pela catalase, formando água. Entretanto, quando em contato com ferro (Fe^{+2}) e $\cdot O_2^-$, (Reação

de Fenton) pode reagir formando o radical $\cdot\text{OH}$, extremamente reativo, que associado aos anteriores pode agir sobre os ácidos graxos dos fosfolipídios das membranas celulares determinando a lipoperoxidação (BULKEY, 1983; CROSS et al., 1987; RHODEN, et al., 1999 n; RHODEN et al., 1999 k; RHODEN et al., 1999, l). Por outro lado, o radical hidroxil pode também levar à ativação oxidativo dependente das fosfolipases da membrana celular e, por conseguinte, à liberação, a partir dos fosfolipídios, de intermediários pró-inflamatórios, ou seja, leucotrienos e fator de ativação plaquetária (PAF) mediado ou não pela via do óxido nítrico (BULKEY, 1983; GRISHAM, 1995; LOPEZ-NEBLINA et al., 1996; STORCK et al., 1997; LIU et al., 1996; JEFAYRI et al., 2000; RHODEN, 1997 b; RHODEN et al., a).

2.6.2 - Via do Óxido Nítrico e do Ácido Araquidônico.

Estas duas vias ou sistemas estão intimamente inter-relacionados, haja visto, o que já foi exposto anteriormente. As células endoteliais possuem a capacidade de sintetizar diversas substâncias envolvidas na modulação do tônus vascular e que causam relaxamento muscular e vasodilatação entre os quais podem ser destacados a prostaglandina (PGI_2), a adenosina e o óxido nítrico (MUMTAZ, et al., 2000; SALAZAR et al., 1992; SALAZAR et al., 1993).

Após isquemia e reperfusão a influência do endotélio pode ser perdida através da “down-regulation” ou inativação das prostaglandinas, adenosinas e a liberação do NO pode estar comprometida, aspectos que permitem uma

vasoconstrição sem oposição o que exacerba o insulto isquêmico (BOYLE et al., 1997; RHODEN, et al., 1999 n; HAMMERMAN et al., 1999).

Estes fenômenos podem ocorrer em parte pela ação das EAO, liberadas pelas células endoteliais hipóxicas e neutrófilos aderentes, que são potentes inibidores do NO. Além disso, a hipóxia que se segue a re-oxigenação resulta em uma liberação excessiva de endotelina-1, o vasoconstritor mais potente já identificado (BOYLE et al., 1997; MASSBERG et al., 1998; EL-WAHSH et al., 1997; CHIEN et al., 1999; BRETAN et al., 1997; SUBRAMANIAN et al., 1999; STORCK et al., 1997; LIU et al., 1996).

As EAO podem causar lesões sobre o endotélio que reveste o sistema vascular o que pode levar, por conseguinte, a um extravazamento de plasma e células sanguíneas (leucócitos) para a área previamente isquêmica (LAND et al., 1998; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1999; MUELLER et al., 2000; GUO et al., 2000; NÜSSLER, et al., 2000; LANGREHR, et al., 2000). Estes aspectos poderiam ser o fator desencadeante chave para o dano reperfusional (BAKER, et al., 1985; WAZ et al., 1998). O dano endotelial decorrente, poderia prejudicar ou impedir uma liberação adequada do fator de relaxamento endotelial derivado (EDRF) que tem sido identificado como sendo o NO (NAYLOR, 1998; CHINTALA et al., 1993). O NO é produzido a partir de um aminoácido semi-essencial L-arginina e oxigênio molecular, quando este é convertido em L-citrulina, pela enzima constitutiva cálcio-dependente óxido nítrico sintase (NOS) nas células endoteliais (KOBAYASHI, et al., 1994; WAZ et al., 1998; MUMTZ et al., 2000; NAYLOR, 1998; TAKAHASHI et

al., 1998; FORSTERMANN et al., 1994). As enzimas NOS podem ser classificadas em duas categorias: a) Constitutivas (cNOS) que se caracterizam por serem cálcio e calmodulina dependentes e contém flavina, fosfatos dinucleotídeos de adenina e tetrahidrobiopterina e produzem pequenas quantidades de NO (LANGREHR et al., 1993; FORSTERMANN et al., 1994; LOSONCZY et al., 1997). Esta enzima apresenta expressão nas células endoteliais (eNOS), neuronais (nNOS), células β pancreáticas, mastócitos e plaquetas (LANGREHR et al., 1993; ISOBE et al., 1998; MUMTZ et al., 2000; ISOBE et al., 1999; NAYLOR, 1998); b) Induzível (iNOS) que requer co-fatores similares aos descritos acima e é cálcio e calmodulina-independente (LANGREHR et al., 1993; FORSTERMANN et al., 1994; LOSONCZY et al., 1997). Tem sido identificada em um grande número de células como os macrófagos, células de Kupffer, hepatócitos, fibroblastos, células endoteliais, condrócitos e apresentam a característica de produzir grandes quantidades de NO (LANGREHR et al., 1993; ISOBE et al., 1998; MUMTZ et al., 2000; ISOBE et al., 1999; NAYLOR, 1998)

O NO é amplamente reconhecido como sendo um mensageiro intra e intercelular difusível que passa através da maioria das células e tecidos com baixa consumo energético ou como tendo a propriedade de reagir diretamente (DEMIYUREK et al., 1998; LANGREHR et al., 1993). A síntese do NO através da via metabólica L-arginina/NO pode ser induzida nas células inflamatórias por várias citocinas envolvidas na resposta induzida pela isquemia transitória, incluindo as interleucinas (IL-1 e IL-2), fatores de necrose tumoral e outros

mediadores inflamatórios (BHARDWAJ et al., 1989; CONNOLLY et al., 1995; TAKAHASHI et al., 1998; MUELLER et al., 2000; GUO et al., 2000; NÜSSLER, et al., 2000; LANGREHR, et al., 2000).

Evidências recentes sugerem várias ações para o NO e, também, o seu envolvimento em uma série de estados fisiopatológicos. Entretanto, há ainda uma série de controvérsias no que tange ao(s) real(is) mecanismo(s) de ação do NO em uma série de situações fisiológicas ou patológicas (KOBAYASHI, et al., 1994; NAYLOR, 1998; HIGA et al., 1998; LANGREHR et al., 1993; LOSONCZY et al., 1997; BURRA e al., 1997; CERNADAS et al., 1992; RHODEN et al., 1997 i; RHODEN et al., 1997 g; DAGHER et al., 1995).

No sistema vascular, o NO liberado pelo endotélio vascular é responsável por uma ação regulatória da tonicidade dos vasos sanguíneos (aumentado as concentrações intra-celulares de GMPc) regulando o fluxo sanguíneo aos tecidos (fator relaxante endotélio derivado), assim como, por uma inibição da agregação plaquetária e aderência e ativação neutrofílica e geração de EAO. Além disso, age também como controlador da liberação de produtos citotóxicos com ação vasoconstritora (leucotrienos, citoquinas e prostaglandinas) e um efeito citoprotetor direto nas células endoteliais durante a reação inflamatória (DEMIYUREK et al., 1998; ISOBE et al., 1999; NAYLOR, 1998; GARCIA-CRIADO et al., 1998; BURRA et al., 1997; USHIGOME et al., 1998; LANGREHR et al., 1993; CERNADAS et al., 1992; NÜSSLER, et al., 2000; LANGREHR, et al., 2000; CHINTALA et al., 1993; LOSONCZY et al., 1997; JEFAYRI et al., 2000; STORCK

et al., 1997; LIU et al., 1996). Por outro lado, especificamente no que se refere ao estresse oxidativo, o NO por apresentar um elétron desemparelhado na camada mais externa, possui a capacidade de interagir com outra molécula, podendo funcionar com aceptor de elétrons de espécies radicais e, portanto, exercer uma ação de *scavenger* do ânion superóxido, atuando, portanto, como uma barreira extracelular contra ação citotóxica das EAO (WAZ et al., 1998; KOBAYASHI, et al., 1994). Todas estas ações interferem de alguma forma, benéficamente, no fenômeno isquêmico-reperfusional (Figura 12).

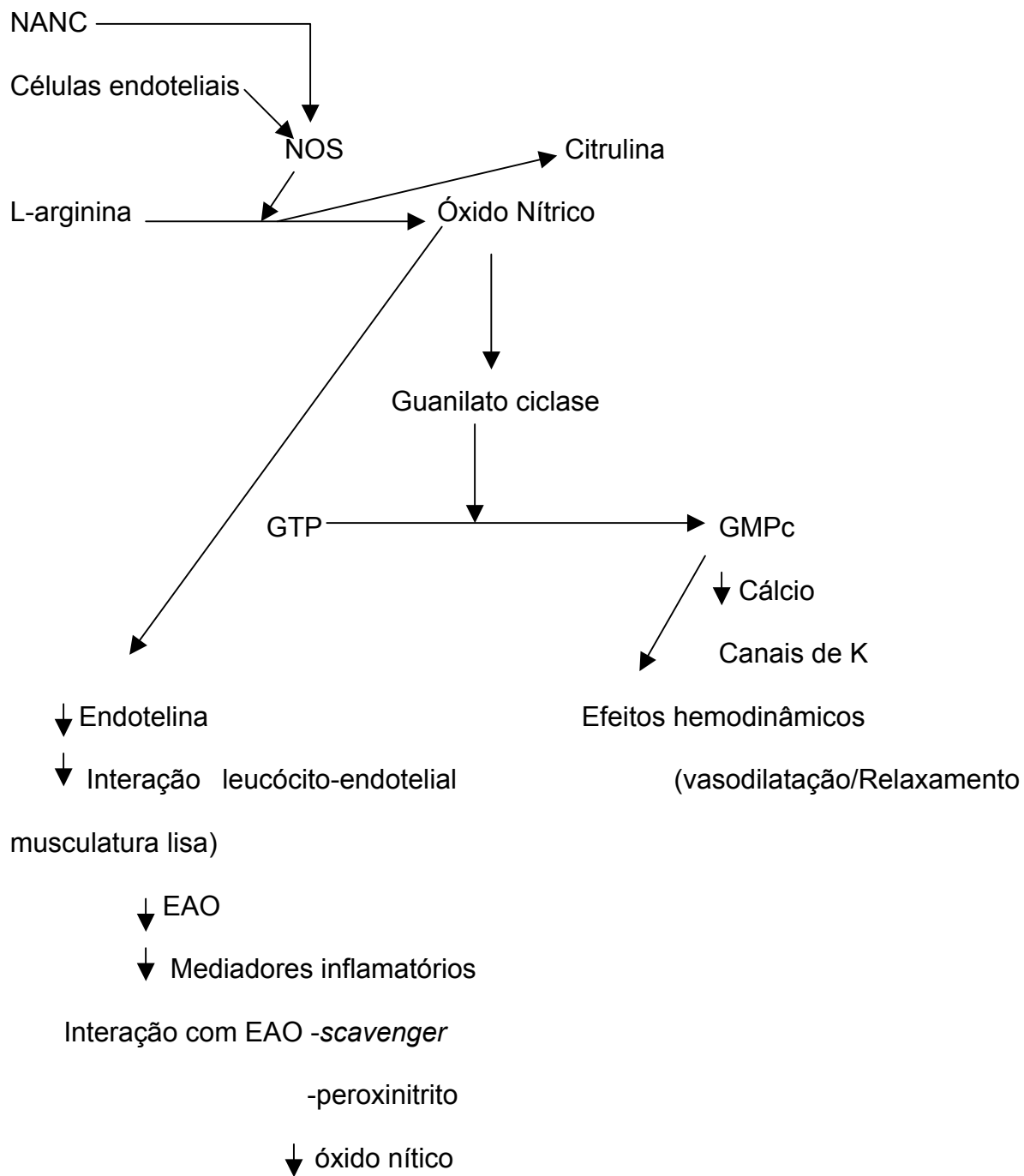


Figura 12- Vias metabólicas envolvidas na síntese do óxido nítrico (NO) e suas ações diretas e mediadas pela guanosina monofosfatada cíclica (GMPc); eventos relacionadas entre o NO com a adesão leucocitária, EAO, endotelina. GTP (guanosina Trifosfatada); EAO (Espécies ativas do oxigênio); NOS (óxido nítrico sintase); NANC (Neurônios não-adrenérgico não-colinérgico) (BOYLE et al., 1997).

Embora exista uma produção endógena basal e conforme a demanda de NO e que, portanto, pode agir como *scavenger* de EAO de uma forma contínua, esta produção não parece ser suficiente para esta finalidade, haja visto que a síntese endógena do mesmo não foi capaz de evitar a ocorrência de produtos de lipoperoxidação (KOBAYASHI, et al., 1994; LOSONCZY et al., 1997; JEFAYRI et al., 2000).

Por outro lado, como o NO é instável eletricamente, pelo fato de apresentar um elétron desemparelhado na sua camada orbital mais externa, o que lhe condiciona uma possível ação citotóxica quando da sua interação com espécies radicais (DEMIYUREK et al., 1998). Na realidade, o NO em função do exposto é uma espécie radical porém não é altamente reativa quando considerado isoladamente. Entretanto, pode reagir rapidamente com um seleto grupo de outros radicais e com metais de transição como o ferro da hemoglobina (DEMIYUREK et al., 1998). Estes aspectos podem ser observados por exemplo quando da interação do NO com o radical superóxido que pode levar a produção de peroxinitrito, um poderoso oxidante com uma reatividade similar ao do radical hidroxil (DEMIYUREK et al., 1998; KOBAYASHI, et al., 1994; CAMELO et al., 1996).

Evidências recentes sugerem que o peroxinitrito é elemento importante em várias formas de injúrias isquêmico-reperfusionais, podendo interferir

significativamente na capacidade contrátil do coração quando o mesmo é submetido a uma isquemia normotérmica transitória (MUMTZ et al., 2000; DEMIYUREK et al., 1998; CAMELO et al., 1996). Além disso, embora não seja uma forma radical, o peroxinitrito poderia exercer efeitos oxidativos diretos sobre uma variedade de biomoléculas como sulfatos, tióis, lipídeos, ascorbato, proteínas, carbo-hidratos e ácidos nucleicos, causando em última análise lipoperoxidação e nitrosilação (DEMIYUREK et al., 1998; ISOBÉ et al., 1999). Estas ações podem ocorrer também de forma indireta, ou seja, o peroxinitrito depleta as concentrações de glutatíon através de um mecanismo mediado pela enzima proteína quinase C-dependente nas células endoteliais da artéria pulmonar, tornando as células sensíveis a outros oxidantes. Além disso, uma reação com a SOD tem sido demonstrada e referida por vários autores (DEMIYUREK et al., 1998; ISOBÉ et al., 1999). Ou seja, sabe-se que em situações normais o NO é produzindo conforme a demanda e em concentrações nanomolares (5-10 nM) que são insuficientes para reagir ou competir com a SOD. Em concentrações micromolares o NO pode inibir o citocromo c oxidase, o que poderia aumentar transitoriamente o efluxo de radicais superóxidos a partir da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria (MUMTZ et al., 2000; DEMIYUREK et al., 1998; ISOBÉ et al., 1999). Além disso, quando a concentração de NO ultrapassa a concentração da SOD mitocondrial, o NO reagiria com o superóxido mitocondrial formando o peroxinitrito, levando a uma lesão irreversível da organela (DEMIYUREK et al., 1998; ISOBÉ et al., 1999; MUMTZ et al., 2000). Por outro lado, estudos demonstram que a inibição da atividade da ADP ribose sintase é importante na redução da extensão do infarto muscular esquelético e cardíaco e

em situações de isquemia e reperfusão. O peroxinitrito agiria, nestas situações, como um potente estímulo para a atividade da ADP ribose sintase através de uma ação direta sobre a indução DNA da célula (DEMIYUREK et al., 1998).

Além disso, vários outros fatores como os infiltrados neutrofílicos têm também sido arrolados no fenômeno isquêmico-reperfusional, e a possibilidade do NO inibir a produção de radicais superóxidos pelos neutrófilos, através de uma ação direta sobre a NADPH oxidase tem sido aventada. Além disso, o NO tem a propriedade de exercer uma atividade modulatória (*down-regulation*) da interação entre leucócitos e células endoteliais, além de diminuir a migração e agregação leucocitária (neutrófilos) e plaquetária interferindo, desta forma, no fenômeno de “ativação celular endotelial” que envolve o via do ácido araquidônico e a consequente produção de mediadores do processo inflamatório como já descrito anteriormente (LINAS et al., 1988; ISOBE et al., 1998; BULKEY, 1983; PUNCH et al., 1992; BROWSE et al., 1994; IMAMURA et al., 1995; GRUNFELD et al., 1995; KOBAYASHI et al., 1995; ALEXANDER, 1996; BOYLE et al., 1997). Também uma ação inibitória sobre a endotelina, um potente fator vasoconstritor, tem sido demonstrada por substâncias doadoras de NO, como, por exemplo, o nitroprussiato de sódio (LOPEZ-NEBLINA et al., 1996; KOBAYASHI, et al., 1994) (Figura 13).

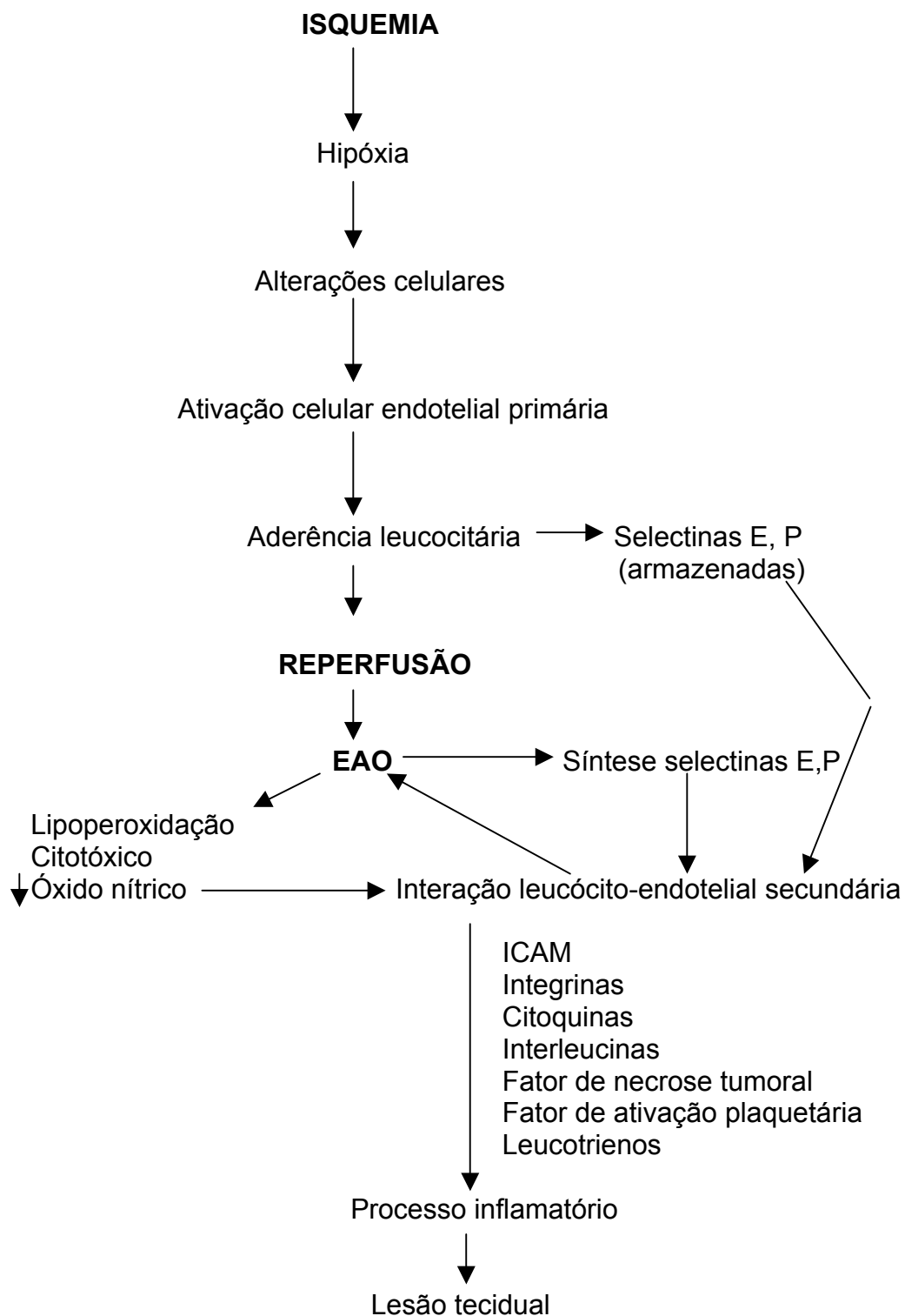


Figura 13- Representação esquemática das diversas etapas que envolvem o processo inflamatório no fenômeno isquêmico-reperfusional e a inter-relação das

diferentes etapas com o NO, EAO e mediadores inflamatórios. EAO (Espécies ativas do oxigênio); ICAM (Molécula de adesão intracelular) (BOYLE et al., 1997).

A interferência nos eventos metabólicos que envolvem o NO ainda não estão completamente estabelecidos e como descrito acima muitas vezes complexos. Por exemplo, quando a relação $\cdot\text{O}_2^-/\text{NO}$ aumenta, isto é, por superprodução de superóxido ou por diminuição da produção de NO (inibidores da óxido nítrico sintase - L-NAME - N^G - nitro-L-arginina metil éster), o $\cdot\text{O}_2^-$ é espontânea ou enzimaticamente deslocado para a reação de dismutação, com conseqüente formação de H_2O_2 (GRISHAM, 1995). A produção excessiva de $\cdot\text{O}_2^-$ e de H_2O_2 , em presença da atividade redox ativa, tal como ferro, promoverá a formação de $\cdot\text{OH}^-$ (reação de Fenton), com conseqüente ativação oxidante-dependente da via do ácido araquidônico e a subsequente liberação de fosfolipase A_2 e formação de mediadores pró-inflamatórios, como leucotrienos e PAF, aumentando a migração de polimorfonucleares nas vênulas pós-capilares e o efluxo de proteínas na microvasculatura (GRISHAM, 1995; TAKAYAMA et al., 1994; GRUNFELD et al., 1995; KOBAYASHI et al., 1995; PUNCH et al., 1992; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996; KOBAYASHI, et al., 1994; FOSCHI et al., 1993; RIERA et al., 1999).

Além disso, diversos estudos que envolvem o uso de substâncias quelantes de ferro, como a desferoxamina, de inibidores da síntese do NO, de diversos antiinflamatórios (corticóides, diclofenaco de sódio) e de substâncias detoxificadoras das espécies radicais, interferindo em etapas específicas destas rotas inter-relacionadas, efetuadas em diversos experimentos, comprovam os

mecanismos envolvidos na geração, no destino e nas ações das EAO formadas (GRISHAM, 1995; CONNOLLY et al., 1995; TAKAYAMA et al., 1994; GRUNFELD et al., 1995; KOBAYASHI et al., 1995; ROSENBLUM et al., 1989; SAITO e MIYAGAWA, 1999) (Figura 14). Além disso, substâncias como o nitroprussiato de sódio, através da sua ação modulatória sobre o NO, foram capazes de reduzir significativamente o efluxo leucocitário a partir do endotélio capilar em situações de isquemia e reperfusão renal em ratos, melhorando os parâmetros funcionais do rim, reforçando o envolvimento destas rotas no fenômeno isquêmico reperfusional (LOPEZ-NEBLINA et al., 1996).

A partir do exposto acima pode-se observar que o NO pode apresentar efeitos citotóxicos e benéficos, fisiopatologicamente em diversas situações entre as quais o fenômeno isquêmico-reperfusional de forma que as suas ações não estão completamente definidas (ISOBE et al., 1999).

ISQUEMIA

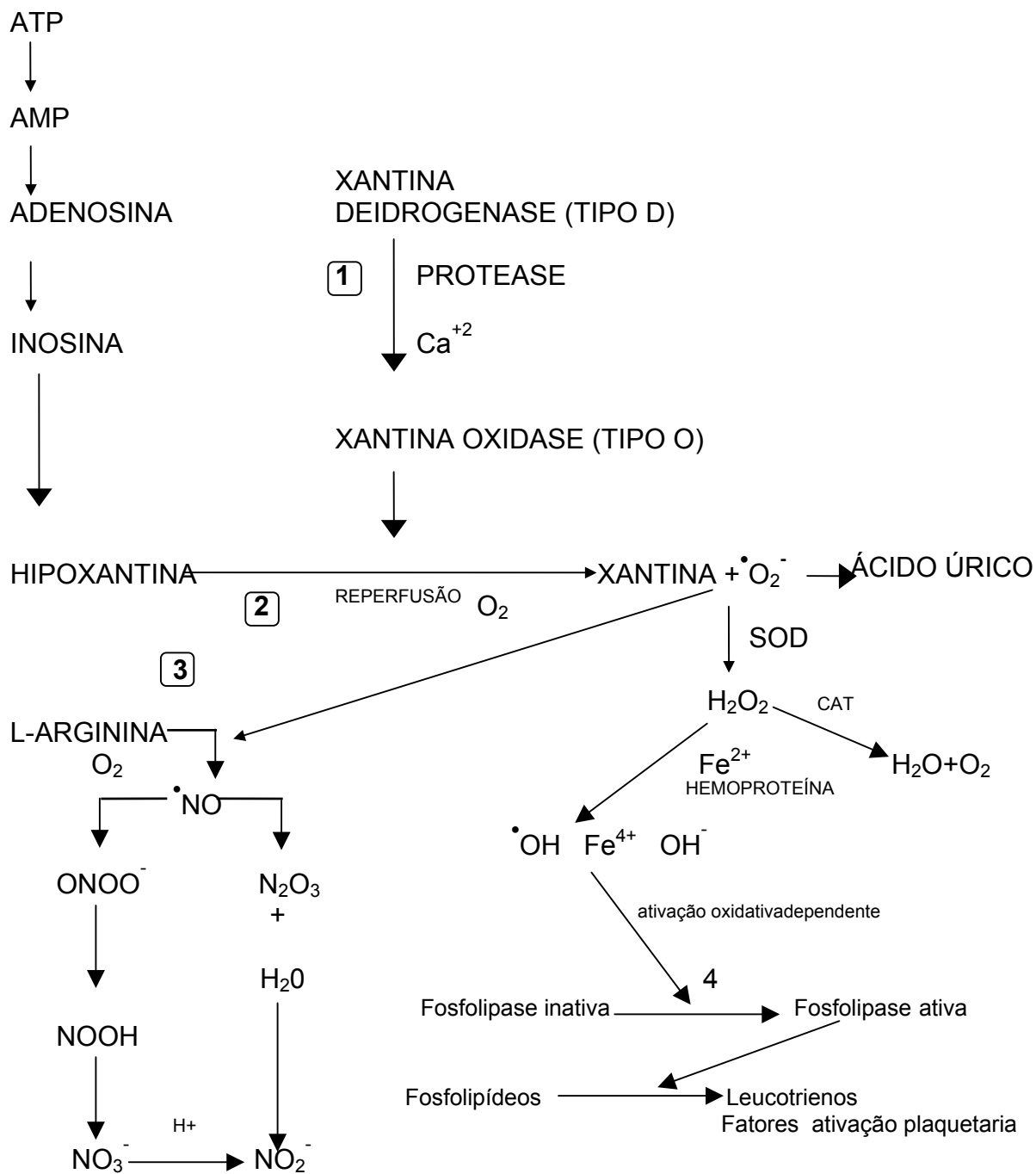


Figura 14 - Principais rotas metabólicas envolvidas na geração de Espécies Ativas do Oxigênio pela isquemia e reperfusão. Durante a isquemia produtos de Adenosina Trifosfatada (ATP) são degradados até a hipoxantina, substrato para a

ação da enzima xantina oxidase tipo O (formada a partir da deidroxantina oxidase tipo D por uma proteólise limitada em presença de cálcio) levando à formação de uratos e radicais superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) (Via da Xantina oxidase). Reação de dismutação: radical superóxido é convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2); Catalase converte H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio molecular (O_2). Reação de Fenton: H_2O_2 em presença de metais de transição (ferro, hemoproteínas) origina o radical hidroxil com atividade oxidativa e pode ativar a fosfolipase originando (leucotrienos e fatores de ativação plaquetária, entre outros - via do ácido araquidônico). O óxido nítrico pode agir como detoxificador do radical superóxido, formando nitrato (NO_3^-), a partir da decomposição de peroxinitrito (ONOO) (agente citotóxico), produto de formação transitória, ou através da formação de óxido nítrico (N_2O_3), em presença de oxigênio e água do meio (via do óxido nítrico). 1: Inibidores da tripsina; 2: Inibidores da xantina oxidase; 3: Óxido nítrico sintase ou produtos que estimulassem a formação de óxido nítrico; 4: Inibidores da lipo ciclooxygenase consistem em formas racionais de interferir nestas rotas (GRISHAM, 1995; NUNES, 1995; NAUTA et al., 1990; DEL MAESTRO, 1980; CROSS et al., 1987; GRUNFELD et al., 1995).

2.7 - EFEITOS DE SUBSTÂNCIAS FARMACOLÓGICAS NO CONTROLE E EFEITOS DAS ESPÉCIES ATIVAS DO OXIGÊNIO (EAO)

Estudos experimentais diversos têm sido efetuados no sentido de respaldar a teoria da xantina oxidase na geração das EAO. O primeiro destes, efetuado em intestino de ratos, mostrou que a administração de SOD (*scavenger* de EAO) preveniu o aumento da permeabilidade capilar de ratos submetidos a uma isquemia parcial da artéria mesentérica por um período de 30 minutos (CROSS et al., 1987). Outras drogas, como alopurinol, inibidor da xantina oxidase, também testado em modelos de isquemia similares, mostraram efeito protetor superior aos grupos não-tratados (ZAGER & GMUR, 1989; GREENE & PALLER, 1992; COHEN, 1992; KARWINSKI et al., 1993). Estudos em diferentes órgãos, como fígado, coração, rins, músculo esquelético, pâncreas e pele de ratos, têm

evidenciado as mesmas características gerais envolvidas no mecanismo de geração de EAO mediadas pela via da xantina oxidase (HIRASAWA et al., 1978; PARKS et al., 1983; NORDSTRÖM et al., 1985; MARUBAYASHI et al., 1986; NAUTA et al., 1990; MARUBAYASHI et al., 1991; COHEN, 1992; KARWINSKI et al., 1993; FOSCHI et al., 1993; MATHEWS et al., 1994; RINALDI et al., 1995; OREDSSON et al., 1995; DREWS et al., 1995; FREDERIKS et al., 1995).

Os efeitos do alopurinol têm sido demonstrados em várias situações de isquemia e hipóxia tecidual induzidas, experimentalmente, em animais de laboratório com resultados as vezes conflitantes (CUNNINGHAM et al., 1974; PARKS et al., 1983; ZAGER & GMUR, 1989; KARWINSKI et al., 1991; MARUBAYASHI et al., 1991; COHEN, 1992; GREENE & PALLER, 1992; KARWINSKI et al., 1993; RINALDI et al., 1995; GÜRKE et al., 1995; RHODEN, 1997).

Estes aspectos podem ser claramente observados no trabalho desenvolvido por Cunningham et al., 1974, no qual a queda na concentração tissular de ATP, ADP e AMP estava diretamente relacionada com o tempo de isquemia renal induzida em ratos, avaliado através de reações enzimáticas que dependem de energia para se processar, quando homogeneizados de tecidos renais eram expostos a determinadas substâncias. Aspecto de grande relevância observado neste experimento (CUNNINGHAM et al., 1974) é o fato de que em animais pré-tratados com uma substância inibidora da xantina oxidase, o alopurinol, as concentrações teciduais das adeninas fosfatadas foram maiores e as reações,

que necessitavam de energia para ocorrer, se fizeram de uma maneira mais completa e rápida. Também no nosso meio demonstramos efeitos benéficos do alopurinol na isquemia e reperfusão hepática em ratos em diversos aspectos, salientando-se, principalmente no que se refere a taxa de lipoperoxidação das membranas celulares dos hepatócitos e a taxa de mortalidade decorrente da evolução dos animais pós-isquemia normotérmica transitória (RHODEN, et al., 1996 e; RHODEN, 1997 a ;RHODEN, et al., 1999 m; RHODEN, et al., 1999 l; RHODEN et al., 2000 p).

Também no rim submetido a isquemia normotérmica transitória a inibição da enzima xantina-oxidase pelo alopurinol foi benéfica em termos de preservação da função renal e taxa de lipoperoxidação de membranas celulares renais em ratos (RHODEN, et al., 1997 i; RHODEN et al., 1998 j; RHODEN et al., 1999 k).

Estudos com órgãos isolados como o coração, freqüentemente envolvido em processos de isquemia e reperfusão, mostraram a liberação da enzima creatinofosfoquinase quando este era perfundido com substâncias oxigenadas, o mesmo não ocorrendo, ou ocorrendo em menores proporções, quando substâncias não-oxigenadas eram perfundidas ou quando eram utilizadas substâncias de detoxificação de EAO (SOD, CAT) ou inibidores da xantina oxidase (CUNNINGHAM et al., 1974; HANSSON et al., 1982; McCORD, 1985; CROSS et al., 1987; MASSBERG et al., 1998).

Um grande número de substâncias farmacológicas, baseadas nos mecanismos hipotéticos de formação das EAO, têm sido utilizadas com o intuito de reduzir a formação das mesmas EAO e, conseqüentemente, reduzir a injúria celular decorrente da isquemia e reperfusão (HIRASAWA et al., 1978; MARUBAYASHI et al., 1986; HASSELGREN, 1987; MARUBAYASHI et al., 1991; COHEN, 1992). Entre estas citam-se a coenzima Q₁₀, alopurinol, alfa-tocoferol e glutationa, que agiriam especificamente sobre a formação das EAO (CUNNINGHAM, 1974; DEL MAESTRO, 1980; HANSSON et al., 1982; McCORD, 1985; MARUBAYASHI et al., 1986; COHEN, 1992; DEFRAIGNE et al., 1995; MARUBAYASHI et al., 1986; MARZI et al., 1992). Substâncias como a N-Acetilcisteína, agindo no sentido de promover o aumento da glutationa intracelular, têm sido referidas também como possuidoras de um potencial benéfico (ORTOLANI et al., 1995). Outras, como glucagon, dopamina, hidralazina, cloridrato magnésico de adenosina trifosfatada (ATP-MgCl₂) e prostaglandinas E1, atuam melhorando o fluxo sangüíneo ao órgão e evitando o fenômeno de vasoespasmo pós-isquêmico (HIRASAWA et al., 1978; HASSELGREN, 1987). Substâncias como corticosteróides e anti-inflamatórios não-esteróides agiriam estabilizando a membrana celular e de elementos subcelulares, através de sua interferência na via do ácido araquidônico (HASSELGREN, 1987; TAKAYAMA et al., 1994; DEFRAIGNE et al., 1995; DESCOTES et al., 1995). A heparina, em função de sua ação anticoagulante, que evita a deposição de fibrina, e através de mecanismos ainda não bem definidos, também tem sido proposta como possuindo ação protetora contra as EAO formadas na isquemia e reperfusão (NILSSON et al., 1993). Os bloqueadores dos canais de cálcio (lidoflazina, verapamil) e drogas

como a clorpromazina, que interferem no influxo de cálcio durante o processo isquêmico, também têm sido apresentados como elementos capazes de exercer algum grau de proteção de órgãos e tecidos contra as EAO (HANSSON et al., 1990; STEIN et al., 1993; LEFEBVRE et al., 1995; DREWS et al., 1995; FREDERIKS et al., 1995; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996; PAPADIMITRIOU et al., 1994). A ciclosporina, agindo especificamente nos poros mitocondriais, evitando o acúmulo de cálcio no interior destas organelas e, conseqüentemente, mantendo a sua homeostase, foi postulada como tendo efeito protetor em situações de isquemia e reperfusão, haja visto serem as mitocôndrias o principal sítio energético das células (NICOLLI et al., 1995; WILLET et al., 1995).

O nitroprussiato de sódio, agindo pela mediação do óxido nítrico, diminuiria a interação leucocitária com a superfície endotelial, reduzindo assim, o efluxo celular inflamatório (KOBAYASHI et al., 1995; LOPEZ-NEBLINA et al., 1996).

A utilização de anticorpos monoclonais, direcionados contra moléculas de adesão leucocitária e prevenindo a ação de mediadores pró-inflamatórios (antagonistas de fatores de ativação plaquetária, inibição da síntese e ação de leucotrienos, inibidores das selectinas), tem demonstrado resultados alentadores, o que respalda a teoria inflamatória associada ao fenômeno isquêmico-reperfusional (MASSBERG et al., 1998; MENGER, 1995).

Entretanto, a via do óxido nítrico é, atualmente, o grande enigma do fenômeno isquêmico-reperfusional com resultados ainda não completamente

definidos no que tange as possíveis interferências do mesmo nas características hemodinâmicas neste fenômeno, bem como, a interação do mesmo com as EAO. O uso de substâncias inibidoras da síntese do NO, a partir do substrato L-arginina, bem como, o estímulo de sua síntese e a observação dos efeitos decorrentes são as formas principais empregadas para compreender a ação desta via metabólica e seus mediadores (WAZ et al., 1998; MASSBERG et al., 1998; MUMTAZ et al., 2000; HAMMERMAN et al., 1999; JEFAYRI et al., 2000).

2.8 - EFEITOS DA ISQUEMIA E REPERFUSÃO NA INJÚRIA RENAL

A despeito de medidas intensivas normalmente utilizadas quando da necessidade transitória da isquemia renal, uma substancial porcentagem de casos apresentam uma imediata lesão decorrente desta (BAKER, et al., 1985). O dano advindo da isquemia e reperfusão renal é caracterizado por um decréscimo no fluxo sanguíneo renal, diminuição da taxa de filtração glomerular e do coeficiente de ultrafiltração capilar glomerular (WAZ et al., 1998; SALAZAR et al., 1992). Além disso, ocorre uma significativa disfunção tubular, decorrente da obstrução dos túbulos renais por células e debris, refluxo retrógrado intersticial do filtrado glomerular, ambos decorrentes do dano epitelial tubular (WAZ et al., 1998). Portanto, estes aspectos podem ser sumarizadas em uma entidade clínica denominada de necrose tubular aguda, embora reversível apresenta efeitos deletérios a longo prazo e insuficiência renal crônica pode eventualmente ocorrer (BAKER, et al., 1985; WEINBERG, 1991; YIN et al., 1995; WAZ et al., 1998; SHOSKES et al., 1997; DESCOTES et al., 1995; ILLNER e LAND, 1998). Estima-

se, por exemplo, que este fenômeno ocorra em aproximadamente 30 a 60% dos rins transplantados oriundos de cadáveres e em 10% dos doadores vivos, mesmo quando adotados todos os mecanismos disponíveis para preservação de órgãos nestas situações.

Muitos potenciais fatores de injúria celular relacionados ao fenômeno isquêmico-reperfusional têm sido arrolados entre os quais destacam-se: a depleção de ATP, degradação fosfolipídica da membrana plasmática, ativação de sistemas autolíticos, acidose celular, lesão da membrana e disfunção mitocondrial induzida por superóxidos e, o infiltrado inflamatório que se processa e as consequências decorrentes (SHRAMM et al., 1994; YU et al., 1994; KIN et al., 1995; ISOZAKI et al., 1992; ZAGER & GMUR, 1989; GREENE & PALLER, 1992; WILLET et al., 1995; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996; BAKER et al., 1985).

Entretanto, mais recentemente têm-se observado e demonstrado, em diversos estudos experimentais e clínicos, que a reperfusão que se segue a um período de isquemia transitória é, na realidade, tão ou mais deletério ao órgão que o período isquêmico, propriamente dito (BAKER, et al., 1985).

Neste contexto, evidências crescentes sustentam o envolvimento das EAO na injúria renal pós-isquêmica, porém de avaliação indireta, tendo em vista que os radicais livres são instáveis, altamente reativos e a sua mensuração é difícil. Vários estudos *in vivo*, com disfunção renal reversível tem demonstrado as seguintes observações que se seguem e respaldam os aspectos descritos (MENGER, 1995):

-re-oxigenação após isquemia transitória está associada a formação de vários bio-produtos de EAO e lipídeos das membranas (produtos da peroxidação lipídica).

-consumo de anti-oxidantes endógenos teciduais renais ocorrem durante reperfusão e não durante a isquemia.

-agentes que diminuem os níveis teciduais de EAO atenuam a injúria causada pela isquemia renal transitória (MENGER, 1995).

Baseado nestas observações e nos mecanismos fisiopatológicos propostos para explicar as complexas consequências e efeitos do fenômeno isquêmico-reperfusional, distintos regimes terapêuticos podem ser instituídos de uma forma racional com o intuito de interferir em rotas ou etapas específicas da injúria associado a isquemia e reperfusão, e podem consistir no uso de: 1) anticorpos monoclonais diretamente contra moléculas de adesão específicas (CD11b/CD18 ou ICAM-1); 2) anti-oxidantes e *scavengers* de espécies radicais livres; 3) inibidores da síntese e ou de antagonistas de receptores para mediadores lipídicos. Além disso, o refluxo-paradoxal pós-isquêmico pode também ser atenuado por intervenções específicas, tais como a hemodiluição isovolêmica com colóides ou a administração de soluções hipertônicas e hiper-oncóticas. Por exemplo, evidências em estudos recentes demonstram que a adesão leucocitária pós-isquêmica é significativamente reduzida pelo decréscimo do hematócrito sistêmico, para aproximadamente 30%, através de uma hemodiluição com dextram 60 (MENGER, 1995).

Entretanto, o fenômeno isquêmico-reperfusional é, certamente, multifatorial e o envolvimento das EAO derivadas do metabolismo anormal do oxigênio é um dos prováveis fatores determinantes da patogênese da injúria dela decorrente (PARKS et al., 1983; CROSS et al., 1987;

DEFRAIGNE et al., 1995; DESCOTES et al., 1995; MENGER et al., 1995; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996). Estudos distintos respaldam o mecanismo das EAO, evidenciando efeitos benéficos de anti-oxidantes e, por outro lado, exacerbação do dano na deficiência destes, assim como o fato da LPO ser evento bem caracterizado neste fenômeno (GREENE & PALLER, 1992; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1999; LAND et al., 1998 LAND et al., 1997).

Como exposto as EAO tem sido implicadas como mediadoras do dano tecidual durante situações que envolvem períodos transitórios de isquemia acompanhados, obviamente pela reperfusão, em uma série de modelos experimentais, incluindo a isquemia miocárdica, isquemia e reperfusão intestinal, pulmonar, hepática, enxertos cutâneos e em uma variedade de outros sistemas (CHAVEZ-CARTAYA et al., 1999; LAND et al., 1998 LAND et al., 1997; BAKER, et al., 1985; RHODEN , 1997 a; RHODEN et al., 2000 p; ISOZAKI et al., 1992; KIN et al., 1995).

Especificamente no nível renal, a isquemia é uma causa comum de insuficiência renal aguda, embora as bases bioquímicas deste processo permaneçam indefinidas (CROSS et al., 1987). As células dos túbulos renais possuem uma densidade alta de organelas mitocondriais, que apresentam defeitos estruturais e funcionais na insuficiência renal aguda (PALLER et al., 1984; CROSS et al., 1987). Uma combinação de vasoconstrição renal, obstrução tubular, reabsorção tubular retrógrada do filtrado glomerular e decréscimo da permeabilidade glomerular têm sido referidos (PALLER et al., 1984). Entretanto, a natureza da injúria celular que produz estas alterações é desconhecida (PALLER

et al., 1984). A atividade da enzima xantina oxidase e o metabolismo do ácido araquidônico são muito intensos nos tecidos renais (CROSS et al., 1987; LOPEZ-NEBLINA et al., 1996). Diversas células renais, como as endoteliais, epiteliais dos túbulos e leucócitos infiltrados contêm quantidades substanciais de xantina oxidase, que também está presente no sangue (GREENE & PALLER, 1992). Portanto, é provável que a xantina oxidase seja ativada na injúria decorrente do fenômeno isquêmico-reperfusional (HANSSON et al., 1982; SOUTHARD et al., 1987; CROSS et al., 1987; RHODEN, et al., 1998 j; RHODEN, et al., 1999 k).

Um decréscimo do nível de energia celular leva a um balanço anormal dos metabólitos intracelulares e a uma disfunção da membrana celular (CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996). A bomba de cálcio exibe uma considerável alteração em sua função, levando a um aumento do cálcio citosólico e de todas as atividades metabólicas cálcio-dependentes, como a ativação de sistemas enzimáticos, entre os quais, por exemplo, o das fosfolipases, com conseqüente dano produzido pela degradação fosfolipídica e alteração da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria (WILLET et al., 1995; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996). Além da perda da capacidade de síntese celular, células endoteliais são ativadas, induzindo a alterações na microcirculação, com o envolvimento de neutrófilos e à ativação do sistema do complemento, que são responsáveis pelo dano isquêmico (SOUTHARD et al., 1987; WILLET et al., 1995; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996; MENGER, 1995; MASSBERG et al., 1998; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1999; LAND et al., 1998; LAND et al., 1997; STORCK et al., 1997; BRETAN et al., 1997; EL-WAHSH et al., 1997; BOYLE et al., 1997; MENGER, 1995). Estes aspectos têm

sido confirmados em alguns trabalhos experimentais envolvendo o uso de substâncias farmacológicas cuja ação reside no bloqueio dos canais de cálcio (CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996).

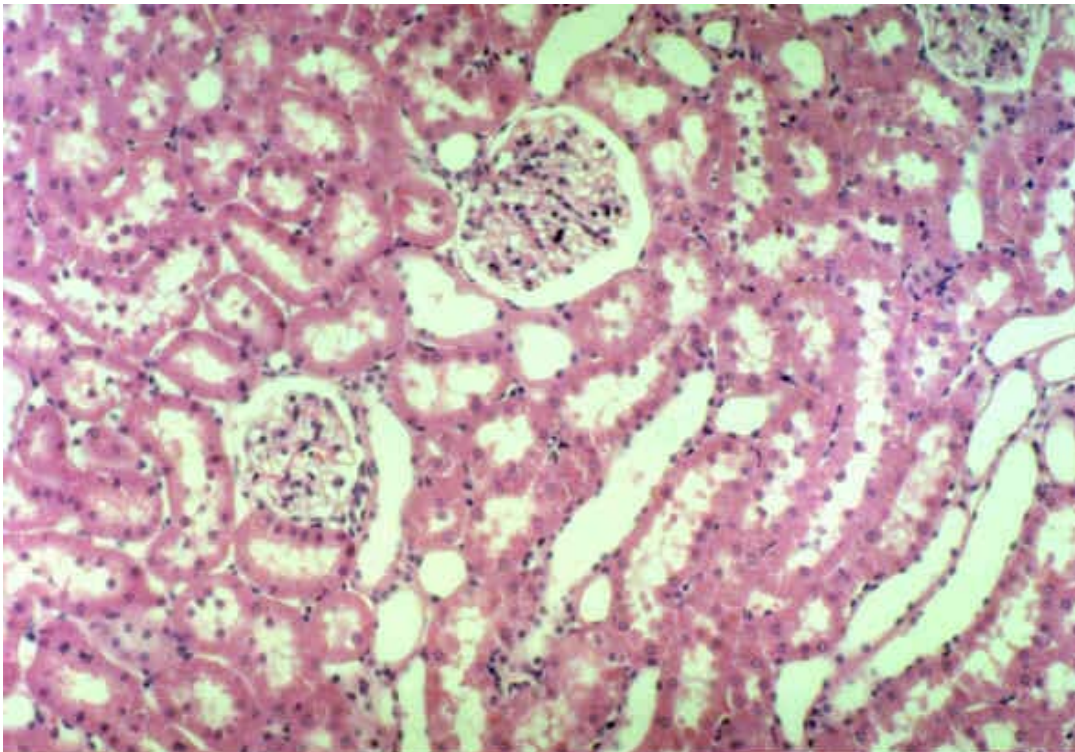
Teoricamente, as EAO poderiam produzir danos no endotélio arteriolar, nas células mesangiais glomerulares e principalmente nas células epiteliais dos túbulos renais (PALLER et al., 1984; CROSS et al., 1987). Estes aspectos podem, por exemplo, justificar o fato da resistência ao fluxo sanguíneo renal ter sido significativamente inferior em animais submetidos à isquemia e reperfusão tratados previamente com a superóxido dismutase, substância detoxificadora de EAO, quando comparados com grupos de animais-controle (PALLER et al., 1984; LAND et al., 1997).

Recentemente, Connolly et al., 1995, demonstraram claramente o envolvimento de fatores humorais (via do ácido araquidônico) na injúria reperfusional renal, onde a concentração de mediadores inflamatórios como tromboxane B₂, leucotrienos, citocinas e PAF são dependentes fundamentalmente da reperfusão. Além disso, este fenômeno pode estar relacionado a um incremento da injúria decorrente da isquemia e reperfusão, o que em órgãos transplantados pode ser uma causa de incremento da imunogenicidade do enxerto (CONNOLLY et al., 1995; SHOSKES et al., 1997; LANGREHR et al., 2000; GUO et al., 2000).

Mais recentemente as atenções têm sido direcionadas para o envolvimento do NO nestes complexos mecanismos que levam a lesão renal (WAZ et al., 1998; CAMELO et al., 1996; YU et al., 1994; SHRAMM et al., 1994; KIN et al., 1995). Modelos animais de injúria renal demonstram exacerbação do dano renal quando,

através de substâncias farmacológicas, a síntese de NO foi bloqueada (WAZ et al., 1998; SALAZAR et al., 1992). Estudos de Lopez-Neblina et al., 1996, por sua vez, provam importante participação do NO, modulador da resposta e migração leucocitária, no dano celular renal, com reflexos sobre a função do órgão em situações de isquemia e reperfusão, indicando medidas capazes de reduzir este dano através da manipulação exógena da síntese do NO.

Além disso, estudos demonstram que o NO é uma molécula que apresenta uma íntima relação com os fenômenos vasculares em diferentes órgãos e sistemas. Em situações de normalidade a nível renal, vários estudos têm demonstrado que o NO apresenta um forte relação com a vasodilatação, função túbulo-glomerular, excreção de sódio e regulação do sistema renina-angiotensina (GARCIA-CRIADO et al., 1998; SHOSKES et al., 1997). Por exemplo, uma



inibição
que se
(WAZ et

FIGURA 15: Aspecto histológico de um rim de rato normal

Estes aspectos são evidenciados quando se observa estudos experimentais onde a inibição da atividade da NOS com drogas como o L-NAME causam vasoconstrição arteriolar, decréscimo da oxigenação medular renal e uma interferência negativa na recuperação da função renal em rins submetidos a isquemia transitória e, por outro lado, substâncias que estimulam a produção de NO, diminuem a resistência vascular renal e aceleram a recuperação da função renal após o dano isquêmico imposto ao órgão (SHOSKES et al., 1997).

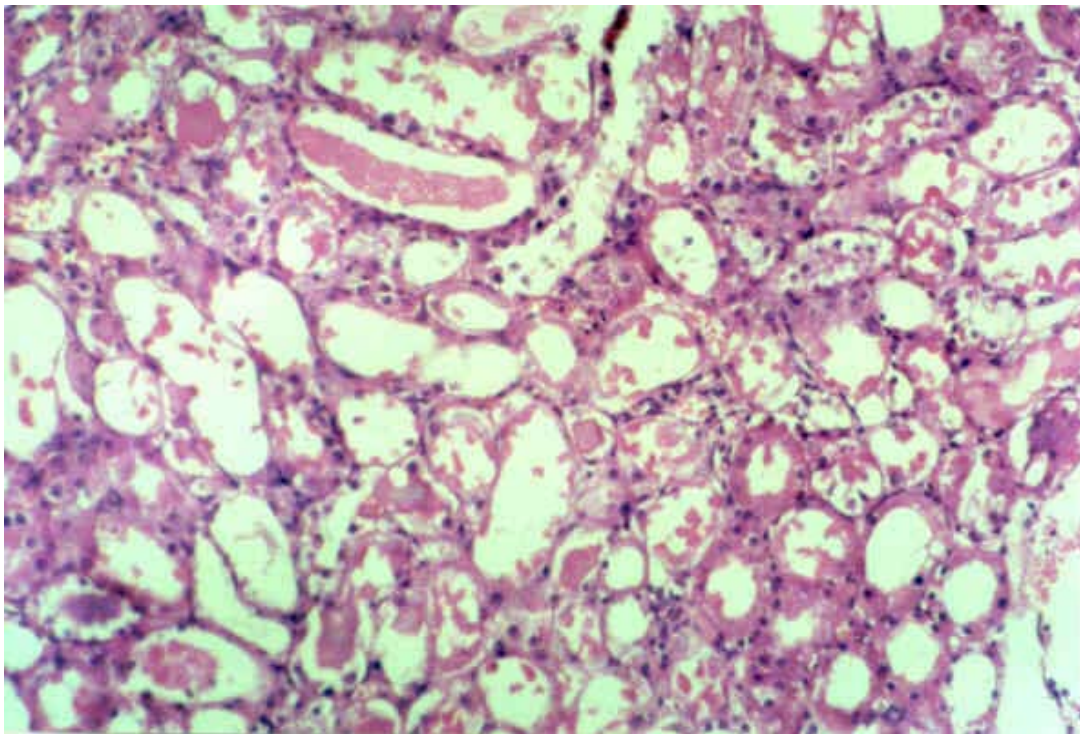


Figura 16 - Aspecto histopatológico 24 horas após isquemia renal de 50 minutos, onde pode ser observada a presença de necrose tubular moderada (Hematoxilina-Eosina; 200 X).

Estudos em ratos, como o desenvolvido por Lopez-Neblina et al. 1996, comprovam, por exemplo, a participação significativa da via do óxido nítrico e do ácido araquidônico na síndrome isquêmica reperfusional. Ou seja, observaram, estes autores, que a administração de nitroprussiato de sódio com ação moduladora sobre o óxido nítrico, previamente à reperfusão, conferia proteção à função renal destes animais de maneira significativa quando comparados com grupos que não haviam recebido esta substância. Por outro lado, Kobayashi et al., 1995, utilizando inibidores da síntese do NO (L-NAME) e drogas precursoras do óxido nítrico (L-arginina) em ratos submetidos à isquemia hepática, concluíram que a ação do óxido nítrico apresenta efeitos benéficos na viabilidade das células endoteliais e dos hepatócitos, assim como melhor manutenção do fluxo sanguíneo após a reperfusão sanguínea. As principais ações atribuídas e mediadas pelo óxido nítrico seriam a sua ação protetora na viabilidade endotelial e o bloqueio de efeitos vasoconstritivos de substâncias liberadas em situações de estresse, evitando, por conseguinte, o acúmulo e a agregação leucocitária e plaquetária, efeitos todos que confluem para maior viabilidade celular do órgão envolvido (BROWSE et al., 1994; KOBAYASHI et al., 1995; GRUNFELD et al., 1995; ALEXANDER, 1996). Também por apresentar um elétron desemparelhado, o óxido nítrico, agindo como acceptor de elétrons de outras espécies radicais (superóxido), poderia agir como detoxificador desta espécie radical, reduzindo a lipoperoxidação lipídica celular (KOBAYASHI et al., 1995).

Estes aspectos são reforçados quando se observa os resultados obtidos por Cristol et al., 1996, onde a administração de L-arginina reduziu significativamente a resistência vascular renal e, por outro lado, aumentou o fluxo sanguíneo renal quando comparados com os animais que não receberam a referida substância.

Bhardway e Moore, 1989, demonstraram, em um modelo de perfusão de rins de ratos, que a L-arginina causava vasodilatação, provavelmente através da liberação de NO mediada pela ação da eNOS.

Além da ação direta do L-NAME e L-arginina na modulação vascular e dos fluxos sanguíneos renais em situações normais, a isquemia e reperfusão segundo Myers et al., 1995, sofre influências significativas das EAO. Segundo este autor e outros como Saito et al., 1998, estas espécies radicais têm a propriedade de reduzir a síntese do NO, aspecto que contribuiria, sobremaneira, para a vasoconstrição ou aumento da resistência ao fluxo sanguíneo renal no fenômeno isquêmico-reperfusional.

Autores como Waz et al., 1998, acreditam que as alterações decorrentes na função renal em situações de isquemia e reperfusão e sua relação no metabolismo do NO são decorrentes de um dano endotelial na síntese do mesmo e, também, devido uma depleção do substrato necessário para o seu metabolismo. Estas observações baseiam-se em estudos nos quais a excreção urinária de nitritos e nitratos, metabólitos do NO, encontram-se profundamente alterados nesta injúria imposta ao rim. Estes aspectos caracterizam uma perda excessiva, por uma incapacidade de reabsorção tubular, do NO sintetizado necessário para manter a função glomerular.

Além disso, alguns autores sugerem que o rim seja mais sensível às diminuições das reservas de NO do que os outros tecidos, visto que a administração de L-NAME é capaz de reduzir, significativamente, a função renal (SALAZAR, et al., 1992; LAHERA et al., 1991). Além disso, sabe-se que o NO é um gás incolor bastante instável que pode reagir rapidamente com o oxigênio, dando origem a formas químicas mais estáveis, como o nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) com intensa atividade vasorrelaxante (WAZ et al., 1998; GUO et al., 2000).

Como já descrito interação celular endotélio-leucocitária no fenômeno

isquêmico-reperfusional renal está fortemente associada com manifestações de injúria parenquimatosa, com conseqüente perda da integridade endotelial e com as manifestações decorrentes desta, ou seja, edema intersticial, dano celular e disfunção do órgão. Estudos experimentais têm claramente demonstrado que a cascata de ativação leucocitária e a interação leucócito endotelial, assim como a liberação de componentes citotóxicos pelos leucócitos, isto é, EAO, mediadores lipídicos e enzimas lisossomiais, promovem as manifestações da injúria reperfusional. Estes aspectos são evidenciados pelo fato de que a inibição com anticorpos monoclonais de interações leucocitárias e a liberação de seus mediadores citotóxicos efetivamente atenuam a injúria microvascular e a disfunção orgânica (MARZI et al., 1992; MENGER, 1995).

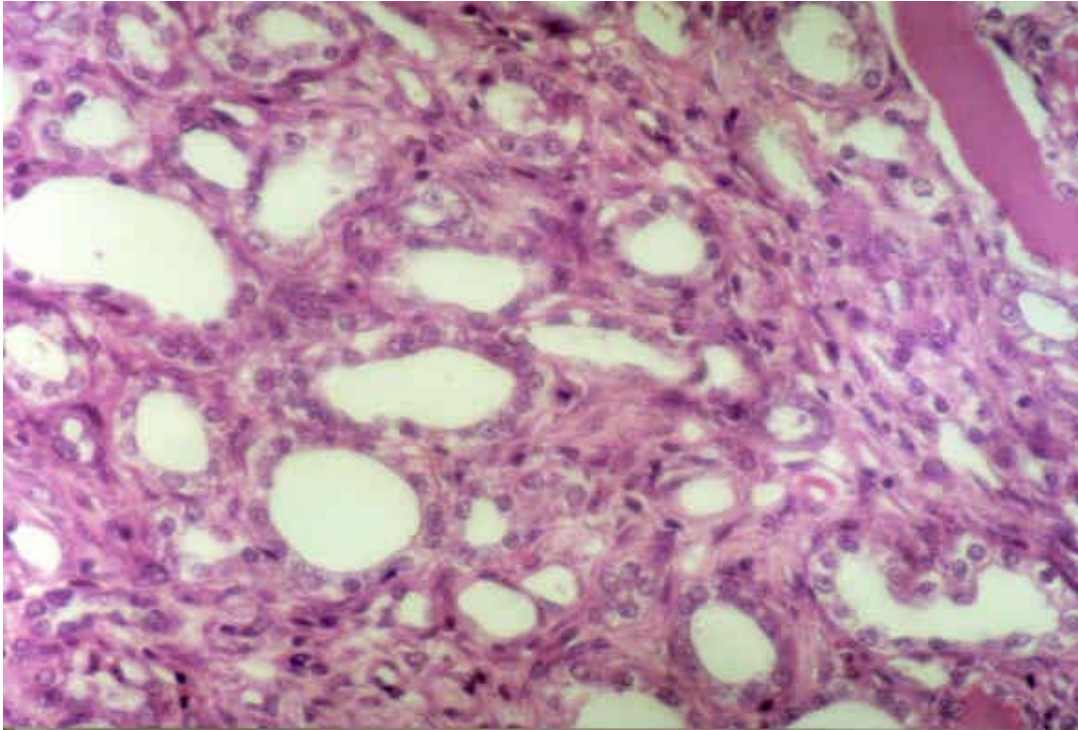


Figura 18- Aspecto histopatológico de um rim de rato no oitavo dia após isquemia renal normotérmica; observa-se a presença de atrofia tubular, fibrose intersticial e leve infiltrado inflamatório (Hematoxilina-Eosina; 400X).

No contexto do assunto em tela a produção do NO pelas células endoteliais pode regular a vasoconstrição que resulta em hipoperfusão dos órgãos previamente isquêmicos. Além disso, desde a demonstração de que o NO regula a adesão leucocitária e agregação plaquetária a sua participação em eventos associados ao fenômeno isquêmico-reperfusional tem sido aventada e estudada por diversos autores (LANGREHR et al., 1993).

A diminuição do fluxo sanguíneo renal e taxa de filtração glomerular em situações de isquemia renal transitória sugerem a participação fundamental de substâncias vasomoduladoras neste fenômeno, a partir do qual se desprende que

a participação do NO é muito provável. A produção basal do NO é fundamental e necessária para a atividade funcional glomerular normal, e a isquemia parece exercer uma ação inibitória sobre a síntese deste gás, exacerbando a disfunção renal associada a este fenômeno. Além disso, as EAO exercem efeitos deletérios a nível de endotélio com diminuição da produção do NO endotélio derivado (eNO) (BIRD et al., 1988; BAKER et al., 1985; SHOSKES et al., 1997; MARZI et al., 1992; MENGER, 1995).

Contudo, alguns autores consideram um tanto benéfica a interação entre o NO e as EAO durante o evento isquêmico-reperfusional, pois o NO atuaria como *scavenger* de O_2^- , impedindo o prosseguimento da cadeia de reações que permitiriam a perpetuação do ataque oxidativo das EAO (O_2^- , H_2O_2 e OH^-) sobre as membranas celulares (GARCIA-CRIADO et al., 1998; SHOSKES et al., 1997). Nesse contexto, alguns estudos têm verificado que precursores do NO, especialmente o aminoácido L-arginina, poderiam exercer efeito benéficos na isquemia-reperfusão tecidual (GARCIA-CRIADO et al., 1998).

A inibição da produção de NO causa um decréscimo na taxa de filtração glomerular, e conseqüentemente diminuição da natriurese e diurese (CHINTALA et al., 1993; SALAZAR et al., 1992; KIN et al., 1995; CERNADAS et al., 1992).

Diversos estudos apresentam, entretanto, resultados muitas vezes conflitantes neste aspecto, por exemplo, Salazar et al., 1992, não encontraram efeitos benéficos em termos de taxa de fluxo urinário quando L-arginina foi

administrado consecutivamente durante 3 dias, o que sugere que a produção de NO não é limitada pela disponibilidade de substrato. Em outro estudo, o pré-tratamento com L-NAME reduziu, significativamente, a depuração de creatinina em ratos submetidos a isquemia transitória (KIN et al., 1995). Por outro lado o L-NMMA (NG-mnoethyl-L-arginina), um outro inibidor da síntese de NO, agravou a função renal e, marcadamente, reduziu o taxa de fluxo urinário em um modelo de isquemia e reperfusão renal em ratos. Neste mesmo estudo, a L-arginina foi incapaz de elevar a taxa de fluxo urinário após um evento isquêmico renal transitório (CHINTALA et al., 1993).

Um dos mecanismos atribuídos para os efeitos deletérios da isquemia e reperfusão de órgãos, mais especificamente os rins, seria uma ação deletéria desta intervenção na atividade da NOS. Assim, observou-se através de mensurações teciduais da atividade desta enzima, em diferentes intervalos de tempo após a isquemia, que a mesma retornava aos seus valores basais aproximadamente 21 dias após a injúria imposta ao referido órgão (SHOSKES et al., 1997). Esta redução da atividade da NOS seria decorrente de 3 mecanismos: morte celular (diminuição de células viáveis para produzir NO), ação de inibidores ativos da enzima NOS (entre estes as interleucinas, EAO, fosfolípídeos aniônicos e o próprio NO) e, uma deficiência de substratos para a ação enzimática. Este último mecanismo tem recebido progressivamente mais importância quando se observa, por exemplo, os efeitos benéficos da administração pré-isquemia da L-arginina, presumivelmente por sua ação como doadora de NO. Por outro lado, é descrita uma elevação transitória, durante as 6 primeiras horas após a isquemia

da atividade da NOS, decorrente da fração eNOS, que poderia agir como depletadora das reservas de L-arginina, assim como, por efeitos em termos de anabolismo proteico geral durante a recuperação renal após a injúria. A suplementação de L-arginina, poderia então agir como uma forma de repor as deficiências e permitir uma síntese mais apropriada de NO. Além disso, é referido que, teoricamente, a L-arginina poderia reduzir o dano isquêmico através de um mecanismo não-relacionado ao NO, propriamente dito, embora este aspecto seja improvável, haja visto que em outros experimentos os efeitos benéficos descritos não tenham sido observados com a administração de D-arginina. Portanto, estudos bem delineados sugerem que uma das ações protetoras possíveis da L-arginina no fenômeno isquêmico-reperfusional seja decorrente da ação desta substância em reduzir a severidade do decréscimo da atividade da NOS.

Além disso, a ação supressiva da síntese do NO pelo radical superóxido tem sido sugerida como um dos principais mecanismos envolvidos e que explicam o dano imposto pela isquemia transitória aos órgãos. Esta inter-relação entre as EAO e a via do NO tem recebido atenção especial em estudos recentes (MYERS et al., 1995). Estes mesmos autores observaram que a administração de detoxificadores de EAO como a superóxido dismutase apresentaram efeitos benéficos em termos da manutenção dos fluxo sanguíneo renal e síntese de NO e prostaglandinas E2, elementos amplamente envolvidos na regulação do tônus vascular. Por sua vez a fonte mais rica destas EAO parece estar relacionada com a infiltração neutrofílica, decorrente do processo inflamatório oriundo da ativação endotelial associada ao fenômeno isquêmico-reperfusional (MYERS et al., 1995).

Por outro lado, alguns autores sugerem a possibilidade de que o pré-tratamento com L-arginina poderia aumentar o dano tubular do néfron induzido pela isquemia e reperfusão renal e, além disso, aventam a possibilidade de atenuação deste dano pelo L-NAME (YU et al., 1994). Esta discrepância de observações em termos de resultados pode ser explicada, pelo menos em parte, pela tendência do NO em formar peroxinitrito pela interação com o radical superóxido. Entretanto, a síntese deste radical pode ser prevenida pela administração concomitante de um detoxificador desta espécie radical como, por exemplo, a superóxido dismutase (WAZ et al., 1998). Assim, Caramelo et al., 1996, demonstraram que a administração concomitante da SOD e L-arginina apresentaram efeitos sinérgicos em situações de isquemia e reperfusão, melhorando a função renal e o volume urinário. O racional desta associação é que retirasse o superóxido pela SOD e, por conseguinte, sua reação com o NO, e este, por sua vez, pode exercer os efeitos em termos hemodinâmicos e de modulação da migração leucocitária e, portanto, os eventos inflamatórios associados ao fenômeno isquêmico-reperfusional.

Além disso, em outros animais como coelhos, o pré-tratamento com L-arginina, em um modelo de isquemia renal transitória, melhorou significativamente a depuração da creatinina e a perda de sódio urinário. Por outro lado, neste mesmo modelo a administração do substrato para a síntese de NO, no momento da reperfusão, apresentou efeitos similares na função glomerular mas falhou em prevenir a perda de sódio urinário (DAGHER et al., 1995).

López-Neblina et al., 1996, comunicaram, em um modelo experimental com ratos submetidos a isquemia e reperfusão renal, que a elevação da creatinina, alterações histológicas e a infiltração neutrofílica tecidual foram prevenidas através da administração de nitroprussiato de sódio imediatamente antes da reperfusão. Entretanto, estes aspectos são complexos e não completamente definidos haja visto que o nitroprussiato de sódio apresenta um tempo de meia vida extremamente curto e, resultados superiores foram encontrados quando a droga era administrada 75 minutos antes da reperfusão quando comparada com a administração 5 minutos antes da intervenção. Como se sabe os eventos que se sucedem e promovem a infiltração neutrofílica tecidual necessitam algum tempo, certamente mais longo do que o descrito. Talvez a interferência precoce seja uma etapa fundamental para que os eventos subsequentes sejam evitados. Por outro lado, como a L-arginina não demonstrou os mesmos efeitos benéficos, estes autores, sugerem que, para a síntese do NO, seja necessário a presença de um endotélio íntegro. Entretanto, não fazem considerações a respeito do grau de injúria necessária sobre o endotélio para torná-lo completamente inoperante em termos funcionais para a síntese do NO e, se este dano, é homogêneo em todos os segmentos do órgão.

Uma das explicações mais plausíveis para todas estas variações em termos de resultados está de alguma forma relacionada a participação de outras vias e a provável interação de várias vias, bem como aspectos metodológicos distintos na avaliação e mensuração dos eventos decorrentes. Neste contexto, por exemplo,

autores (TAKAYAMA et al., 1994; CONNOLLY et al., 1995) utilizando substâncias antiinflamatórias esteroidais e não esteroidais em distintos órgãos submetidos a estresses produtores de EAO obtiveram resultados que demonstram a importância da via do ácido araquidônico neste processo. Por outro lado, substâncias bloqueadoras de canais de cálcio, como verapamil, nifedipina, nimodipina e lidoflazina, têm sido amplamente testadas em situações de isquemia e reperfusão de distintos órgãos com o objetivo de interferir primariamente em um dos mecanismos fundamentais da vida celular, ou seja, a homeostase do cálcio. Entretanto, resultados freqüentemente não concordantes têm sido observados, ou com respostas parciais, sugerindo fortemente a presença de outros mecanismos envolvidos no dano celular advindo da injúria isquêmico-reperfusional (KARWINSKI et al., 1991; STEIN et al., 1993; TAKEMOTO et al., 1994; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1996; HANSSON et al., 1990; HERTLE & GARTHOFF, 1985; PAPADIMITRIOU et al., 1995; CHIEN et al., 1977).

Aspectos de extrema relevância no fenômeno isquêmico-reperfusional residem no produtos advindos da ação oxidativa e formas confiáveis de mensuração. O malondialdeído é um marcador altamente sensível da peroxidação lipídica e, portanto, o mais amplamente utilizado para avaliar a oxidação dos ácidos graxos dos fosfolípidos que compõem a porção lipídica da camada glicolipoproteica da membrana celular (ILLNER et al., 1998). Apesar da correlação direta entre o uso de anti-oxidantes e uma menor formação de malondialdeído, uma relação direta com a injúria celular ainda não está bem estabelecida. Entretanto, a peroxidação lipídica persiste como a forma de expressão mais importante da atividade oxidativa decorrente da ação das EAO (ROMERO et al., 1999; RHODEN, et al., 1999 m; ILLNER et al., 1998).

Estudos realizados por diversos autores (PRILLAMAN & TURNER, 1977; OHKAWA et al., 1979; GRANGER et al., 1981; PARKS et al., 1983; GONZALEZ-FLECHA et al., 1991; TAKAYAMA et al., 1994; KLAIN-BELLÓ, 1994; OREDSSON et al., 1995; ORTOLANI et al., 1995; IMAMURA et al., 1995; RHODEN et al., 1997 a; RHODEN et al., 1997 g) envolvendo o fenômeno isquêmico-reperfusional em vários órgãos como rim, fígado, cérebro, músculo esquelético, pulmão e intestino têm demonstrado resultados concordantes no que se refere à lipoperoxidação das membranas celulares das células dos respectivos órgãos e à sua repercussão em nível de função do órgão em estudo, validando, desta forma, os mesmos como testes para quantificação da injúria imposto ao rim pela isquemia transitória normotérmica.

Estes aspectos, especialmente relacionados a atividade das EAO, são reforçados também por outros autores como Paller et al. 1984, onde em seus experimentos, mostraram que a concentração tecidual de malondialdeído, avaliada em nível de mitocôndrias corticais de rins de ratos submetidos à isquemia e reperfusão, foi significativamente inferior em animais pré-tratados com superóxido dismutase (detoxificadora do radical superóxido) quando comparada àquela obtida no grupo de animais-controle.

Além disso, diversos estudos como o desenvolvido, elegantemente, por Hansson et al. 1982, no qual coelhos eram tratados com alopurinol e submetidos à isquemia e reperfusão renal, demonstraram que as concentrações teciduais de hipoxantina crescem progressivamente no tecido renal durante a fase isquêmica e

que durante a reperfusão as concentrações séricas da xantina se elevam progressivamente, indicando a oxidação da hipoxantina, acumulada durante o período isquêmico, pela xantina oxidase e comprovando, o envolvimento desta enzima em etapas fundamentais que levam à formação das EAO (RHODEN, et al., 1999 m; GREENE et al., 1992; BIRD et al., 1988; OHKAWA et al., 1979; HANSSON et al., 1982)

Estes aspectos, referem que o envolvimento da enzima xantina oxidase são fundamentais para a compreensão do eventos que se sucedem e validam a hipótese teórica de geração de EAO e seu envolvimento em etapas sucessivas que levam ao dano celular irreversível.

Entretanto, a insuficiência renal aguda decorrente do fenômeno isquêmico reperfusional provavelmente é multifatorial onde as EAO apresentam importante participação, porém, a hipóxia e os eventos decorrentes como a infiltração neutrofílica e a ativação endotelial evoluem com a migração e ativação de vários outros mediadores (selectina, FAP, interleucina etc.) que em suma caracterizam uma grande reação inflamatória (MENGER, 1995; BOYLE et al., 1997; MASSBERG et al., 1998; BOYLE et al., 1997). Mais especificamente, observa-se a partir de achados em vários estudos, uma série de alterações tais como a vasoconstrição, dano tubular, necrose tubular, alteração da filtração glomerular como consequência desta série de eventos que se sucedem em cadeia (BIRD et al., 1988; WEINBERG, 1991).

Estudos demonstram que durante a isquemia o NO protege o tecido através de uma ação vasodilatadora e durante o período reperfusional, o NO pode agir como *scavenger* ao reagir com o radical superóxido, neutralizando-o e, portanto, impedindo a sua ação oxidativa e a cadeia de eventos que se sucedem e que levam a produção de EAO como o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio (KOBAYASHI et al., 1995; GROSS, et al., 1995). Além disso, o NO diminuiu a agregação leucocitária, infiltração neutrofílica e a formação de mediadores inflamatórios durante o fenômeno isquêmico-reprfusional (KOBAYASHI et al., 1995). Além disso, o NO é um potencial vasodilatador que diminui a resistência vascular renal e o fluxo sanguíneo glomerular. Entretanto, o metabolismo do NO sofre alterações durante a isquemia tecidual : alguns autores referem uma resposta bifásica da atividade da NOS na injúria isquêmico reperfusional, ou seja, uma estimulação inicial (2 horas), seguida por um período de atividade diminuída (24 horas) com uma progressiva recuperação da NOS e função renal até os níveis basais (7 dias) (SHOSKES et al., 1997). Por outro lado, o L-NAME apresenta efeitos opostos aos descritos aumentado a resistência vascular e redução da taxa de filtração glomerular (HANSSEN et al., 1997).

Aplicações práticas de todos aspectos envolvidos principalmente no campo teórico do fenômeno isquêmico-reperfusional podem ser observados por exemplo no trabalho de Defraigne et al. 1995, estudando o envolvimento das EAO na preservação de rins de coelhos em solução de Euro-Colins. Observaram que os níveis teciduais de vitamina E e glutathiona reduzido caíram significativamente após a reperfusão destes órgãos, indicando o consumo destes elementos, sabidamente

detoxificadores de radicais livres, pelas espécies ativas geradas durante a reperfusão. Outros autores, como Franssen et al. 1995, igualmente observaram resultados semelhantes, mostrando o consumo dos antioxidantes endógenos glutathiona reduzido e vitamina E em estudos de isquemia e reperfusão renal. Além disso, observaram também que a desferoxamina que tem ação quelante sobre o ferro e, portanto, interfere na reação de Fenton, importante reação de geração de EAO, reduziu significativamente a queda das concentrações teciduais destes antioxidantes.

Estudo interessante desenvolvido por Rinaldi et al., 1995, demonstrou que a solução de preservação de órgãos Wisconsin foi superior em termos de resultados (rejeição, infecção e mortalidade), em transplantes de pulmão, à solução de Euro-Collins, diferença esta atribuída principalmente à presença de alopurinol e glutathiona na primeira, substâncias com ações do tipo anti-radical livre. Além disso, o uso do alopurinol previamente ao transplante renal em cães revelou efeitos significativamente benéficos em termos de sobrevida e função (TAKEMOTO et al., 1994).

Marzi et al. 1992, estudando o envolvimento das EAO na via do ácido araquidônico em transplantes hepáticos e o uso de soluções detoxificadores de radicais livres do oxigênio (Euro-Collins) com soluções que contêm estes elementos (Wisconsin), principalmente alopurinol e glutathiona, indicaram que a perfusão sinusoidal de leucócitos assim como a aderência permanente dos mesmos estavam significativamente mais reduzidas naqueles nos quais a solução

de Wisconsin foi empregada. Estes dados suportam a hipótese do envolvimento das EAO na ativação leucocitária endotelial como potencial causadora de injúria celular.

Como demonstrado na Figura 12, esta ativação pode se processar por um mecanismo direto das EAO sobre a ativação de fosfolipases ou através de menor capacidade detoxificadora do óxido nítrico.

Estudos recentes, como o de Kobayashi et al. 1995, têm ressaltado a importância do óxido nítrico como modulador da atividade leucocitária, de modo que a redução deste e o incremento da atividade do mesmo aumentariam e reduziriam, respectivamente, a ativação de fosfolipases e, conseqüentemente, a geração de reações em cascata que levariam à formação e aderência destes mediadores inflamatórios em nível celular.

A isquemia e reperfusão renal está, portanto, (PALLER et al., 1984; FRANSSEN et al., 1995; CONNOLLY et al., 1995; DESCOTES et al., 1995) associada à produção de EAO e o rim apresenta no momento da reperfusão uma deficiente proteção antioxidante decorrente do consumo destes elementos, assim como da maior produção de substratos geradores de radicais livres, advindo destes fenômenos um desequilíbrio entre antioxidantes e pró-oxidantes, resultando na indução da lipoperoxidação dos ácidos graxos presentes nas membranas celulares. Aspectos inflamatórios e que envolvem as próprias EAO e seu envolvimento com mediadores inflamatórios e o NO bem como sua ação hemodinâmica. Estes aspectos demonstram a complexidade de eventos inter-relacionados e que interagem nestas situações de estresse oxidativo.

Caramelo et al., 1996, observaram, em termos histológicos, em rins de coelhos submetidos a isquemia por 60 minutos, um aumento significativo da congestão vascular ao nível da medular e dano tubular (necrose tubular e infartos renais) quando comparados ao grupo de animais submetidos ao mesmo procedimento, porém pré-tratados com L-arginina e superóxido dismutase. Nenhum resultado estatisticamente significativo foi observado quando estas substâncias eram administradas isoladamente. Estes achados refletem um efeito sinérgico das duas substâncias e indicam, indiretamente, a possibilidade da influência do peroxinitrito como agente lesivo quando o superóxido não é administrado concomitantemente a L-arginina. Além disso, os resultados foram mais expressivos quando as análises foram efetuadas 1 hora após a intervenção isquêmica. Por outro lado, as análises realizadas 24 e 48 horas não demonstraram diferenças com as mesmas intensidades. Entretanto, estes resultados são difíceis de interpretar pela avaliação muitas vezes subjetiva e, também, nem sempre mostrando uma correlação direta com as características funcionais analisadas nos mesmos intervalos de tempo. Além disso, aspectos relacionados a aferição dos resultados devem ser considerados, haja visto que a análise histológica em termos de quantificação das alterações observadas muitas vezes são difíceis de serem traduzidas para situações numéricas e, além disso, os intervalos de graduações das variações das intensidades das alterações são bastante amplos podendo levar a algumas distorções nos resultados finais. Outra situação que deve ser considerada pode ser decorrente do fato de que as alterações que se processam na injúria em tela situam-se ao nível dos componentes moleculares das biomembranas, somente passíveis de avaliação pela histopatologia microscópica eletrônica.

Lopez-Neblina et al., 1996, demonstraram uma melhora significativa da função renal e uma redução do infiltrado neutrofilico em rins de ratos submetidos a isquemia transitória após infusão de nitroprussiato de sódio.

Garcia-Criado et al., 1998, observaram que a administração de molsidomine, uma substância doadora de NO, apresentou um efeito protetor renal, reduzindo significativamente as alterações tubulares (necrose tecidual e alteração

da estrutura celular) induzidas pela isquemia transitória deste órgão quando comparados com as alterações observadas nos animais dos grupos controle. Além disso, através de uma técnica de mieloperoxidase demonstraram uma menor infiltração neutrofílica quantificada em 4 vezes inferior àquela observada nos animais que não receberam molsidomine.

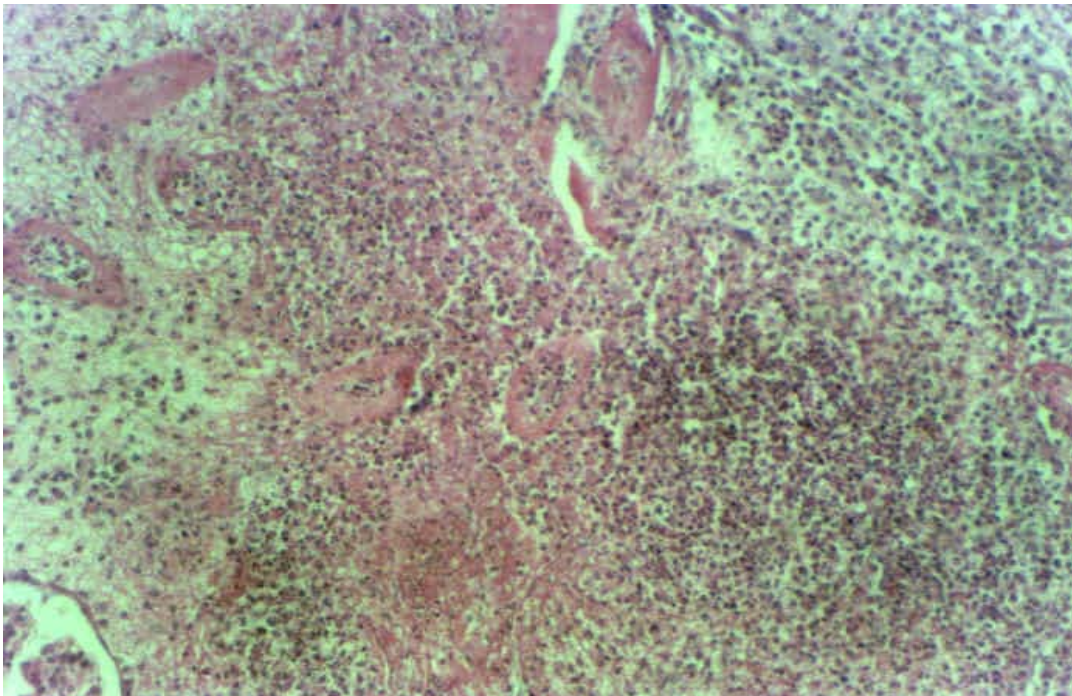


Figura 17 - Aspecto histopatológico 24 horas após isquemia renal de 50 minutos em ratos; observa-se a presença de infiltrado inflamatório intersticial (Hematoxilina-Eosina; 200X).

A maneira como os ânions superóxidos e citoquinas modulam a infiltração neutrofílica necessita ser esclarecida com mais precisão. É possível que o NO determine uma *down-regulation* do radical superóxido e das citoquinas, que por sua vez exercem uma redução na expressão das moléculas de adesão celular

(interleucinas, fator de necrose tecidual, PAF etc.) responsáveis pelo recrutamento de células para a zona túbulo-intersticial (GARCIA-CRIADO et al., 1998).

Portanto, estas considerações das múltiplas relações do NO em condições normais é complexa, tornando esta situação muita mais relevante e indefinida quando situações patológicas são consideradas. Além disso, todos estes aspectos demonstram que a completa elucidação dos mecanismos de ação do NO a nível renal em condições normais e patológicas são fundamentais para compreensão dos fenômenos em tela. Outra questão, igualmente significativa, tendo em vista a origem das EAO e as rotas metabólicas distintas que levam à formação de outras espécies radicais e não, simplesmente, o efeito das mesmas, poderão permitir interferências farmacológicas com o intuito de obter efeitos benéficos diante de situações nos quais estes mecanismos de injúria renal estejam presentes (CARAMELO et al., 1996; SHOSKES et al., 1997; LOPEZ-NEBLINA et al., 1996; CHAVEZ-CARTAYA et al., 1999; LAND et al., 1998; LAND et al., 1997; YU et al., 1994; SHRAMM et al., 1994; KIN et al., 1995).

3 - OBJETIVO

Estudar o envolvimento da via do óxido nítrico no fenômeno isquêmico-reperfusional renal em ratos, avaliando-se os efeitos sobre a função, lipoperoxidação de membranas celulares e alterações histopatológicas renais.

4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABROSIO, G.; TRITTO, I.; CHIARIELLO, M. The role of oxygen free radicals in preconditioning. *J. Mol. Cell. Card.*, vol. 27 p.1035-39, 1995.
- ALEXANDER, B. The role of adenosine, ATP and nitric oxide in portal venous induced hepatic arterial vasodilation. *Liver Innerv.* , vol.33 p.283-8, 1996.
- BAKER, G.L.; CORRY, R.J.; AUTOR, A .P. Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion: protective effect of superoxide dismutase. *Ann. Surg.*, vol.202 p.628-41, 1985.
- BELLO-KLEIN, A. Contratura cardíaca induzida pelo peróxido de hidrogênio. Porto Alegre:Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1994. 200 p. Tese de Doutorado em Fisiologia- Instituto de Biociências.
- BHARDWAJ, R.;MOORE, P.K.The effect of arginine and nitric oxide on resistance blood vessels of the perfused rat kidney. *Br. J. Pharmacol.*, vol.97 p.739-45,1989.
- BIRD, J.E.; MILHOAN, K.; WILSON, C.B. Ischemic acute renal failure and antioxidant therapy in the rat: the relation between glomerular and tubular dysfunction. *J. Clin. Invest.*, vol. 81 p. 1630-38, 1988
- BONVENTRE, J.V. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int.*, Vol. 43 p. 1160-1178, 1993.
- BOROS, M.; TAKAICHI, S.; HATANAKA, K. Ischemia tissue dependency of reperfusion injury following complete arterial occlusion of the rat small intestine. *Transplant. Proc.*, vol.27(5) p. 2789-90, 1995.
- BOYLE , E.M.; POHLMAN, T.H.; CORNEJO, C.J.; VERRIER, E.D. Ischemic reperfusion injury. *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 64(4) p. S24-30, 1996.
- BOYLE , E.M.; POHLMAN, T.H.; CORNEJO, C.J.; VERRIER, E.D. The systemic inflammatory response. *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 64(4) p. S31-37, 1997.
- BRETAN, P.N.; CHANG, J.; LOBO, E.; DUMITRESCU, O. ; MILLER, B.; BENEDICT, Y. Experimental and clinical assessment of preservation-induced reperfusion injury comparing renal transplant blood flow and renal endothelin concentrations. *Transplant. Proc.*, vol. 29 p. 3520-21, 1997.
- BROWSE, D.J.; MATHIE, R.T.; BENJAMIN, I.S.; ALEXANDER, B. The transhepatic action of ATP on the hepatic arterial and portal venous vascular beds of the rabbit:The role of nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.*, vol.113 p.987-93, 1994.

- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.*, vol.52 p.302-9, 1978.
- BULKEY, G.B. The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery*, vol. 94(3) p. 407-11, 1983.
- BURRA, P.; FERRARESSO, M.; CADROBBI, R.; CALABRESE, R.; CARDIN, R.; PARNIGOTTO, A.; CARRARO, P.; RIGOTTI, P. Effect of L-arginina and oligotide on liver ischemia-reperfusion. *Transplant. Proc.*, vol. 29 p. 2992-3, 1997.
- CARAMELO, C.; ESPINOSA, G.; MANZARBEITIA, F.; CERNADAS, M.R.; PERZ TEJERIZO, G.; TAN, D.; MOSQUERA, J.R.; DIGIUNI, E.; MONTÓN, M.; MILLÁS, I.; HERNANDO, L.; CASADO, S.; LOPEZ-FARRÉ, A. Role of endothelium-related mechanisms in the pathophysiology of renal ischemia/reperfusion in normal rabbits. *Circulation Res.*, vol.79 (5) p.1031-8, 1996
- CERNADAS, M.R.; LÓPEZ-FARRÉ, A.; RIESCO, A.; GALLEGO, M.J.; ESPINOSA, G.; DIGIUNI, E.; HERNANDO, L.; CASADO, S.; CARAMELO, C. Renal and systemic effects of aminoacids administered separately: comparison between L-arginina and non-nitric oxide donor aminoacids. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, vol.263 p. 1023-9, 1992.
- CHAVEZ-CARTAYA, R.; DESOLA, G.P.; RAMIREZ-ROMERO, P.; CALNE, S.R.Y.; JAMIESON, N.V. Ischemia and reperfusion injury of the rat liver: the role of nimodipine. *J.Surg. Res.*, vol.60 p.199-206, 1996.
- CHAVEZ-CARTAYA, R.; JAMIESON, N.V.; RAMIREZ-ROMERO, P.; PINO-CHAVEZ, G. Free radical scavengers to prevent reperfusion injury following warm liver ischemia. *Transplant. Proc.*, vol.31 p. 2439-40, 1999.
- CHIEN, K.R.; ABRAMS, J.; PITT, R.G.; FARBER, J.L. Prevention by chlorpromazine of ischemia liver cell death. *Am. J. Pathol.* vol. 88(3) p. 539-55, 1977.
- CHIEN, W.; BENNETT, C. F.; WANG, M.; DRAGUN, D.; TIAN, L.; STECKER, K.; CLARK, J.H.; KAHAN, B.; STEPKOWSKI, S.M. Perfusion of kidneys with unformulated "naked" intercellular adhesion molecule-1 antisense oligodeoxynucleotides prevents ischemic/reperfusion injury. *Transplantation*, vol. 68 p. 880-7, 1999.
- CHINTALA, M.S.; CHIU, P.J.S.; VEMULAPALLI, S.; WTKINS, R.W.; SYBERTZ, E.J. Inhibition of endothelium derived relaxing factor (EDRF) aggravates ischemic acute renal failure in anesthetized rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, vol. 348 p. 305-310, 1993.

- CONNOLLY, J.K.; GUY, S.P.; PARROT, N.R. Cytokine gene expression and eicosanoid production in renal reperfusion injury. *Transplant. Proc.*, vol. 27(5) p.2816-18, 1995.
- COHEN, P.J. Allopurinol administered prior to hepatic ischaemia in the rat prevents chemiluminescence following restoration of circulation. *Can. J. Anaesth.*, vol. 39 p.1090-3, 1992.
- COTRAN, RS; KUMAR, V; ROBBINS, SL. *Rim. IN: COTRAN, RS; KUMAR, V; ROBBINS, SL: Patologia Estrutural e Funcional., 4ª Ed., Guanabarra-koogan, 1989, W.B. Sanders Company, Rio de Janeiro, Cap. 21 p. 831-91.*
- CROSS, C.E.; HALLIWELL, B.; BORISH, E.T.; PRYOR, W.A.; AMES, B.; SAUL, R.L.; McCORD, J.M.; HARMAN, D. Oxygen radicals and human disease. *Ann. Inter. Med.*, vol.107(4) p.526-45, 1987.
- CRISTOL, J.P.; THIEMERMANN, C.; GUERIN, M.C.; TORREILLES, J.; DE PAULET, A .C. L-arginine infusion after ischaemia-reperfusion of rat kidney enhances lipid peroxidation. *J. Lipid Mediat. Cell Signal.*, vol. 13(1) p. 9-17, 1996.
- CRISTOL, J.P.; THIEMERMANN, C.; MITCHELL, J.A .; WALDER, C.; VANE, J.R. Support of renal blood flow after ischemic-reperfusion injury by endogenous formation of nitric oxide and of cyclo-oxygenase vasodilator metabolites. *Br. J. Pharmacol.*, vol. 109 p.188-194, 1993.
- CUNNINGHAM, S.K.; KEAVENY, T.V.; FITZGERALD, P. Effect of allopurinol on tissue ATP, ADP and AMP concentrations in renal ischemia. *Br. J. Surg.*, vol. 61 p.562-5, 1974.
- DAGHER, F.; POLLINA, R.M.; ROGERS, D.M.; GENNARO, M.; ASCER, E. The value and limitations of L-arginine infusion on glomerular and tubular function in the ischemic/reperfused kidney. *J. Vasc. Surg.*, vol. 21 p. 453-9, 1995.
- DEFRAIGNE, J.O.; PINCEMAIL, J.; DETRY, O.; FRANSSEN, C.; MEURISSE, M.; LIMET, R. Variations of glutathione and vitamin E concentrations after hypothermic storage in Euro-collins solution and reperfusion of the rabbit kidney. *Transplant. Proc.*, vol. 27(5) p. 2783-5, 1995.
- DEFRAIGNE, J.O.; DETRY, O; PINCEMAIL, J; FRANSSEN, C.; MEURISSE, M.; LIMET, R. Direct evidence of free radical production after ischaemia and reperfusion and protective effect of desferrioxamine: ESR and vitamin E studies. *Eur. J. Vasc. Surg*, Vol. 8 p.537-43, 1994.
- DEL MAESTRO, R.F. An approach to free radicals in medicine and biology. *Free Rad. Med. Biol.*, vol. 492 p. 153-68, 1980.

- DEMIRYUREK, A . T.; ÇAKICI, I.; KANZIK, I. Peroxynitrite: a putative cytotoxin. *Pharmacol. Toxicol.*, Vol. 82(3) p. 113-7, 1998.
- DESCOTES, J.L.; PAYEN, E.; CHAPELIER, E.; RAMBEAUD, J.J.; FERRARI, M.; MAZUER, J.; ODIN, J. Cold and renal warm ischemia and postoperative survival in rabbits with autotransplanted kidneys. *Transplant. Proc.*, vol. 27(5) p.2874-6, 1995.
- DI LISA, F.; SILVERMAN, H.S.; HANSFORD, R.G. Mitochondrial function and cell injury in single cardiac myocytes exposed to anoxia and reoxygenation. *Tranplant. Proc.*, vol. 27(5) p. 2829-30, 1995.
- DREWS, G.; SPIEGEL, H.U.; HERMSDORF, T.; DETTMER, D.; RICHTER, V.; HAUSS, J. Cytoprotective effects of a stable prostacyclin analog and a calcium channel blocker: a study on isolated rat hepatocytes. *Transplant. Proc.*, vol. 27(5) p. 2799, 1995.
- ELION, G.B. Allopurinol and others inhibitors of urate. IN: ELION, G.B. Uric acid. *Handbruch der experimentelburn pharmakologie*. Kelley wn, Weiner IM Eds, Vol.51 Springer-Verlag, Berlim, 1978, p. 485-514.
- EL-WAHSH, M.; FULLER, F.; SREEKUMAR, N.S.; BURROUGHS, A .; DHILLON, P.; ROLLES, K.; DAVIDSON, B.R. Effect of reperfusion on human allograft ICAM-1 expression and its correlation with histological evidence of reperfusion changes. *Transplant. Proc.*, vol. 29 p. 3000-1, 1997.
- FOSCHI, D.; CASTOLDI, L.; LESMA, A.; MUSAZZI, M.; BENEVENTO, A.; TRABUCCHI, E.. Effects of ischemia and reperfusion on liver regeneration in rats. *Eur. J. Surg.*, vol.159 p.393-8, 1993.
- FÖRSTERMANN, U.; CLOSS, E.I.; POLLOCK, J.S.; NAKANE, M.; SCHWARZ, P.; GATH, I.; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, vol. 23(2) p.1121-31, 1994.
- FRANSSEN, C.; DEFRAIGNE, J.O.; DETRY, O.; PINCEMAIL, J.; DEBY, C.; LAMY, M. Antioxidant defense and free radical production in a rabbit model of kidney ischemia-reperfusion. *Transplant. Proc.*, vol. 27(5) p.2880-3, 1995.
- FREDERIKS, W.M.; KOUIJ, A.; BOSCH, K.S. Role of xanthine oxidase activity in tissue damage of rat liver after ischemia. *Transplant. Proc.*, vol. 27(5) p. 2855-6, 1995.
- GALAT, J.A.; ROBINSON, A.V.; RHODES, R.S. Postischemic renal dysfunction: The limited role of xantine oxidase- generated oxygen free radicals. *J. Surg. Res.*, vol. 49 p.488-492, 1990.

- GARCIA-CRIADO, F.J.; ELENO, N.; SANTOS-BENITO, F.; VALDUNCIEL, J.J.; REVERTE, M; LOZANO-SANCHEZ, F.S.; LUDENA, M.D.; GOMEZ-ALONSO, A .; LOPEZ-NOVOA, J.M. Protective effect of exogenous nitric oxide on the renal function and inflammatory response in a model of ischemia-reperfusion. *Transplantation*, vol. 66(8) p.982-90, 1998.
- GERSCHMAN, R. Historical introduction to the "free radical theory of oxygen toxicity. IN: GILBERT, D.L. Oxygen and living processes. An Interdisciplinary approach. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, vol.1 cap.2 p. 44-46, 1981.
- GONZALEZ-FLECHA, B.; LLESUI, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Rad. Biol. Med.*, vol.10 p.93-100, 1991.
- GRANGER, D.N.; RUTILI, G.; McCORD, J.M. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology*, vol. 81 p.22-6, 1981.
- GREENE, E.L.; PALLER, M.S. Xanthine oxidase produces O_2^- in porthypoxic injury of renal epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, vol. 263 p. 251-255, 1992.
- GRISHAM, M.B. Interaction between nitric oxide and superoxide: Role in modulating leukocyte adhesion in the postischemic microvasculature. *Transplant. Proc.*, vol.27(5) p.2842-3, 1995.
- GROSS, S.S.; WOLIN, M.S. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Ann. Rev. Physiol.*, vol. 57 p.737-69, 1995.
- GRUNFELD, S.; HAMILTON, C.A.; MESAROS, S.; McCLAIN, S.W.; DOMINICZAK, A.F.; BOHR, D.F.; MALINSKI, T. Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. *Hypertension*, vol. 26(6) p. 854-857, 1995.
- GUO, W.H.; CHAN, K.L.; FUNG, P.P.C.W.; CHAN, K.W.; TAM, P.K.H. Nitric oxide protects segmental intestinal grafts from ischemia and reperfusion injury. *Transplant. Proc.*, vol.32 p. 1297-8, 2000.
- GÜRKE, L.; MARX, A.; SUTTER, P-M.; SEELING, J.; HARDER, J.; HEBERER, M. Allopurinol improves postischemic skeletal muscle performance and endurance but not high-energy phosphate levels. *Transplant. Proc.*, vol. 27(5):2840, 1995.
- GUYTON AC- A célula e seu funcionamento. IN: GUYTON AC- Tratado de Fisiologia Médica. 8 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Kogan, 1991. p 8-20, 654-661.
- HAMMERMAN, C.; GOLDSCHMIDT, D.; CAPLAN, M.; KAPLAN, M.; SCHIMMEL, M.; EIDELMAN, A .; BRANSKI, D.; HOCHMAN, A .Amelioration of ischemia-

- reperfusion injury in rat intestine by pentoxifylline-mediated inhibition of xanthine oxidase. *J. Ped. Gastro Nutrition*, vol.29(1) p. 69-74, 1999.
- HANSEN, T.N.; D'ALSSANDRO, A .; SOUTHARD, J.H. Long term cold ischemia reduces nitric oxide metabolism in reperfused rabbit kidneys. *Transpl Proc.*, vol.29 p. 3417-19, 1997.
- HANSSON, R.; BRATELL, S.; BURIAN, P.; BYLUND-FELLENIS, A.C.; JONSSON, O.; LUNDGREN, O.; LUNDSTAN, S.; PETTERSSON, S.; SCHERSTEN, T. Renal function during reperfusion after warm ischaemia in rabbits: an experimental study on the possible protective effects of pretreatment with oxygen radical scavengers or lidoflazine. *Acta. Physiol. Scand.*, vol. 139 p.39-46, 1990.
- HANSSON, R.; GUSTAFSSON, B.; JONSSON, O.; LUNDSTAN, S.; PETTERSON, S.; SCHERSTEN, T.; WALDENSTRÖM, J. Effect of xanthine oxidase inhibition on renal circulation after ischemia. *Transplant. Proc.*, vol. 14(1) p. 51-8, 1982.
- HASSELGREN, P-O. Prevention and treatment of ischemia of the liver. *Surg. Gynecol. Obstet.*, vol. 164 p.187-96, 1987.
- HERTLE, L.; GARTHOFF, B. Calcium channel blocker nisoldipine limits ischemic damage in rat kidney. *J. Urol.*, vol.134 p.1251-1254, 1985.
- HIGA, T.; SHIRASISHI, M.; HIROYASU, S.; TOMORI, H.; OKUHAMA, Y.; KUSANO, T.; MUTO, Y. Effect of exogenous L-arginine for hepatic-reperfusion injury in an isolated rat liver in vitro. *Transplant. Proc.*, vol. 30 p. 3728-9, 1998.
- HIRASAWA, H.; CHAUDRY, I.; BAUE, A.E. Improved hepatic function and survival with triphosphate-magnesium chloride after hepatic ischemia. *Surgery*, vol. 83(6) p. 655-62, 1978.
- ILLNER, W.D.; LAND, W. Comment to the previous paper of J. Zweier: demonstration of reactive oxygen species in reperfused human kidney transplants. *Transplant. Proc.*, vol. 30 p. 4233-34, 1998.
- IMAMURA, H.; SUTTO, F.; BRAULT, A.; HUET, P-M. Role of kupffer cells in cold ischemia reperfusion injury of rat liver. *Gastroenterology*, vol.109 p.189-97, 1995.
- ISOBE, M.; KATSURAMAKI, T.; KIMURA, H.; MATSUNO, T.; TARUMI, A .; YAGIHASHI, A .; SASAKI, K.;HIRATA, K. Correlation between nitric oxide and endothelin after prolonged warm ischemia-reperfusion injury in pig livers. *Transplant. Proc.*, vol. 30 p. 3750-3, 1998.

- ISOBE, M.; KATSURAMAKI, T.; HIRATA, K.; KIMURA, H.; NAGAYAMA, M.; MATSUNO, T. Beneficial effects of inducible nitric oxide synthase inhibitor on reperfusion injury in the pig liver. *Transplantation*, Vol. 68(6) p. 803-13, 1999.
- ISOZAKI, H.; GIGOU, M.; SZEKELY, A.M.; SHEN, M.; BISMUTH, H. Experimental study of the protective effect of intermittent hepatic pedicle clamping in the rat. *Br. J. Surg.*, vol. 79 p.310-13, 1992.
- JEFAYRI, MK.; GRACE, P.A .; MATHIE, R.T. Attenuation of reperfusion injury by renal ischaemic preconditioning: the role of nitric oxide. *Br. J. Urol. Intern.*,vol. 85 p.1007-13, 2000.
- KARWINSKI, W.; BOLANN, B.; ULVIK, R.; FARSTAD, M.; SOREIDE,O. Normothermic liver ischemia in rats: Xanthine oxidase is not the main source of oxygen free radicals. *Res. Exp. Med.*, vol. 193 p.275-83, 1993.
- KARWINSKI, W.; FARSTAD, M.; ULVIK, R.; SOREIDE, O. Sixty-minute normothermic liver ischemia in rats-Evidence that allopurinol improves liver cell energy metabolism during reperfusion but that timing of drug administration is important. *Transplantation*, vol. 52(2) p.231-4, 1991.
- KARWINSKI, W.; ULVIK, R.; FARSTAD, M.; SVARDAL, A.; BERGE, R.; SOREIDE, O. Effect of allopurinol on the concentration of endogenous glutathione in hepatocytes after an hour of normothermic liver ischemia. *Eur. J. Surg.*, vol. 159:355-9, 1993.
- KIN, S.; SASAKI, T.; GU, K. The citoprotective role of nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in the rat kidney. *Transplant. Proc.*, vol. 27 p. 754-6, 1995.
- KOBAYASHI, H.; NONAMI, T.; KUROKAWA, T.; TAKEUCHI, Y.; HARAD, A.; NAKAO, A.; TAKAGI, O H. Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J. Surg. Res.*, vol. 59 p.772-9, 1995.
- LAND, W. Oxygen free radicals in experimental organ transplantation. *Transplant. Proc.*, vol.30, p. 4227, 1998.
- LAND, W.; ZWEIER, J.L. Prevention of reperfusion-induced, free radical-mediated acute endothelial injury by superoxide dismutase as na effective tool to delay/prevent chronic renal allograft failure: a review. *Transplant. Proc.*, vol. 29 p. 2567-8, 1997.
- LANGREHR, J.M.; MACHENS, C.; KOCH, S.; ZILL, E.; LEDER, K.; NEUHAUS, P. Hematologic parameters are improved by inhibition of NO synthesis during graft-versus-host disease after small bowel transplantation. *Transplant. Proc.*, vol.32 p.1288-9, 2000.

- LANGREHR, J.M.; HOFFMAN, R.A. ; LANCASTER, J.R.; SIMMONS, R.L. Nitric oxide- a new endogenous immunomodulator. *Transplantation*, vol.55 p. 1205-12, 1993.
- LEFEBVRE, V.; GOFFIN, I.; CALDERON, P.B. Fructose protects rat hepatocytes during hypoxia and improves protein synthesis recovery during reoxygenation. *Transplant. Proc.*, vol. 27(5) p.2823-4, 1995.
- LEHNINGER, A.L.(Ed). *Princípios de Bioquímica*. 2 Ed. São Paulo: Sanvier, 1995. p. 16-354.
- LINAS, S.L.; SHANLEY, P.F.; WHITTENBURG,G.D.; BERGER, E.; REPINE, J.E. Neutrophils accentuate ischemia-reperfusion injury in isolated perfused rat kidneys. *Am. J. Physiol.*, vol. 255 (24) p. 728-35, 1988.
- LINAS, S.L.; WHITTENBURG,G.D.; REPINE, J.E. Role of xanthine oxidase in ischemia/ reperfusion injury. *Am. J. Physiol.*, vol. 258 p. 711-16, 1990.
- LIU, P.; YIN, K.; YUE, G.; WONG, P. Y-K. Role of nitric oxide in hepatic ischemia-reperfusion with endotoxemia. *J. Inflammation*, vol. 46 p. 144-54, 1996.
- LLESUY, S.F.; MILEI, J.; MOLINA, H.; BOWERIS, A.; MILEI, S. Comparision of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4-epiadriamycin in mice. *Tumori*, vol. 71 p. 241-9, 1985.
- LOPEZ-NEBLINA, F.; TOLEDO-PEREIRA, L.H.; IRMIRAN, R.; PAEZ-ROLLYS,A.J. Time dependence of Na-nitroprusside administration in the prevention of neutrophil infiltration in the rat ischemic kidney. *Transplantation*, vol. 61(2) p.1979-83, 1996.
- LOSONCZY, G.; BLOCH, J.F.; SAMSELL, L.; SCHOENL, M.; VENUTO, R.; BAYLIS, C. Impact of surgery on nitric oxide in rats: evdence for activation of inducible nitric oxide synthase. *Kidney Intern.*, vol. 51 p. 1943-9, 1997.
- MARUBAYASHI, S.; DOHI, K.; OCHI, K.; KAWASAKI, T. Role of free radicals in ischemia rat liver cell injury: prevention of damage by alfa-tocoferol administration. *Surgery*, vol. 99(2) p. 184-91, 1986.
- MARUBAYASHI, S.; DOHI, K.; YAMADA, K.; KAWASAKI, T. Role of conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemia rat liver cell injury. *Surgery*, vol. 110(3) p. 537-43, 1991.
- MARZI, I.; KNEE, J.; BÜHREN, V.; MENGER, M.; TRENTZ, O. Reduction by superoxide dismutase of leukocyte-endotelial adherence after liver transplantation. *Surgery*, vol.111(1) p.90-7, 1992.

- MASSBERG, S.; MESSMER, K. The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant. Proc.*, vol.30 p.42-17-4223, 1998.
- MATHEWS, W.R.; GUIDO, D.M.; FISHER, M.A.; JAESCHKE, H. Lipid peroxidation as molecular mechanism of liver cell injury during reperfusion after ischemia. *Free Rad. Biol. Med.*, vol. 16(6) p.763-70, 1996.
- MATIELI, J.E. Radicais oxigênio livres na isquemia e reperfusão hepática- Estudo experimental com a catalase. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1994, p.63. Tese de Doutorado em Cirurgia- Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1994.
- MAYES, P.A. Oxidación biológica. IN: HARPER, H.A.; RODWELL, V.W.; MAYES, P.A. Manual de química fisiológica. 7 Ed. México :El Manual Moderno, 1980. p 124 - 317.
- McCORD, J.M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. E. J. Med.*, vol. 312(3) p.159-63, 1985.
- McCORD, J.M. The superoxide free radical: its biochemistry and pathophysiology. *Surgery*, vol.94(3) p.412-4, 1983.
- MENEGHINI, R. A toxicidade do oxigênio. *Ciência Hoje*. vol. 5(78) p.57-62, 1987.
- MENGER, M.D. Microcirculatory disturbance secondary to ischemia-reperfusion. *Transplant. Proc.*, vol.27(5) p.2863-65, 1995.
- MENGER, M.D. Microcirculatory disturbances secondary to ischemia-reperfusion. *Transplant. Proc.*, Vol. 27(5) p. 2863-65, 1995.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, A . Nitric oxide : physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, vol. 43(2) p. 109-42, 1991.
- MUELLER, A .R.; PLATZ, K-P.; SHIRMEIER, A .; NÜSSLER, N.C.; SEEHOFER, D.; SCHMITZ, V.; NÜSSLER, A .K.; RADKE, C. L-arginine application improves graft morphology and mucosal barrier function after small bowel transplantation. *Transpl. Proc.*, vol. 32 p. 1275-7, 2000.
- MUMTAZ, F.H.; KHAN, M. A.; THOMPSON, C.S.; MORGAN, R.J.; MIKHALIDIS, D.P. Nitric oxide in the lower urinary tract: physiological and pathological implication. *Br. J. Urol. Intern.*, Vol.85 p.567-78, 2000.
- MYERS, S.I.; HERNANDEZ, R.M.S.; CASTANEDA, A .B.S. Possible role for oxygen free radicals in the regulation of renal nitric oxide synthesis and blood flow. *Am. J. Surg.*, vol.69(6) p. 604-8, 1995.

- NAUTA, R.J.; TSIMOYIANNIS, E.; WALSH, D.B.; MILLER, D.; BUTTERFIELD, A. Oxygen-derived free radicals in hepatic ischemia and reperfusion injury in the rat. *Surg. Gynecol. Obstet.*, vol. 171 p.120-5, 1990.
- NAYLOR, A .M. Endogenous neurotransmitters mediating penile erection. *Br. J. Urol.*, Vol. 81 p. 424-31, 1998.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. A lógica molecular da vida. IN: LEHNINGER,A.L. *Princípios de bioquímica*. 2 Ed. São Paulo: Sanvier, 1995. p. 1-15.
- NICOLLI, A.; COSTANTINI, P.; BASSO, E.; COLONNA, R.; PETRONILLI, V.; BERNARDI, P. Potential role of cyclosporin A-sensitive mitochondrial channels in ischemia-reperfusion injury. *Transplant. Proc.*, vol. 27(5) p. 2825-6, 1995.
- NILSSON, V.A.; HARALDSSON, G.; BRATELL, S.; SORENSEN, V.; AKERLUND, S.; PETTERSSON, S.; SCHERSTEN, T.; JONSSON, O. ESR-measurement of oxygen radicals in vivo after renal ischemia in the rabbit. Effects of pre-treatment with superoxide dismutase and heparin. *Acta Physiol. Scand.*, vol. 147 p.263-70, 1993.
- NORDSTRÖM, G.; SEEMAN, T.; HASSELGREN, P-O. Beneficial effect of allopurinol in liver ischemia. *Surgery*, vol.97(6) p.679-84, 1985.
- NUNES, F.A.; KUMAR, C.; CHANCE, B.; BRASS, C.A. Chemiluminescent measurement of increased free radical formation after ischemia/reperfusion. *Dig. Dis. Scien.*, vol. 40(5): 1045-53, 1995.
- NÜSSLER, N.C.; O'BRIEN, J.; STANGE, B.; PLATZ, K.P.; NEUHAUS, P.; MULLER, A .R. IL-2 promotes the subset restoration of intraepithelial lymphocytes after ischemia/reperfusion injury. *Transplant. Proc.*, vol.32 p.1305-6, 2000.
- OHKAWA, H.; OHISHI ,N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analyt. Biochem.*, vol. 95:351-8, 1979.
- OREDSSON, S.; PLATE, G.; QVAFORDT, P. Reperfusion injury in skeletal muscle. *Transplant. Proc.*, vol. 27(5) p.2831-3, 1995.
- ORTOLANI, O.; CAGGIANO, M.; MANNELLI, R.; GOLIAETINO, A.; TUFANO, R. Protection from ischemia-reperfusion damage in patients with stroke: the role of rutin and GSH. *Transplant. Proc.*, vol. 27(5) p. 2877-8, 1995.
- PALLER, M.S.; HOIDAL, J.R.; FERRIS, T. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J. Clin. Invest.*, vol. 74:1156-64, 1984.
- PAPADIMITRIOU, M.; ALEXOPOULOS, E.; VARGEMEZIS, V.; SAKELLARIOU, G.; KOSMIDOU, I.; METAXAS, P. The effect of preventine administration of

- verapamil on acute ischemic renal failure in dogs. *Transplant. Proc.*, vol. 16 p.44-46, 1994.
- PARKS, D.A.; BULKLEY, G.B.; GRANGER, D.N. Role of oxygen-derived free radicals in digestive tract diseases. *Surgery*, vol. 94(3) p.415-22, 1983.
- PARKS, D.A.; BULKLEY, G.B.; GRANGER, D.N. Role of oxygen free radicals in shock, ischemia, and organ preservation. *Surgery*, vol. 94(3) p.428-31, 1983.
- POLI, G. Liver damage due to free radicals. *British Medical Bulletin*, vol. 49(3) p.604-20, 1993.
- PRILLAMAN, H.M.; TURNER, T.T. Rescue of testicular function after acute experimental torsion. *J. Urol.*, vol. 157, p.340-5, 1997.
- PUNCH, J.; REES, R.; CASHMER, B.; WILKINS, E.; SMITH, D.J.; TILL, G.O. Xanthine oxidase: Its role in the no-reflow phenomenon. *Surgery*, vol. 111(2) p.169-76, 1992.
- RHODEN, C.R.; DACANAL, F.M.; LUCAS, M.L.; RHODEN, E.L. Repercussões da inibição da produção de óxido nítrico no dano causado por radicais livres na síndrome de isquemia-reperfusão em ratos. *Revista HCPA*, vol. 18 p. 77, 1998.(a)
- RHODEN, E.L. Efeitos do alopurinol na síndrome da isquemia e reperfusão renal: estudo experimental em ratos. Porto Alegre: Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas d Porto Alegre e Hospital da Santa Casa de Porto Alegre, 1997, 140 p. Dissertação de Mestrado - Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica.(b)
- RHODEN, E.L.; MAURI, M.; PETTEFFI, L.; BELLÓ-KLEIN, A.; KALIL, A.; PEREIRA-LIMA, L.; RHODEN, C.R. Lipoperoxidação das membranas celulares dos hepatócitos causada pela formação de radicais livres em fígados submetidos à isquemia-reperfusão: modelo experimental em ratos. *Rev. Col. Bras. Cir.*, vol. 86(1) p.2-5, 1996. (c)
- RHODEN, E.L.; MAURI, M.; PETTEFFI, L.; BELLÓ-KLEIN, A.; KALIL, A.N.; PEREIRA-LIMA, L.; RHODEN, C.R. Efeito da reperfusão na lesão tecidual causada por radicais livres em ratos submetidos à isquemia hepática. *Rev. GED*, vol. 15(2) p.49-52, 1996. (d)
- RHODEN, EL; MAURI, M; PETTEFFI, L; BELLO-KLEIN, A; KALIL, AN; PEREIRA-LIMA, L; RHODEN, CR. Provas de função hepática e lipoperoxidação de membranas celulares: uma forma de avaliação do dano tecidual causado pela isquemia-reperfusão hepática em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, vol.11(1) p.19-23, 1996. (e)

- RHODEN,EL; PETTEFFI, L; MAURI, M; BELLÓ-KLEIN, A; KALIL, AN; PEREIRA-LIMA, L; RHODEN, EL. O papel dos radicais livres no dano hepático causado pela isquemia-reperfusão em ratos. Rev. Col. Bras. Cir., vol.24(2) p. 89-93, 1996. (f)
- RHODEN,EL; MAURI, M; PETTEFFI, L; BELLÓ-KLEIN, A; ZETTLER, CG; RHODEN, CR. Efeito protetor da colchicina no dano tecidual causado por radicais livres na cirrose hepática: um estudo experimental em ratos. Arq. Gastroenterol., vol. 34(2) p.91-6, 1997. (g)
- RHODEN,EL; MAURI, M; PETTEFFI, L; BELLÓ-KLEIN, A; KALIL, AN; RHODEN, CR. Efeitos da isquemia e reperfusão no fígado cirrótico: estudo experimental em ratos. Rev Col. Bras. Cir., vol 24(5) p.311-15, 1997. (h)
- RHODEN, EL; MAURI, M; PETTEFFI, L; DACANAL, F; PILLA, M; BARROS, E; BELLÓ-KLEIN, A; TELOKEN, C; RHODEN, C. Efeitos do alopurinol na função renal após isquemia e reperfusão do rim: estudo experimental em ratos. Rev Bras. Cir., vol. 87(5) p.225-228, 1997. (i)
- RHODEN, EL; MAURI, M; PETTEFFI, L; DACANAL, F; PILLA, M; BELLÓ-KLEIN, A; TELOKEN, C; BARROS, E; RHODEN, C. Efeitos do alopurinol sobre a lipoperoxidação de membranas celulares renais na síndrome da isquemia e reperfusão renal: estudo experimental em ratos. Acta Cirúrgica Brasileira, vol.13(2) p. 73-79, 1998. (j)
- RHODEN, EL; RHODEN,CR;MAURI,M; LUCAS,ML; BELLÓ-KLEIN,A; TELÖKEN,C; SOUTO, CAV. Modelo experimental de isquemia-reperfusão renal em ratos: estudo do estresse oxidativo provocado pelos radicais livres derivados do oxigênio. J. Bras. Urol., vol. 25(3) p. 431-435, 1999. (k)
- RHODEN, E.R.; MAURI, M.; RHODEN,C.R.;LEAL, M.L.M.; SABEDOTTI, M.;LUCAS,M.L.; PEREIRA-LIMA, L. Taxa de mortalidade em ratos submetidos 'a isquemia e reperfusão hepática, tratados ou não com alopurinol. Acta Cirúrgica Brasileira, vol.14(4) p. 166-170, 1999. (l)
- RHODEN, E.L.; PEREIRA-LIMA,L.; MAURI,M.; LUCAS, M.L.; RHODEN, C.R.; BELLÓ-KLEIN, A . Effect of inhibition of xanthine oxidase in hepatic cells lipid peroxidation. Med. Scien. Res., vol.27(12) p. 829-30, 1999. (m)
- RHODEN, E.L.; LUCAS, M.; RHODEN, C.R.; TELOKEN, C.; SOUTO, C.A .V.: Espécies ativas do oxigênio (EAO) na isquemia e reperfusão sanguínea de órgãos. Revista Médica da Santa Casa, vol. 10(17) p.1867-75, 1999. (n)
- RHODEN, E.L.; TELOKEN, C.; LUCAS, M.; RHODEN, E.L.; BELLÓ-KLEIN, A.: Efeito protetor do alfa-tocoferol na isquemia-reperfusão renal em ratos. Rev Ang. Cir. Vasc., vol.9(3) p. 96-99, 2000. (o)
- RHODEN, E.L.; PEREIRA-LIMA, L.; LUCAS, M.; MAURI, M.; RHODEN, C.R.; PEREIRA-LIMA, J.C.; ZETTLER, C.; PETTEFFI, L.; BELLÓ-KLEIN, A . The

effects of allopurinol in hepatic ischemia and reperfusion: experimental study in rats. *Eur. Surg. Res.*, vol. 32 p.215-222, 2000. (p)

RIERA, M.; HERRERO, I.; TORRAS, J.; CRUZADO, J.M.; FATJO, M.; LLOBERAS, N.; ALSINA, J.; GRINYO, J.M. Ischemic preconditioning improves postischemic acute renal failure. *Transplant. Proc.*, vol. 31 p. 2346-7, 1999.

RINALDI, M.; MARTINELLI, L.; VOLPATO, G.; MINZIONI, G.; GOGGI, C.; MANTOVANI, V.; VIGANO, M. University of wisconsin solution provides better lung preservation in human lung transplantation. *Transplant. Proc.*, vol. 27(5) p.2869-71, 1995.

ROSENBLUM, E.R.; GAVALER, J.S.; VAN THIEL, D.H. Lipid peroxidation: a mechanism for alcohol-induced testicular injury. *Free Rad. Biol. Med.*, vol. 7 p. 569-77, 1989.

SAITO, M.; MIYAGAWA, I. Direct detection of nitric oxide in rat urinary bladder during ischemia-reperfusion. *J. Urol.*, vol. 162 p. 1490-5, 1999.

SALAZAR, F.J.; PINILLA, J.M.; LOPEZ, F.; ROMERO, J.C.; QUESADA, T. Renal effects of prolonged synthesis inhibition of endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension*, vol. 20 p.113-117, 1992.

SALAZAR, F.J.; ALBEROLA, A.; PINILLA, J.M.; ROMERO, J.C.; QUESADA, T. Salt-induced increase in arterial pressure during nitric oxide synthesis inhibition. *Hypertension*, vol. 22 p. 49-55, 1993.

SHOSKES, D.A.; XIE, Y.; GONZALEZ-CADAVID, N.F. Nitric oxide synthase activity in renal ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation*, Vol.,63 p. 495-500, 1997.

SHRAMM, L.; HEIDBREDE, E.; SCHMITT, A. Role of L-arginine-derived NO in ischemic acute renal failure in the rat. *Renal Fail.*, vol. 16 p. 555-69, 1994.

SOUTHARD, J.H.; MARSH, D.C.; McANULTY, J.F.; BELZER, F.O. Oxygen-derived free radical damage in organ preservation: activity of superoxide dismutase and xanthine oxidase. *Surgery*, vol. 101(5) p.566-70, 1987.

STEIN, H.J.; OOSTHUIZEN, M.M.J.; HINDER, R.A.; LAMPRECHTS, H. Effect of verapamil on hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am. J. Surg.*, vol. 165 p.96-100, 1993.

STORCK, M.; KROMBACH, F.; PRESTEL, R.; HAMMER, C.; ABENDROTH, D. Role of leukocyte adhesion molecules during ex vivo kidney xenoperfusion. *Transplant. Proc.*, vol. 29 p. 3011-12, 1997.

- SUBRAMANIAN, S.; BOWYER, M.W.; CRAIG EGAN, J.; KNOLMAYER, T.J. Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury with selectin inhibition in a rabbit model. *Am. J. Surg.*, vol. 178 p. 573-6, 1999.
- TAKAHASHI, N.; SUZUKI, T.; YAMAYA, K.; FUNYU, T. Nitric oxide generation in renal allograft recipients. *Transplant. Proc.*, vol. 30 p. 2960-62, 1998
- TAKAYAMA, F.; EGASHIRA, T.; YAMANAKA, Y. Effect of diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug, on lipid peroxidation caused by ischemia-reperfusion in rat liver. *Jpn. J. Pharmacol.*, vol. 64 p.71-8, 1994.
- TAKEMOTO, Y.; UCHIDA, M.; NAGASUE, N.; OHIWA, K.; KIMOTO, T.; DHAR, D.K.; NAKAMURA, T. Changes in calcium content of the liver during hepatic ischemia-reperfusion in dogs. *J. Hepatol.*, vol. 21 p.743-7, 1994
- USHIGOME, H.; YOSHIMURA, N.; SANO, H.; NAKAMURA, K.; OKA, T. Expression of tissue factor in renal ischemic-reperfusion injury. *Transplant. Proc.*, vol. 30 p. 3764-5, 1998.
- WAZ, W.R.; VAN LIEW, J.B.; FELD, L. Nitric oxide metabolism following unilateral renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Pediatr. Nephrol.*, Vol.,12 p.26-9, 1998.
- WEINBERG, J.M. The cell biology of ischemic renal injury. *Kidney Int.*, vol.39 p.476-500, 1991.
- WILLET, K.; VAZ DE MACEDO, D.; DETRY, O.; EVENS, A.; PEREIRA DA SILVA, L.; SLUSE, F.E. Mitochondrial oxidative phosphorylation injuries occurring in situ and in vivo- *Transplant. Proc.*, vol. 27(5) p. 2827-8, 1995.
- WOHAIEB, S. A .; GODIN, D.V. Starvation-related alterations in free radical tissue defense mechanisms in rats. *Diabetes*, vol. 36 p. 169-73, 1987.
- YIN, M.; KURVERS, H.A.J.M.; TANGELDER, G.J.; BOOSTER, M.H.; DAEMEN, J.H.C.; KOOSTRA, G. Intravital microscope studies of the ischemically injured rat kidney during the early phase of reperfusion. *Transplant. Proc.*, vol. 27(5) p. 2847-8, 1995.
- YU, L.; GENGARO, P.E.; NIEDERBERGER, M.; BURKE, T.J.; SCHIER, R.W. Nitric oxide: a mediator in rat tubular hypoxia-reoxygenation injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 91 p. 1691-95, 1994.
- ZAGER, R.A.; GMUR, D.J. Effects of xanthine oxidase inhibition on ischemic acute renal failure. *Acta J. Physiol.*, vol.257 p.953-8, 1989.
- NOTA: A citação das referências bibliográficas seguiu as normas preconizadas pelo Sistema Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial/ Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023, Agosto de 1989.

5.0 Publicações

Trabalho 1: Aceito para publicação na Revista European Journal of Surgery

Role of the L-arginine/Nitric Oxide pathway in renal ischaemia-reperfusion in rats

Ernani Luis Rhoden, Luiz Pereira-Lima, Claudia Ramos Rhoden, Marcio Luis Lucas, Claudio Teloken, Adriane Belló-Klein.

From the Course of Post-Graduation in Medical Clinic of the Clinical Hospital of Porto Alegre, Department of Pharmacology and Urology, Porto Alegre School of Medical Science/Santa Casa University Hospital and Laboratory of Cardiovascular Physiology of Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil,

ABSTRACT

Objective: To study the role of L-arginine/nitric oxide (NO) pathway during renal ischemia-reperfusion in rats

Design: Randomised experimental study

Setting: Teaching hospital, Brazil

Animals: 97 male Wistar rats randomly assigned to 4 groups for the assessment of renal dysfunction and to 6 groups for the assessment of the oxidative stress induced on renal cell membranes by ischemia-reperfusion.

Interventions: The animals underwent sham-operation or renal ischemia-reperfusion with or without pretreatment with L-arginine (a NO donor) or L-NAME (N^G-nitro-L-arginine methyl ester - an inhibitor of NO production).

Main outcome measures: serum creatinine concentrations and oxidative stress through chemiluminescence initiated by the tert-butyl hydroperoxide technique.

Results: Renal ischemia-reperfusion significantly worsened renal dysfunction and increased oxidative stress in the ischemia-reperfusion group after 24 and 96 hours of reperfusion compared to the control group ($p < 0,05$). Pretreatment with L-NAME slightly but not significantly increased serum creatinine concentrations levels after 24 and 96 hours of reperfusion together with activity of reactive oxygen species during renal ischemia-reperfusion. L-arginine also significantly protected renal function and reduced in the amount chemiluminescence induced by giving L-NAME during 24 and 96 hours of reperfusion ($p < 0,05$).

Conclusion: L-arginine/NO pathway seems to have a slightly protective effect on the kidney after renal ischaemia-reperfusion injury in rats. These results need to be confirmed by studies conducted in human beings.

Key Words: Renal ischaemia, Nitric oxide, L-arginine, L-NAME, lipid peroxidation, chemiluminescence, cratinine, experimental surgery

INTRODUCTION

Renal injury induced by ischemia-reperfusion is an important cause of organ dysfunction in renal transplantation, revascularization of renal arteries, partial nephrectomies and surgical treatment of suprarenal aneurysms (3,6). Tissue ischaemia-reperfusion injury can be explained by several mechanisms, including release of reactive oxygen species (ROS), such as superoxide (O_2^-), hydroxyl (OH^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2), during tissue reoxygenation; leukocyte accumulation; and subsequent release of additional ROS and lysosomal enzymes (3,22). The renal ischaemic process is characterized by reduced renal blood flow, reduced glomerular filtration rate, and decreased glomerular ultrafiltration coefficient caused by tubular epithelium damage (3,21,22).

Nitric oxide (NO), a highly important endogenous vasodilator, is a soluble free radical gas produced by several cell types, such as the endothelial cells. It is synthesised from L-arginine, molecular oxygen and cofactors (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, flavin adenine dinucleotide, and flavin mononucleotide) by the enzyme nitric oxide synthase (NOS). The L-arginine/NO pathway has been implicated in several pathophysiological mechanisms such as tissue ischemia-reperfusion (9,14,15). NO also seems to play an ambiguous role in tissue ischemia-reperfusion: it has a vasodilator effect that protects the ischemic tissue during ischaemia but in the tissue reoxygenation phase, it seems to act as a superoxide radical scavenger by preventing the chain reaction that is responsible for the additional ROS production that occurs during this phase (10). In addition, the interaction between NO and O_2^- during the reperfusion phase can account for the formation of peroxynitrite radical ($ONOO^-$), an important agent that can cause lipid peroxidation of cell membranes (9). NO seems to reduced leukocyte adhesion and transendothelial migration by inhibiting the activity of the phospholipases and reducing formation of intracellular inflammatory mediators during tissue ischemia-reperfusion (10).

The purpose of this experimental study was to assess renal dysfunction and oxidative stress of renal cell membranes in rats pretreated with L-arginine (a NO

precursor) or L-NAME (N^G -nitro-L-arginine methyl ester - an inhibitor of NOS) and when had renal ischemia-reperfusion induced.

MATERIALS AND METHODS

Ninety-seven Wistar rats weighing from 240 to 330gm were randomly assigned to two experiments: analysis of the renal cell lipid peroxidation and study of the serum creatinine concentrations. All animals were kept at room temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), under environmental lighting from 7:00 to 1900 h, with access to food pellets and water during the experiments. The animals were housed in plastic cages (47 x 34 x 18 cm, four animals in each cage) lined with saw-dust renewed at every 48 h. All experiments were approved by the local Committee for Animal Use and Care.

Study groups

Renal Function: We used 39 rats, with only one kidney (right nephrectomy performed 15 days before) divided into four groups. Control group (n=10): rats had a sham-operation (the left renal pedicle was dissected and exposed during 50 minutes); I-R group (n=10): rats had the left renal pedicle clamped (except the ureter) for 50 minutes, followed by renal reperfusion (removal of the clamps); L-NAME + I-R group (n=10): animals were pretreated with 20mg/kg L-NAME (Sigma, Brazil), given intraperitoneally 20 minutes before renal ischaemia-reperfusion; L-arg + I-R group (n=9): animals were pretreated with 200mg/kg L-arginine (Sigma-Brazil) given intraperitoneally 20 minutes before renal ischaemia-reperfusion.

Lipid peroxidation: The animals (n=58) were randomly distributed into six groups: the control group (n=9): rats which had a sham-operation; ischaemic (I) group (n=9): had renal ischaemia induced for 50 minutes; I-R group (n=10): animals had the left renal pedicle clamped (except for the ureter) for 50 minutes, followed by one hour of renal reperfusion; L-NAME + I-R group (n=10): animals were pretreated with L-NAME given intraperitoneally 20 minutes before renal ischaemia-reperfusion; L-arg + I-R group (n=10): animals were pretreated with L-arginine given intraperitoneally 20 minutes before renal ischaemia-reperfusion; and L-NAME + L-arg + I-R group (n =10): animals were pretreated with 20 mg/kg L-NAME and 200mg/kg L-arginine given intraperitoneally 20 minutes before the procedure.

Surgical technique

The severity of our model of renal ischaemia-reperfusion was based on that other reported experimental studies (1,18). The animals underwent a 12-hour fasting period preoperatively and were given general anaesthesia with ketamine hydrochloride 25 mg/kg and xylazine 10 mg/kg given intramuscularly. Throughout the experiments, body temperature was kept between 36° and 38°C by placing the rats on a heating pad.

Renal ischaemia-reperfusion was done through a left flank incision (2 to 2.5 cm) followed by dissection of the renal pedicle to expose the renal vessels. Non-traumatic vascular clamps were used to stop blood flow. Reperfusion was established by removing the clamps. The abdominal wall (muscular layer and skin) was closed with 3.0 polypropylene and 4.0 mononylon sutures.

Assay for the measurement of serum creatinine

After undergoing each group procedures, the animals were placed in plastic cages, and blood samples from the retroocular venous plexus were obtained after 24, 96 and 192 hours of renal reperfusion to measure serum creatinine concentrations. A volume of 0,9% chloride solution equal to that of the blood removed was given intraperitoneally. Serum creatinine concentrations were measured by spectrophotometric techniques (CELM, E 210) using the Diagnostic System Labtest Kits (Brazil).

Assay for the measurement of lipid peroxidation

Lipid peroxidation of the renal cell membranes was measured by chemiluminescence (CL) initiated by tert-butyl hydroperoxide (7), with the results being expressed as counts per second/mg of protein of luminous energy emitted as a result of the return of excited carbonyls and singlet oxygen to the fundamental state during lipid peroxidation. The renal tissue was promptly excised, weighed and washed with 0,9% sodium chloride. It was then immediately homogenized in 1.15% potassium chloride (1 g of renal tissue for each 9 ml of potassium chloride) for 1

minute and centrifuged at 1000 g for 10 minutes (12,17). The precipitate was thrown away and the suspension (around 1 mg/ml of protein) was used for measuring lipid peroxidation by the CL method.

The suspension obtained as described above was put into scintillation vials. Phosphate buffer (potassium chloride 140 mmol , inorganic phosphate 20 mmol, and pH 7.4) and tert-butyl hydroperoxide 3 mmol were added. Light emission (CL) was measured in a liquid scintillation spectrometer (LKB - Rack Beta - Liquid scintillation Spectrometer - 1215, LKB Produkter, AB, Bromma, Sweden). Protein concentration was measured by the method by Lowry et al (13) with the use of bovine albumin as a standard.

Statistical analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) method and Bonferroni's t test were used to analyze CL values and serum creatinine concentrations. Probabilities of less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Serum creatinine concentrations at different times of reperfusion are shown in Figure 1. Renal ischaemia-reperfusion significantly increased serum creatinine concentrations after 24 and 96 hours of renal reperfusion ($p < 0.05$), and serum creatinine values returned to normal after 192 hours of reperfusion (0.45 ± 0.07 versus 0.42 ± 0.01 mg/dl; $p > 0.05$).

Pretreatment with L-NAME did not significantly worsen renal dysfunction after 24 and 96 hours of ischaemia-reperfusion but after 192 hours of reperfusion, serum creatinine concentrations remained significantly higher than those of the non-treated group (0.70 ± 0.27 versus 0.45 ± 0.07 mg/dl) ($p < 0.05$).

Pretreatment with L-arginine significantly protected renal function 24 and 96 hours after operation in the L-arg + I-R group compared with the I-R and L-NAME + I-R groups ($p < 0.05$). This protective effect of L-arginine did not persist after 192 hours of reperfusion, because serum creatinine concentrations significantly higher than those of the non-treated group (0.61 ± 0.08 versus 0.45 ± 0.07 mg/dl) ($p < 0.05$).

Data from the CL study are shown in Table I. The CL in the ischemic group did not differ significantly from the control group (6360 ± 715 versus 3763 ± 633 cps/mg of protein) ($p > 0.05$). The amount of renal CL was significantly higher in the ischaemia-reperfusion group than in the ischaemic and sham-operated groups ($p < 0.05$).

Pretreatment with L-NAME significantly increased the oxidative stress of renal cell membranes after renal ischaemia-reperfusion ($p < 0.05$). Nevertheless, the stress was lessened by giving L-arginine simultaneously ($p < 0.05$).

DISCUSSION

In summary, the renal ischaemia-reperfusion syndrome impaired renal function and increased the oxidative stress in renal cells rats. Renal dysfunction was affected, but not significantly so, and renal CL was significantly increased by inhibition of NO ($p < 0.05$). Pretreatment with L-arginine could reduce the amount of renal dysfunction and the degree of oxidative stress in the rats having renal ischemia-reperfusion. Pre-treatment with L-NAME or L-arginine resulted in a delayed recovery of renal integrity after renal ischaemia-reperfusion, with higher concentrations of serum creatinine than in the untreated ischaemic group after 192 hours of reperfusion.

During tissue ischaemia-reperfusion, reactive oxygen species (ROS), such as superoxide radical (O_2^-), hydroxyl radical (OH^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2), can induce cell injury through lipid peroxidation reactions in cell membranes, and this alters membrane structure and function (18,19). In the kidney, these alterations can increase tubular permeability with loss of membrane exchange functions as well as reduction of mitochondrial oxidative phosphorylation and release of lysosomal enzymes; this can accelerate cellular degradation process with consequent impairment of renal function (1, 18).

The integrity of renal function depends on the balance between vasodilator and vasoconstrictive factors. During renal ischaemia the endothelial damage can start a vicious circle of ischemic injury with the release of vasoconstrictive substances, such as the endothelins, and deficiency of vasodilator factors, such as NO (3). Several authors think that renal tissue is much more sensitive to decreased NO stores than other tissues, as pretreatment with L-NAME significantly reduces natriuresis, diuresis and glomerular filtration without altering blood pressure (11,20).

The pathophysiological mechanism of the tissue injury caused by the interaction between NO and ROS is shown in Figure 2. During the reoxygenation phase, superoxide radical (O_2^-) can react with NO to generate peroxynitrite

(ONOO⁻). This free radical can cause lipid peroxidation of cell membranes (20). In our experiments, we noted that NO inhibition can exacerbate the damage induced by ROS during renal ischemia-reperfusion in rats. These results are corroborated by other authors' studies, which have shown that NO precursors particularly L-arginine, may have protective effects on the kidney during tissue ischemia-reperfusion (4,16). These facts indicate that the interaction between NO and ROS can be beneficial, since ONOO⁻ possibly acts as a superoxide radical scavenger, making it impossible to perpetuate the lipid peroxidation chain reactions that result in the generation of other free radicals (H₂O₂ and OH⁻) (8,19). If the O₂⁻/NO ratio increases via overproduction of O₂⁻ or impairment of NO synthesis, O₂⁻ will produce H₂O₂ and promote the activation of phospholipase A2, thereby synthesising proinflammatory lipid mediators such as PAF (platelet-activating factor) and LTB₄ (leukotriene B₄), which increases the leukocyte adhesion and oxidative injury caused by tissue ischemia-reperfusion (8).

Basal production of NO is necessary to maintain adequate glomerular function, because the inhibition of NO synthesis may increase both efferent glomerular arteriolar resistance and glomerular capillary pressure as well as induce significant changes in renal histology (21). Chintala et al., showed that NO inhibition may exacerbate renal dysfunction, while NO precursors may improve renal function (5). Our findings agree with those of Salazar et al., who verified that the impairment of renal function caused by NO depletion was transitory (20). After a period of renal dysfunction, renal function can return to normal within a few days, as a result of the activity of NO and its short half-life (9,14).

Bhardwaj et al. showed that L-arginine can decrease renal vascular resistance and significantly improve renal function after ischaemia (2). This protective effect of L-arginine can result from the inhibitory effect of NO on leukocyte accumulation and its vasodilator properties during the ischaemic phase (9).

We conclude that NO has an important role in renal ischaemia-reperfusion in rats, because its inhibition can increase the degree of renal dysfunction as well as exacerbate the oxidative stress induced by ROS in these animals. L-arginine

can also protect renal function and reduce the injury induced by ROS in postischaemic kidneys. However, it is essential to confirm the real efficacy of NO donors by analysing other variables such as diuresis, natriuresis, myeloperoxidase activity, histological alterations, plasma-concentrations of nitrite and nitrate, endogenous creatinine clearance and NOS activity as giving different doses of L-NAME and L-arginine and using other direct methods for measuring ROS activity. At present, the clinical and therapeutic importance of the NO modulators in the ischaemic kidney are not known; however, these agents show promise by their ability to maintain renal function after ischemia-reperfusion. NO modulators can therefore be used to reduce the damage induced by renal ischaemia-reperfusion in humans.

REFERENCES

1. Baker GL, Corry RJ, Autor AP. Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion: protective effect of superoxide dismutase. *Ann Surg* 1985; 202: 628-41.
2. Bhardwaj R, Moore PK. The effect of arginine and nitric oxide on resistance blood vessels of the perfused rat kidney. *Br J Pharmacol* 1989; 97: 739.
3. Bonventre JV. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 1993; 43: 1160-78.
4. Burra P, Ferrareso M, Cadrobbi R et al., Effect of L-arginine and oligotide on liver ischaemia-reperfusion injury. *Transplant Proc.*, 1997; 29: 2992-3.
8. Chintala MS, Chiu PJS, Vemulapalli S et al. Inhibition of endothelium derived relaxing factor (EDRF) aggravates ischemic acute renal failure in anesthetized rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1993; 348: 305-310.
9. Defraigne JO, Detry O, Pincemail J et al., Direct evidence of free radical production after ischaemia and reperfusion and protective effect of desferrioxamine: ESR and vitamin E studies. *Eur J Vasc Surg.*, 1994; 8:537-543.
10. Gonzales-Flecha B, Llesuy S, Boveris A . Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: na assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Rad Biol Med.*, 1991; 10:93-100.
11. Grisham MB. Interaction between nitric oxide and superoxide: role in modulating leukocyte adhesion in the posischemic microvasculature. *Transplant Proc.*, 1995; 27:2842-2843.
12. Gross SS, Wolin MS. Nitric oxide: pathophysiologic mechanisms. *Ann Rev Physiol* 1995; 57: 737-69.
13. Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T et al. Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Surg Res* 1995; 59: 772-779.
14. Lahera V, Salom MG, Miranda-Guardiola F, Moncada S, Romero C. Effects of Ng-nitro-L-arginine methyl ester on renal function and blood pressure. *Am J Physiol.*, 1991; 261: F1033-F1037.

- 15.Llesuy SF, Milei J, Molina H *et al.* Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori* 1985; 71: 241-9.
- 16.Lowry OH, Rosebrough MJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the foline reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265.
- 17.Lucas ML, Rhoden CR. Therapeutic potential of the inhibitors of nitric oxide synthase. *Rev Bras Cin Terap* 1999; 25: 29-37.
- 18.Moncada S, Higgs A. The L-arginine/nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-12.
- 19.Nilsson B, Yoshida T, Delbro D, Andrius S, Friman S. Pretreatment with L-arginine reduces ischemia-reperfusion injury of the liver. *Transplant Proc*, 1997; 29: 3111-3112.
- 20.Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analyt Biochem* 1979; 95: 351-8.
- 21.Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radical in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest* 1984; 74: 1156-64.
- 22.Rhoden EL, Rhoden CR, Mauri M *et al.* Experimental model of renal ischemia-reperfusion in rats: study of the stress oxidative induced by oxygen-derived free radicals. *Braz J Urol* 1999; 25: 431-6.
- 23.Salazar FJ, Pinilla JM, López F *et al.* Renal effects of prolonged synthesis inhibition of endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension* 1992; 20: 113-117.
- 24.Waz WR, Van Liew JB, Feld LG. Nitric oxide metabolism following unilateral renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Pediatr Nephrol* 1998; 12: 26-29.
- 25.Weinberg JM. The cell biology of ischemic renal injury. *Kidney Int* 1991; 39: 476-500.

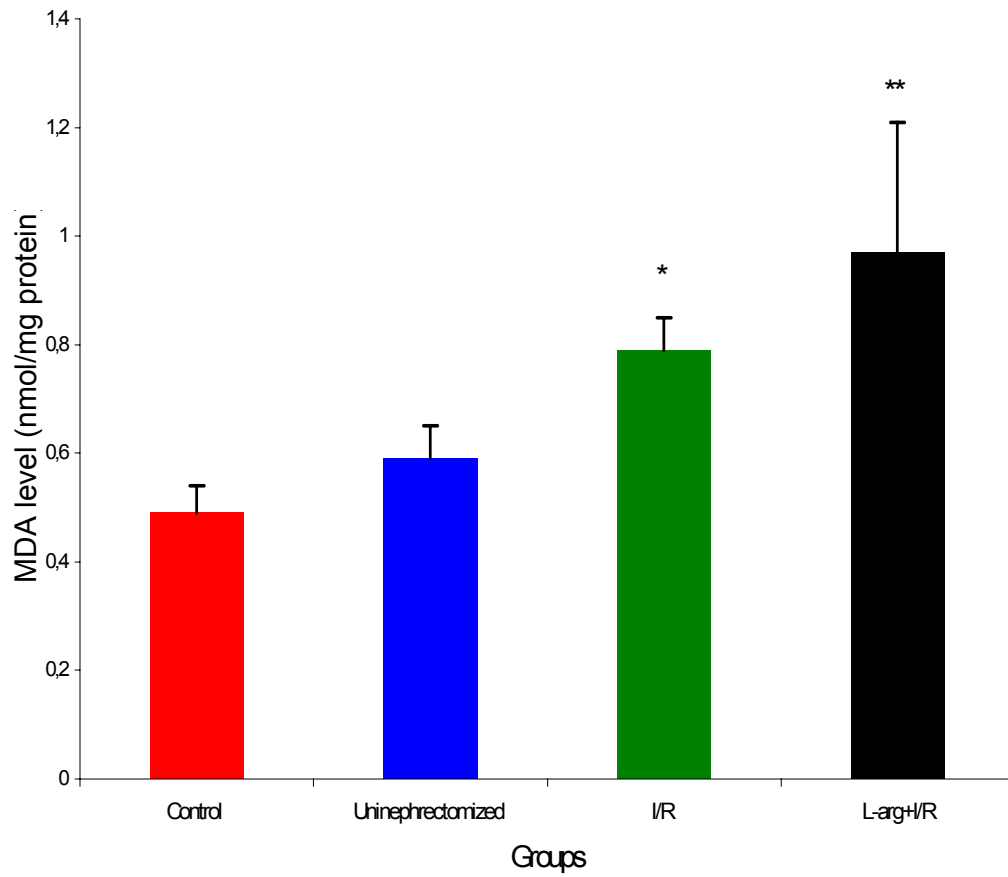


Figure 1. Mean (SD) serum concentrations of creatinine in the four groups of rats studied.

LEGEND OF FIGURE 1

*= $p < 0.05$ compared with *control* and *L-arg+I/R* groups, and **= $p < 0.05$ compared with *control* and *I/R* groups in the respective times after the procedure. *Controle* (n=10): sham-operation; *I/R* (n=10): left renal ischemia-reperfusion; *L-arg+I/R* (n=9): pretreated with L-arginine and submitted to renal I/R; *L-NAME+I/R* (n=10): pretreated with L-NAME and submitted to renal I/R. Each value represents mean \pm standart deviation. ANOVA method followed by Bonferroni's t test ($p < 0.05$).

Table 1. Mean (SD) renal chemiluminescence (cps/mg protein) in rats pretreated with L-arginine, or L-NAME, or both before renal ischaemia reperfusion injury

GROUPS	CL (cps/mg protein)
Control (n=9)	3763±633
I (n=9)	6360±715
I/R (n=10)	13660±1104*
L-NAME + I/R (n=10)	17482±4397* *
L-arg + I/R (n=10)	5574±909
L-NAME+L-arg+I/R (n=10)	5510±767

LEGEND OF TABLE 1

* $p < 0.05$ when compared to other groups. ** $p < 0.05$ when compared to other groups. *Control*: submitted to sham-operation; *I*: submitted to left renal ischemia for 50 minutes; *I/R*: left renal ischemia-reperfusion; *L-NAME+I/R*: pretreated with L-NAME and submitted to the renal I/R; *L-arg+I/R*: pretreated with L-arginine and submitted to renal I/R; *L-NAME + L-arg + I/R*: pretreated with two drugs and submitted to ischemia-reperfusion. Each value represents mean \pm standart deviation. ANOVA method, followed by Bonferroni's t test ($p < 0.05$).

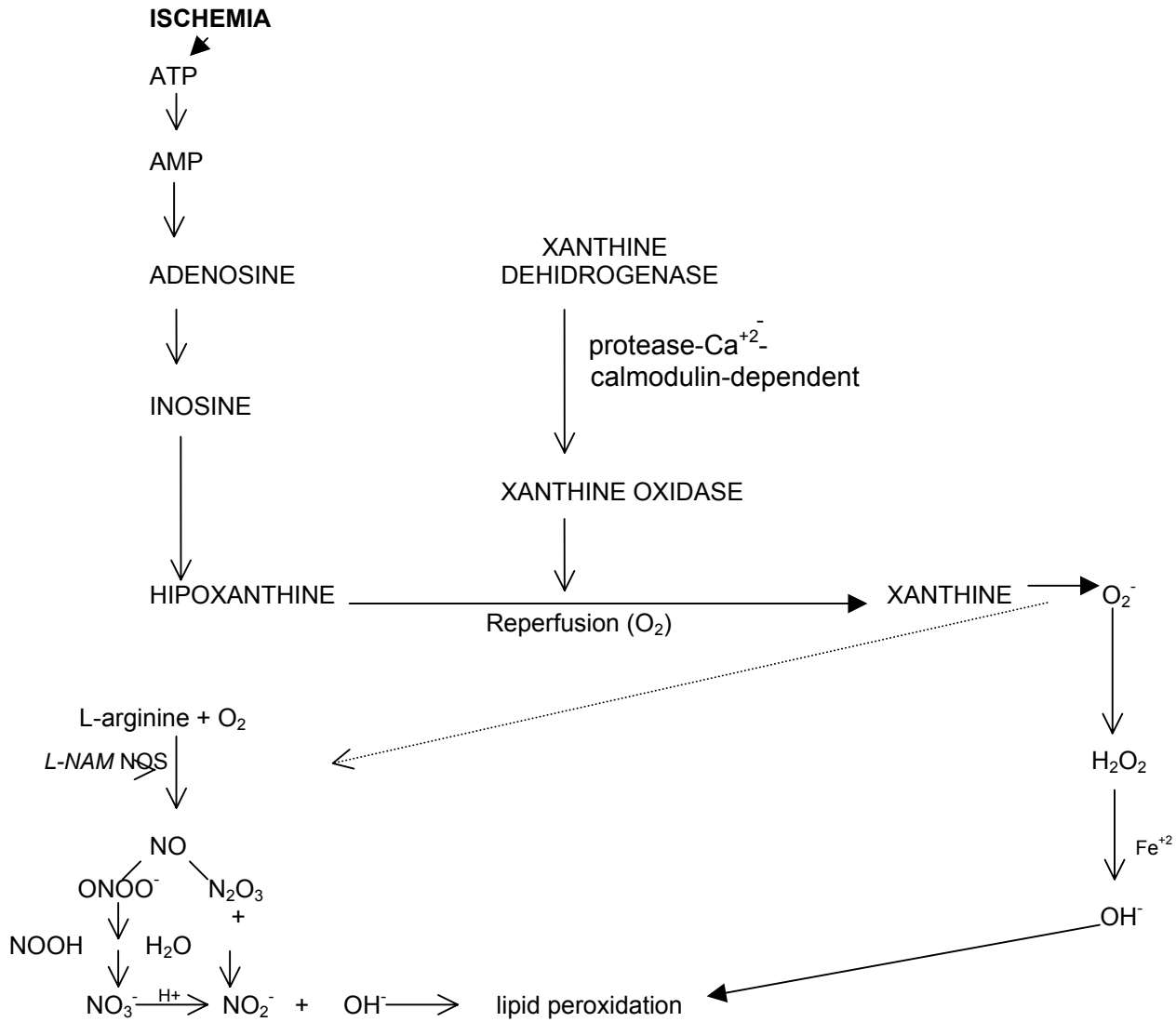


FIGURE 2

LEGEND OF FIGURE 2

Figure 2. Algorithm showing the proposed role of nitric oxide in ischaemia-reperfusion injury.

VERSÃO EM PORTUGUÊS (TRABALHO NÚMERO 1)

O papel da via L-arginina/Óxido Nítrico na isquemia-reperfusão renal em ratos.

Ernani Luis Rhoden, Luiz Pereira-Lima, Claudia Ramos Rhoden, Marcio Luis Lucas, Claudio Teloken, Adriane Belló-Klein.

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Departamento de farmacologia e Urologia, faculdade de Ciências Médicas de Porto Alegre/ Santa casa de Misericórdia de Porto Alegre e Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS Brasil.

RESUMO

Objetivo: Estudar o papel da via L-arginina/Óxido Nítrico durante a isquemia –reperfusão renal em ratos

Delineamento: estudo experimental randomizado

Local: Hospital escola, Brasil

Animais: Noventa e sete ratos machos Wistar foram randomizadamente divididos em quatro grupos para avaliar a disfunção renal associada com o fenômeno isquêmico–reperfusional renal e, outros 6 grupos de animais foram obtidos para avaliar os efeitos do estresse oxidativo sobre as membranas celulares renais, neste mesmo fenômeno.

Intervenções: Os animais foram submetidos a lombotomia e dissecação renal (sham) ou a isquemia e reperfusão renal com ou sem pré-tratamento com L-arginina(doador de NO) ou L-NAME (N^G-nitro-L-arginine methyl ester-um inibidor da produção de NO).

Principais desfechos: Creatinina sérica e estresse oxidativo avaliados pelo método da Quimiluminescência iniciada pelo hidroperóxido de Ter-butil.

Resultados: A isquemia–reperfusão piorou significativamente a função renal e elevou o estresse oxidativo no grupo de animais submetidos a isquemia-reperfusão 24 e 96 horas após o procedimento quando comparados com o grupo de animais controle (p<0.05). O pré-tratamento com L-NAME elevou porém não de forma significativa os níveis séricos de creatinina bem como a atividade das espécies reativas do oxigênio durante a isquemi-reperfusão renal. Além disso, a L-arginina significativamente exerceu uma ação protetora sobre a função renal e ao mesmo tempo

controlou a elevação do nível de quimiluminescência induzido pela administração do L-NAME nasa 24 e 96 horasapós o procedimento cirúrgico ($p<0,05$)

Conclusão: A via L-arginina/Óxido Nítrico parece exercer um leve efeito protetor renal no fenômeno isquêmico-reperfusional em ratos. Estes resultados necessitam ser confirmados através de estudos conduzidos em seres humanos.

Palavras Chaves: Isquemia renal, Óxido Nítrico, L-arginina, L-NAME, Lipoperoxidação, Qumiluminescência, Creatinina, Estudo experimental.

INTRODUÇÃO

A isquemia e reperfusão renal é um significativo fator de disfunção deste órgão em situações que envolvem fenômeno entre os quais destacam-se os transplantes renais, as revascularizações de artérias renais, as nefrectomias parciais e tratamentos cirúrgicos de aneurismas supra-renais entre outros (3,6). A lesão tecidual decorrente da isquemia e reperfusão de um determinado órgão ou tecido pode ser explicada por uma série de mecanismos tais como: liberação de espécies ativas do oxigênio (EAO) como o superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil durante a re-oxigenação tecidual; acúmulo leucocitário e subsequente liberação adicional de EAO e enzimas lisossomiais (3,22). A isquemia renal é um processo que se caracteriza pela redução do fluxo sanguíneo do rim, redução da taxa de filtração glomerular, decréscimo do coeficiente de ultrafiltração glomerular e por danos ao epitélio tubular (3,21,22).

O óxido Nítrico (NO), um importante agente vasodilatador endógeno, é um gás solúvel, e também radical livre, produzido por uma série de tipos celulares entre as quais podem-se ser destacadas as células endoteliais. O NO é sintetizado a partir da L-arginina, oxigênio molecular e cofatores (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido, flavina adenina nicotinamida, e flavina mononucleotídeo) pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). A via L-arginina/ NO tem sido implicada em uma série de mecanismos fisiopatológicos tais como os que envolvem o fenômeno isquêmico-reperfusional (9,14,15). Além disso, o NO também parece ter um papel ambíguo na isquemia e reperfusão tecidual, ou seja, apresentando um efeito vasodilatador que protege o tecido isquêmico durante a interrupção aferente do fluxo sanguíneo mas, na fase reperfusional, parece atuar como um detoxificador do radical superóxido prevenindo o desencadeamento da reação em cadeia que é responsável pela produção adicional de EAO que ocorrem nesta fase (10). Além disso, a interação entre o NO e o radical superóxido durante o período reperfusional pode levar a formação do radical peroxinitrito (ONOO-), um importante agente que pode causar lipoperoxidação das membranas celulares (9). O NO parece também exercer um efeito no sentido de reduzir a adesão leucocitária e a migração transendotelial, através de uma ação inibitória sobre as fosfolipases o que causa uma redução significativa da formação de mediadores inflamatórios intra-celulares durante a isquemia e reperfusão tecidual (10).

O propósito deste estudo experimental foi avaliar a disfunção renal e estresse oxidativo das membranas celulares renais em ratos pré-tratados com L-arginina (um precursor do NO) ou L-NAME (N^ω-nitro-L-arginina methyl ester- um inibidor da NOS), em um modelo de isquemia e reperfusão renal em ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Noventa e sete ratos Wistar pesando entre 240 e 330 gramas foram randomizadamente alocados para realização de dois experimentos: análise da lipoperoxidação das membranas celulares renais e estudo da função renal (creatinina sérica). Todos os animais eram mantidos em um ambiente de temperatura constante ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo claro das 7 as 19 horas, acesso a alimentação e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos em caixas de plástico (47x34x18cm, 4 animais por caixa). Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética responsável pela regulamentação dos trabalhos científicos que envolvem estudo com animais de experimentação no nosso meio.

Grupos de estudo

Função renal: utilizamos 39 ratos com rim único (ratos foram submetidos a nefrectomia direita 15 dias antes) divididos em 4 grupos: Grupo controle (n=10) estes animais foram submetidos a lombotomia e dissecação do pedículo renal e que permaneceu exposto por 50 minutos); Grupo I-R (n=10): ratos submetidos a isquemia renal através do pinçamento do pedículo, exceto o ureter, por um período de 50 minutos, seguido pela reperfusão (remoção das pinças vasculares); Grupo L-NAME+I-R (n=10): animais pré-tratados com 20 mg/kg de L-NAME (Sigma, Brazil), administrados, por via intraperitoneal, 20 minutos antes do procedimento de isquemia; Grupo L-arg+ I-R (n=9): animais foram pré-tratados com L-arginina 200mg/Kg (Sigma, Brasil), via intra-peritoneal 20 minutos antes do procedimento cirúrgico de isquemia.

Lipoperoxidação: os animais (n=58) foram randomizadamente distribuídos em 6 grupos: Grupo controle (n= 9) estes animais foram submetidos a lombotomia e dissecação do pedículo renal que permaneceu exposto por 50 minutos); Grupo isquemia (I) (n=9): submetidos a isquemia renal por 50 minutos não seguidos de reperfusão; Grupo I-R (n=10): ratos submetidos a isquemia renal através do pinçamento do pedículo, exceto o ureter, por um período de 50 minutos, seguido pela reperfusão do órgão por 1 hora através da remoção das pinças vasculares; Grupo L-NAME+I-R (n=10): animais pré-tratados com 20 mg/kg de L-NAME (Sigma, Brazil), administrados, por via intraperitoneal, 20 minutos antes do procedimento de isquemia de 50 seguidos por um período de reperfusão de 1 hora; Grupo L-arg+ I-R (n=10): animais foram pré-tratados com L-arginina 200mg/Kg (Sigma, Brasil), via intra-peritoneal 20 minutos antes do procedimento cirúrgico de isquemia ao qual se seguido um período de reperfusão de 1 hora; e Grupo L-NAME+L-arginina+I-R (n=10): neste grupo os animais foram pré-tratados com 20mg/kg de L-NAME e 200 mg/kg de L-arginina, via intraperitoneal 20 minutos antes dos procedimentos de isquemia e reperfusão descritos acima.

Técnica cirúrgica

O modelo de isquemia-reperfusão renal em ratos utilizado neste estudo foi baseado em relatos de outros autores (1,18). Os animais foram submetidos a um período de jejum de 12 horas pré-operatoriamente e, todos os animais foram submetidos a anestesia geral, para os procedimentos cirúrgicos propostos, utilizando-se hidrocloridrato de ketamina 25mg/kg e xylasina 10mg/kg por via intra-muscular. Durante todo o experimento os animais permaneciam sobre uma mesa cirúrgica adequadamente preparada e aquecida a 36-38 °C.

Para efetuar o procedimento de isquemia e reperfusão renal uma incisão lombar esquerda de 2-2,5cm, seguida da dissecação do pedículo para exposição dos vasos renais, foi efetuada. Pinças não-traumáticas vasculares foram utilizadas para interromper o fluxo sanguíneo nos vasos do pedículo renal. A parede abdominal foi fechada com sutura contínua em dois planos único utilizando-se fio monofilamentar de poplilpropileno 3.0 (músculo) e mononylon 4.0 (pele).

Mensurações da creatinina sérica

Após terem sido submetidos a cada um dos procedimentos descritos, os animais foram colocados em caixas plásticas, e amostras de sangue foram obtidas, através da punção do plexo arterio-venoso retro-ocular sob anestesia inalatória com éter etílico, 24, 96 e 192 horas após os procedimentos cirúrgicos para mensuração das concentrações da creatinina sérica. Soro fisiológico a 0,9% , por via intra-peritoneal, em igual volume era utilizado para re-hidratação após cada amostra de sangue removida. As concentrações séricas das creatininas foram medidas através de técnicas de espectrofotometria (CELM, E 210) utilizando Kits de Sistemas de Diagnóstico Labtest (Brazil).

Mensurações da lipoperoxidação

A lipoperoxidação das membranas celulares renais foram efetuadas através da quimiluminescência (CL) iniciada pelo hidroperóxido de tert-butyl (7), com os resultados expressos em contas por segundo por miligrama de proteínas de energia luminosa emitida como resultado do retorno de carbonilas excitadas e oxigênio singlet para o seu estado fundamental de repouso durante a ação de lipoperoxidação. Os rins, imediatamente após os procedimentos cirúrgicos de isquemia e ou reperfusão, foram removidos, pesados, incisados e lavados com cloreto de sódio a 0,9%. Imediatamente após, os tecidos renais foram homogeneizados em cloreto de potássio (KCl) a 1.15% (1 grama de tecido renal para cada 9 ml de KCl a 1,15%) durante 1 minuto, utilizando-se um homogeneizador Ultra-Turrax, e centrifugados durante 10 minutos a 1000g (12,17). O

precipitado foi então removido e desprezado e o sobrenadante (em torno de 1mg/ml de proteína) utilizada para mensuração da lipoperoxidação pelo método da CL.

A suspensão obtida como descrito acima foi colocada em vials de cintilação. Buffer de fosfato (KCl 140mmol, fosfato inorgânico 20 mmol, e pH 7.4) e hidroperóxido de tert-butyl 3 mmol foram adicionados. A emissão luminosa (CL) foi medida com um espectrofotômetro de cintilação líquida (LKB-Rack Beta-Liquid scintillation Spectrometer- 1215, LKB Produkter, AB, Bromma, Sweden). A concentração de proteína foi determinada através do método descrito por Lowry e cols (13) utilizando albumina humana como substância padrão.

Análise estatística

O método de análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni foram usados para analisar os valores da CL e das concentrações séricas da creatinina. Considerou-se para fins de significância estatística um $p < 0,05$.

RESULTADOS

As concentrações séricas das creatininas em diferentes tempos de reperfusão estão mostrados na Figura 1. A isquemia e reperfusão renal elevou significativamente as concentrações séricas da creatinina após 24 e 96 horas do procedimento ($p < 0,05$), e os valores da creatinina sérica retornaram aos seus níveis basais após 192 horas após a reperfusão.

O pré-tratamento com L-NAME não piorou significativamente a disfunção renal após 24 e 96 horas da isquemia-reperfusão, mas após 192 horas do procedimento, as concentrações séricas da creatinina permaneciam significativamente maiores do que aquelas medidas nos grupos não-tratados ($p < 0,05$).

O pré-tratamento com L-arginina significativamente protegeu a função renal avaliada através das medidas da creatinina sérica, efetuadas 24 e 96 horas após a operação no grupo L-arg+I-R comparado com os grupos I-R e L-NAME ($p < 0,05$). Este efeito protetor da L-arginina não persistiu após 192 horas da reperfusão, em função da concentração da creatinina sérica era significativamente maior do que no grupo não tratado ($p < 0,05$).

Os dados do estudo da quimiluminescência (CL) estão mostrados na Tabela 1. A CL no grupo de animais submetido a isquemia não mostrou valores significativamente distintos daqueles obtidos no grupo controle (6360 ± 715 versus 3763 ± 633 cps/mg de proteína) ($p > 0,05$). A medida da CL foi significativamente maior no grupo submetido a isquemia-reperfusão renal do que no grupo controle ($p < 0,05$).

O pré-tratamento com L-NAME elevou significativamente o estresse oxidativo ao nível das membranas celulares renais após a isquemia e reperfusão ($p < 0,05$). Entretanto, o mesmo foi significativamente reduzido pela administração concomitante da L-arginina ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Sumarizando, o fenômeno isquêmico-reperfusional renal apresentou efeitos deletérios sobre a função renal e aumentou o estresse oxidativo em células renais de ratos. A disfunção renal foi afetada, porém não de forma significativa, e a QL foi significativamente elevada pela inibição do NO ($p < 0,05$). O pré-tratamento com L-arginina reduziu a intensidade da disfunção renal e o grau do estresse oxidativo em ratos submetidos a isquemia-reperfusão renal. O pré-tratamento com L-NAME ou L-arginina resultou em uma demora na recuperação da integridade renal após a isquemia transitória, com concentrações mais elevadas da creatinina sérica do quando comparados ao grupo de animais submetidos ao mesmo procedimento porém sem pré-tratamento após 192 horas de reperfusão.

Durante a isquemia-reperfusão tecidual, EAO tais como o radical superóxido, hidroxil e o peróxido de hidrogênio podem induzir injúria celular através de reações de lipoperoxidação em membranas celulares, e isto altera a estrutura e função da membrana celular (18,19). No rim, estas alterações podem aumentar a permeabilidade tubular com a perda da capacidade funcional excretora da membrana celular, assim como, da redução da fosforilação oxidativa mitocondrial e liberação de enzimas lisossomiais; estes aspectos podem acelerar os processos de degradação celular com um conseqüente efeito deletério sobre a função renal (1,18).

A integridade da função renal depende do balanço de fatores vasodilatadores e vasoconstritores. Durante a isquemia renal o endotélio danificado pode iniciar uma cadeia de eventos que levam a liberação de substâncias com efeitos vasoconstritores tais como as endotelinas, e deficiência de fatores vasodilatadores tais como o NO (3). Vários autores acreditam que o tecido renal é muito mais sensível ao decréscimo das reservas de NO do que outros, haja visto que o pré-tratamento com L-NAME reduziu, significativamente, a natriurese, diurese e filtração glomerular sem, contudo, alterar a pressão arterial (11,20).

Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no dano tecidual decorrente da interação do NO e EAO podem ser observados na Figura 2. Durante a fase reperfusional, o radical superóxido (formado) pode reagir com o NO para gerar o peroxinitrito. Este radical livre pode causar lipoperoxidação das membranas celulares (20). Em nossos experimentos, nos observamos que a inibição do NO exacerbou o dano induzido pelas EAO durante o processo de isquemia e reperfusão renal em ratos. Estes resultados são corroborados por outros autores, que demonstram que os precursores do NO, particularmente, L-arginina, pode exercer efeitos protetores sobre o tecido renal em situações de isquemia e reperfusão renal (4,16). Estes fatos indicam que a interação entre NO e EAO pode ser benéfica, porque o peroxinitrito possivelmente age como detoxificador de radicais superóxidos, interrompendo a cadeia de eventos que perpetuam a lipoperoxidação e que originam as outras espécies radicais (hidroxil) e o peróxido de hidrogênio (8,19). Se a relação superóxido/NO aumenta pela superprodução de superóxido ou diminuição da

síntese de NO, o superóxido produzirá o peróxido de hidrogênio e radical hidroxil promovendo a ativação da fosfolipase A2 e, portanto, a síntese de mediadores lipídicos pró-inflamatórios tais como os fatores de ativação plaquetária, leucotrienos B4, que aumentam a adesão leucocitária e novamente mais EAO, elevando a injúria oxidativa causada pela isquemia e reperfusão tecidual (8).

A produção basal de NO é necessária para manutenção de uma adequada função glomerular, haja visto que a inibição da síntese do NO aumenta a resistência arteriolar glomerular eferente e a pressão capilar glomerular bem como induz a uma série de alterações ao nível da histologia renal (21). Chintala e cols., mostraram que a inibição do NO pode exacerbar a disfunção renal, enquanto os precursores do NO podem melhorá-la (5). Nossos achados estão de acordo com aqueles encontrados por Salazar e cols., que observaram que o dano da função renal causado pela depleção do NO foi transitória (20). Após um período de disfunção, a função renal pode retornar para valores normais dentro de poucos dias, como resultado da atividade do NO e sua curta meia-vida (9,14).

Bhardwaj e cols., mostraram que a L-arginina pode diminuir a resistência vascular renal e significativamente melhorar a função renal após um período de isquemia transitória (2). Este efeito protetor da L-arginina pode resultar do efeito inibidor do NO sobre o acúmulo leucocitário e suas propriedades vasodilatadoras durante a fase isquêmica (9).

Nós concluímos que o NO apresenta efeitos significativos no fenômeno isquêmico-reperfusional renal em ratos, pela observação de que a sua inibição pode aumentar o grau de disfunção renal bem como exacerbar a atividade oxidativa induzida pelas EAO nesta situação. A L-arginina pode também proteger a função renal e reduzir a injúria induzida pelas EAO em rins pós-isquêmicos. Contudo, é essencial confirmar a real eficácia das substâncias doadoras de NO pela análise de outras variáveis tais como, diurese, natriurese, atividade da mieloperoxidase, alterações histológicas, concentrações plasmática de nitritos e nitratos, depuração da creatinina endógena, e atividade da NOS em diferentes doses de L-NAME e L-arginina, bem como a utilização de métodos que consigam medir diretamente a atividade das EAO. Atualmente, a importância clínica e terapêutica dos moduladores da atividade do NO em situações de isquemia renal não são conhecidos; contudo, estes gentes mostram-se promissores pela sua atividade na manutenção da função renal após isquemia e reperfusão deste órgão. Os moduladores da síntese do NO podem, portanto, serem usados para reduzir o dano induzido pela isquemia-reperfusional renal em humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baker GL, Corry RJ, Autor AP. Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion: protective effect of superoxide dismutase. *Ann Surg* 1985; 202: 628-41.
2. Bhardwaj R, Moore PK. The effect of arginine and nitric oxide on resistance blood vessels of the perfused rat kidney. *Br J Pharmacol* 1989; 97: 739.
3. Bonventre JV. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 1993; 43: 1160-78.
4. Burra P, Ferrareso M, Cadrobbi R et al., Effect of L-arginine and oligotide on liver ischaemia-reperfusion injury. *Transplant Proc.*, 1997; 29: 2992-3.
5. Chintala MS, Chiu PJS, Vemulapalli S et al. Inhibition of endothelium derived relaxing factor (EDRF) aggravates ischemic acute renal failure in anesthetized rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1993; 348: 305-310.
6. Defraigne JO, Detry O, Pincemail J et al., Direct evidence of free radical production after ischaemia and reperfusion and protective effect of desferrioxamine: ESR and vitamin E studies. *Eur J Vasc Surg.*, 1994; 8:537-543.
7. Gonzales-Flecha B, Llesuy S, Boveris A . Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: na assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Rad Biol Med.*, 1991; 10:93-100.
8. Grisham MB. Interaction between nitric oxide and superoxide: role in modulating leukocyte adhesion in the posischemic microvasculature. *Transplant Proc.*, 1995; 27:2842-2843.

9. Gross SS, Wolin MS. Nitric oxide: pathophysiologic mechanisms. *Ann Rev Physiol* 1995; 57: 737-69.
10. Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T *et al.* Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Surg Res* 1995; 59: 772-779.
11. Lahera V, Salom MG, Miranda-Guardiola F, Moncada S, Romero C. Effects of Ng-nitro-L-arginine methyl ester on renal function and blood pressure. *Am J Physiol.*, 1991; 261: F1033-F1037.
12. Llesuy SF, Milei J, Molina H *et al.* Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori* 1985; 71: 241-9.
13. Lowry OH, Rosebrough MJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the foline reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265.
14. Lucas ML, Rhoden CR. Therapeutic potential of the inhibitors of nitric oxide synthase. *Rev Bras Cin Terap* 1999; 25: 29-37.
15. Moncada S, Higgs A. The L-arginine/nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-12.
16. Nilsson B, Yoshida T, Delbro D, Andrius S, Friman S. Pretreatment with L-arginine reduces ischemia-reperfusion injury of the liver. *Transplant Proc*, 1997; 29: 3111-3112.
17. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analyt Biochem* 1979; 95: 351-8.

18.Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radical in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest* 1984; 74: 1156-64.

19.Rhoden EL, Rhoden CR, Mauri M *et al.* Experimental model of renal ischemia-reperfusion in rats: study of the stress oxidative induced by oxygen-derived free radicals. *Braz J Urol* 1999; 25: 431-6.

20.Salazar FJ, Pinilla JM, López F *et al.* Renal effects of prolonged synthesis inhibition of endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension* 1992; 20: 113-117.

21.Waz WR, Van Liew JB, Feld LG. Nitric oxide metabolism following unilateral renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Pediatr Nephrol* 1998; 12: 26-29.

22.Weinberg JM. The cell biology of ischemic renal injury. *Kidney Int* 1991; 39: 476-500.

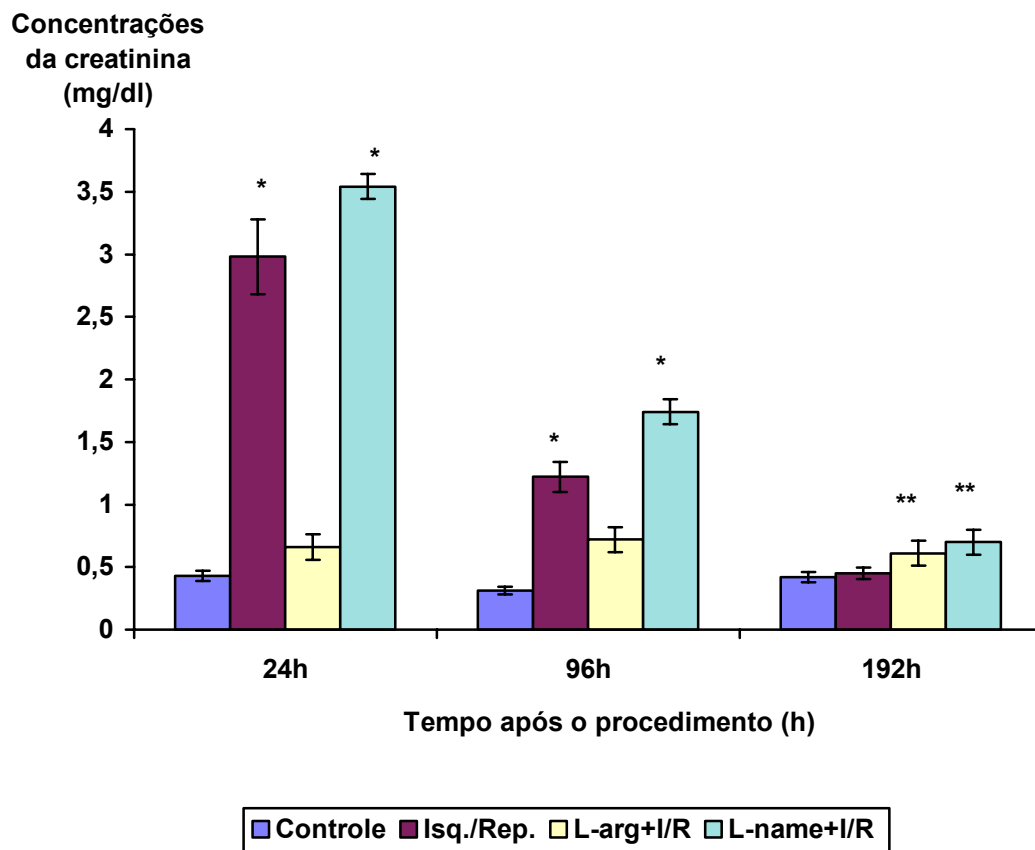


Figure 1. Concentrações séricas médias da creatinina nos 4 grupos de ratos estudados.

LEGENDA DA FIGURA 1

*= $p < 0.05$ quando comparados com os grupos *controle* e *L-arg+I/R* and
**= $p < 0.05$ quando comparados com os grupos *controle* e *I/R* nos respectivos intervalos de tempo. *Controle* (n=10): *sham-operation*; *I/R* (n=10): isquemia-reperfusão renal esquerda; *L-arg+I/R* (n=9): pré-tratamento com L-arginina e submetidos a *I/R* renal; *L-NAME+I/R* (n=10): pretrados com L-NAME e submetidos a *I/R* renal. Cada valor representa a média \pm desvio padrão. ANOVA seguido pelo teste t de Bonferroni's ($p < 0.05$).

Tabela 1. Valores médios (DP) da quimiluminescência (cps/mg protein) de tecidos renais de ratos pré-tratados com L-arginina ou L-NAME, ou ambos, antes da ia isquemia e reperfusão renais.

GRUPOS	CL (cps/mg proteína)
Controle (n=9)	3763±633
I (n=9)	6360±715
I/R (n=10)	13660±1104*
L-NAME + I/R (n=10)	17482±4397* *
L-arg + I/R (n=10)	5574±909
L-NAME+L-arg+I/R (n=10)	5510±767

LEGEND OF TABLE 1

* $p < 0.05$ quando comparados com os outros grupos. ** $p < 0.05$ quando comparados com os outros grupos. *Controle*: ratos submetidos a *sham-operation*; *I*: ratos submetidos a isquemia renal esquerda por 50 minutos; *I/R*: ratos submetidos a isquemia-reperfusão renal esquerda; *L-NAME+I/R*: ratos pré-tratados com L-NAME e submetidos a I/R renal; *L-arg+I/R*: ratos pré-tratados com L-arginina e submetidos a renal I/R; *L-NAME + L-arg + I/R*: ratos pré-tratados com as duas drogas e submetidos a I/R. Cada valor representa a média \pm desvio padrão. Método da ANOVA, seguido pelo teste t de Bonferroni ($p < 0.05$).

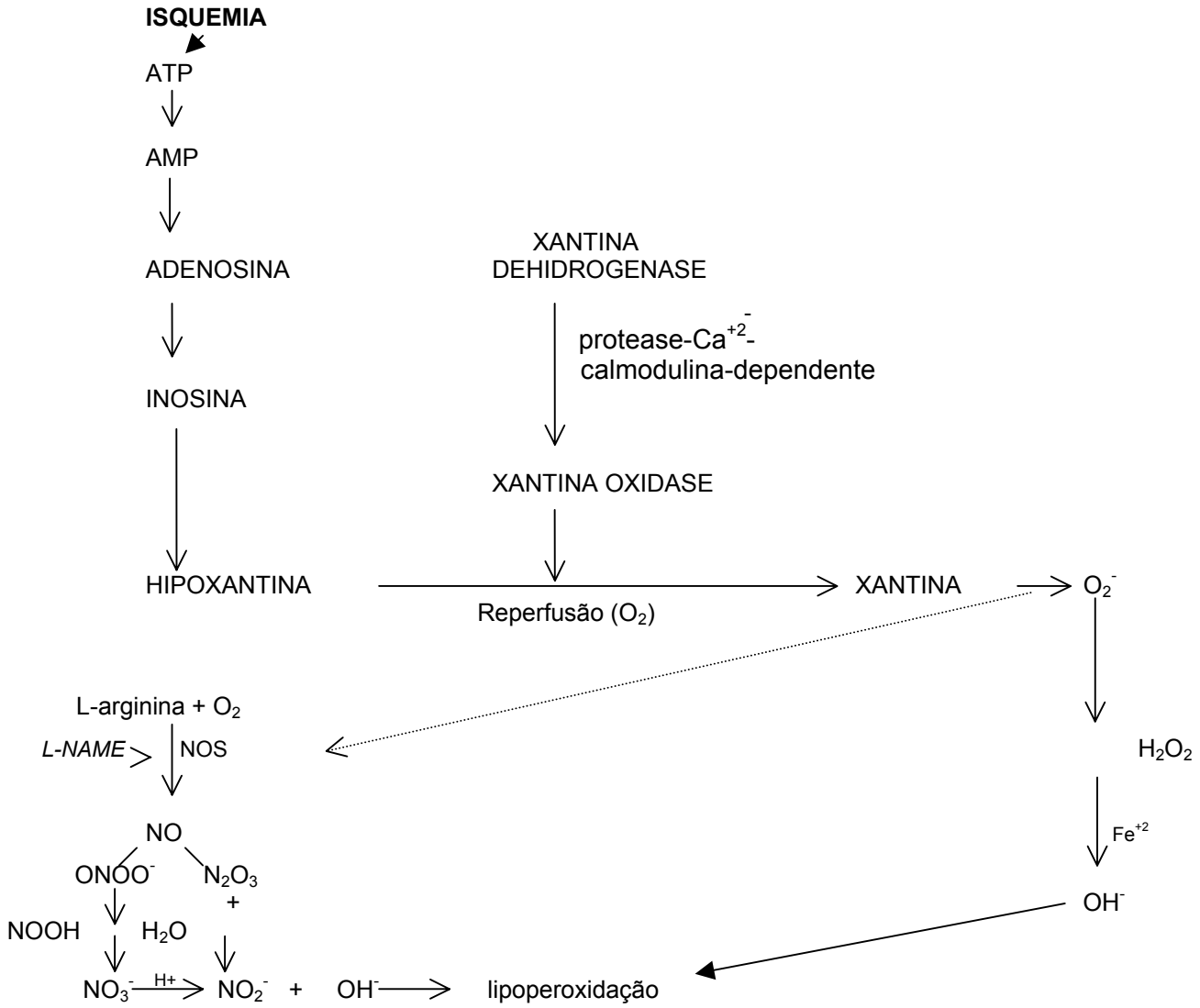


FIGURA 2

LEGENDA DA FIGURA 2

Figure 2. Algoritmo mostrando o envolvimento do óxido nítrico no dano isquêmico-reperfusional renal.

**Trabalho número 2 enviado para a Revista Brazilian Journal of
Medical and Biological Research**

**Pretreatment with L-NAME increases the oxidative stress
after renal ischaemia-reperfusion in rats.**

E. L. Rhoden¹; L. Pereira-Lima¹; M. L. Lucas²; C. R. Rhoden²; and A. Belló-Klein³.

From the Course of Post-Graduation in Medical Clinic of the Clinical Hospital of Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul and Departments of Surgery¹ and Pharmacology² of the Porto Alegre School of Medical Science/Santa Casa University Hospital, and Laboratory of Cardiovascular Physiology of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Running title: L-NAME in renal ischaemia-reperfusion.

Requests for reprints to Dr. Ernani Luis Rhoden, Rua Jaraguá, 370/302, 90450-140, Porto Alegre, RS, Brazil. Fax: 00 55 051 224 8615 and 00 55 051 226 7913.
E-mail address: ernanirh@terra.com.br

ABSTRACT

Our objective to evaluate the consequence of pretreatment with L-NAME (N^G-nitro-L-arginine methylester – an inhibitor of nitric oxide formation) on kidney-levels of lipid peroxidation during renal ischaemia-reperfusion in rats. We used Wistar rats divided into four groups: (I) – sham-operated group; (II) – rats submitted to renal ischaemia for 50 minutes; (III) – rats submitted to renal ischaemia followed by 50 minutes of reperfusion; and (IV) - rats given L-NAME (20 mg/kg; intraperitoneally) 20 minutes before the renal ischaemia-reperfusion. We measured renal cell lipid peroxidation through the malondialdehyde (MDA) and chemiluminescence (CL) levels in these rats. For analyzing the renal function, we measured serum creatinine levels at 24, 96 and 192 hours after following procedures in the groups: (V): sham-operated group; (VI): rats subjected to renal ischaemia for 50 minutes; and (VII): rats given L-NAME (20 mg/kg; intraperitoneally) 20 minutes before renal ischaemia-reperfusion. Pretreatment with L-NAME significantly increased the MDA (1.16 ± 0.11 vs. 0.79 ± 0.06 nmol/mg of protein) and CL (17482 ± 4397 vs. 13660 ± 1104) values after renal ischaemia-reperfusion ($P < 0.05$). Moreover, L-NAME did not alter serum creatinine values at 24 and 96 hours after renal ischaemia-reperfusion, but significantly worsened serum creatinine levels at 192 hours. Nitric oxide (NO) seems to exert an important role during renal ischaemia-reperfusion in rats because its inhibition was capable to aggravate oxidative stress after the procedure. However, L-NAME altered the values of serum

creatinine just at 192h. These data demonstrated that NO have a strong tendency to exert a beneficial effect during renal ischaemia-reperfusion in rats.

Key words: renal ischaemia; nitric oxide; L-NAME; oxidative stress.

INTRODUCTION

Ischaemia-reperfusion injury is an important cause of renal dysfunction in renal transplantation, surgical revascularization of the renal artery, partial nephrectomy, and treatment of suprarenal aortic aneurysms (1, 2). The mechanisms proposed to explain the ischaemia-reperfusion injury induced include anoxia; release of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide radical ($\cdot\text{O}_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) during reperfusion; neutrophil accumulation; and subsequent release of additional ROS and lytic enzymes (1, 3). However, several studies have demonstrated that ROS have an important role in the ischaemia-reperfusion injury through the lipid peroxidation of cellular membranes (3, 4, 5).

Nitric oxide (NO), derived from L-arginine by the enzymatic action of nitric oxide synthase (NOS) is an endogenous vasodilator of great physiological and pathophysiological importance in the human organism (6, 7). Two isoforms of NOS are expressed in the kidney: cNOS (constitutive) predominantly located at the preglomerular vasculature, macula densa and collecting duct, and iNOS (inducible) with a more general distribution with exception of the vessels and macula densa (8). NO has been reported to function in both protective and injury-producing process in tissue ischaemia-reperfusion (9). In the ischaemia, NO seems to preserve the blood flow by its vasodilatory action; nevertheless, during tissue reperfusion, it can react with $\cdot\text{O}_2^-$ to form the free radical peroxynitrite ($\cdot\text{ONOO}^-$), an important damaging agent in lipid peroxidation of renal cell membranes (10, 11).

This study aimed to investigate whether pretreatment with L-NAME (N^G-nitro-L-arginine methylester - an inhibitor of NOS) could influence the injury induced by ROS during renal ischaemia-reperfusion in rats. We intended to evaluate the effect of L-NAME on oxidative stress and serum creatinine values in rats subjected to renal ischaemia-reperfusion.

MATERIAL AND METHODS

Adult, male Wistar rats (body weight 250-330g), reared at the Laboratory of Pharmacology of the Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre were used in the experiments. All the animals were kept in the same room with constant temperature ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) and illuminated from 7:00 to 19:00, with food pellets (Nutripal, Porto Alegre, Brazil) and potable water *ad libitum* before the procedures. The animals were housed in plastic cages (47x18x4cm, four animals per cage), and deprived of food 12 hours before the surgery. All the experiments were performed according to protocols approved by the local Committee for Animal Use and Care. The rats were anaesthetized with solution (1:1) of ketamine (25mg/kg IP) and xylazine (10mg/kg IP) (König, Avellaneda, Argentina). Additional doses were administered as required. The left kidney was exposed by a flank incision. The left renal pedicle was dissected and arranged for the consequent occlusion (except the ureter) with a non-traumatic vascular clamp. For the lipid peroxidation study, animals were subdivided into four groups: (I) – sham-operated group (n=9); (II) – rats submitted to renal ischaemia for 50 minutes (n=9); (III) – rats submitted to renal ischaemia followed by 50 minutes of reperfusion (n=5); and (IV) - rats given L-NAME (20 mg/kg; intraperitoneally) 20 minutes before the renal ischaemia-reperfusion (n=8).

In all groups, left kidneys were promptly removed and prepared to analyze for renal cell lipid peroxidation. Index of lipid peroxidation was evaluated through the thiobarbituric acid reactives substances method (TBARS), which measures the malondialdehyde levels (MDA), expressing values in nmol of MDA/mg of protein (11) and hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL)

technique which measures the emitted luminous energy by excited carboniles and singlet oxygen during lipid peroxidation, being its values expressed in counts per second/mg of protein (12).

Other three groups were used to evaluated renal function through the levels of serum creatinine: (V): sham-operated group (n=10); (VI): rats subjected to renal ischaemia for 50 minutes (n=10); and (VII): rats given L-NAME (20 mg/kg; intraperitoneally) 20 minutes before the renal ischaemia-reperfusion (n=10). Serum creatinine values (mg/dl) were measured at 24, 96, and 192 hours after the procedures.

L-NAME was purchased from Sigma Chemical Co, Brazil, and ketamine and xylazine cloridrate from König Laboratories, Argentina.

Statistical analysis were performed by analyses of variance (ANOVA) method followed by Bonferroni's "t" test. A *P* value less than 0.05 was considered significant. All data are presented as mean \pm standard deviation (SD).

RESULTS

Kidney-levels of MDA demonstrated significant differences between all the groups ($P<0.05$) (Table 1). Pretreatment with L-NAME increased significantly the MDA concentration after the renal ischaemia-reperfusion (1.16 ± 0.11 vs. 0.79 ± 0.06 nmol/mg of protein; $P<0.05$). Values of lipid peroxidation evaluated through the CL method were different significantly between the groups ($P<0.05$) (see also Table 1). Pretreatment with L-NAME also increased the kidney-levels of chemiluminescence in renal ischaemia-reperfusion (17482 ± 4397 vs. 13660 ± 1104 cps/mg of protein; $P<0.05$).

Values of serum creatinine are presented in Table 2. In ischemic group, the levels of serum creatinine significantly increased when compared to the non-ischemic group at 24 and 96 hours after the procedure ($P<0.05$). Pretreatment with L-NAME increased not significantly the serum creatinine values when compared to the no-treated group at 24 and 96 hours of reperfusion ($P>0.05$). Moreover, at 192 hours after the procedure, group pretreated with L-NAME demonstrated the higher levels of serum creatinine ($P<0.05$).

DISCUSSION

Synthesizing our results, renal ischemia-reperfusion syndrome caused an impairment of renal function and increase of renal cell oxidative stress in rats. Renal dysfunction did not exacerbate with L-NAME at 24 and 96 hours. We observed that pretreatment with L-NAME caused a delay of renal integrity recuperation after renal ischemia-reperfusion being the serum creatinine values more elevated than the other groups at 192 hours.

Renal function integrity depends on the balance between vasodilators and vasoconstrictors factors. During renal ischemia, endothelium damage can unchain a vicious cycle of ischemic injury with release of vasoconstrictors substances (p. ex. endothelins) and impairment of vasodilators factors (p. ex. NO) (1). Furthermore, several authors suppose that kidney tissue is very sensible to the decrease of NO storage when compared to other tissues because pretreatment with L-NAME significantly reduces natriuresis, diuresis, and glomerular filtration without altering blood pressure (13, 14).

In this study, both TBARS and CL techniques demonstrated the importance of the lipid peroxidation of renal cell membranes during unilateral renal ischaemia-reperfusion in rats. Furthermore, our data showed that pretreatment with L-NAME markedly increased the oxidative stress after renal ischaemia-reperfusion in rats.

In accordance to current literature, during renal ischaemia-reperfusion, ROS ($\cdot\text{O}_2^-$; H_2O_2 ; and $\cdot\text{OH}^-$) can produce cellular injury through the lipid peroxidation of mitochondrial, lysosomal, and plasma membranes, which can alter both membrane structure and function (3). The superoxide radical ($\cdot\text{O}_2^-$) can react with NO to form peroxynitrite radical ($\cdot\text{ONOO}^-$), an important free radical important which causes lipid peroxidation of cellular membranes during tissue ischaemia-reperfusion (10).

Basal production of NO is necessary for normal glomerular function, and inhibition of NO synthesis leads to increase the efferent arteriolar resistance and the glomerular capillary pressure, and can cause histological changes (15). Then, like some authors, the inhibition of NO synthesis exacerbates the renal dysfunction, and treatment with NO precursor or NO donor can ameliorate renal function (16). In accordance to our study, Salazar et al. (1992) have examined that renal function damage caused by NO depletion is transitory: after a period of renal dysfunction, the kidney is capable to return to its normal function in not many days (13).

Bhardwaj *et al.* (17) demonstrated that L-arginine (a NO donor) decreases the renal vascular resistance and improves recovery of renal function after ischaemic damage. These observations induce us to think about the protector effect of NO during renal ischaemia-reperfusion. The observed protective role of NO in the tissue ischaemia-reperfusion appears to originate from its inhibitory actions on leukocyte accumulation and its vasodilatory action during ischaemic phase, whereas the role of NO-derived metabolites in injury has generally been suggested to result from the formation of reactive NO species such as $\cdot\text{ONOO}^-$ (9).

On the other hand, some authors have demonstrated that NO inhibition can attenuate the oxidative stress in the renal ischaemia-reperfusion. Lopez-Neblina et. al. (1994) demonstrated that a NO donor (Na-Nitroprusside) had the most beneficial effect on survival rate, histological structure and renal function after renal ischaemia-reperfusion in rats. This effect was independent of the index of lipid peroxidation because rats treated with Na-nitroprusside had the higher levels of lipid peroxidation. In another study, Weight et. al. (1999) observed that the different isoforms of nitric oxide synthase (NOS) have opposing functions after renal ischaemia-reperfusion in rats with cNOS (constitutive enzyme) being cytoprotective and iNOS (inducible enzyme) injurious. We used in our study L-

NAME, a predominantly inhibitor of cNOS, the cytoprotective enzyme. Lopez-Neblina et. al. (1994) used L-NMMA, a non-selective inhibitor of cNOS. Maybe because of this fact we obtained results so different from those obtained by Lopez-Neblina et. al. (1994). Moreover, Weight et. al. (1999) demonstrated that NO has a biphasic role during renal ischemia-reperfusion. Early in reperfusion, NO and superoxide quench to form peroxynitrite ($\cdot\text{ONOO}^-$) which has a very short half-life and is a precursor of the highly injurious hydroxyl free radical, thus accounting for early NO cytotoxicity. The late cytoprotection may stem from the interaction of NO with leukocytes. The secondary damage caused by the sequestration of activated neutrophils and maintaining renal blood flow, NO may therefore be cytoprotective in the longer term. Lopez-Neblina et. al. (1994) measured lipid peroxidation in early phase after renal ischemia-reperfusion. Thus, in accord of Weight et. al. (1999), the values of lipid peroxidation should be higher in animals pretreated with a NO donor, because of higher levels of NO increasing the oxidative stress via peroxynitrite formation. Contrary to these authors, we obtained the higher levels of lipid peroxidation with pretreatment with L-NAME, but we did not use any NO donor or precursor to know whether these values of lipid peroxidation could be higher or lower of those obtained by pretreatment with L-NAME. Moreover, caution must be exercised when interpreting such results because these analogues of L-arginine such as L-NAME can interfere with iron-centered enzymes and stimulate NO formation in endothelial cells aggravating the lipid peroxidation via peroxynitrite (8).

In the other hand, Lopez-Neblina et. al. (1994) assessed renal function in a intermediate and late phases after renal ischaemia-reperfusion. As according to

Weight et. al. (1999), the best results obtained (better renal function) should be presented in rats treated with a NO donor.

In this study, we can conclude that NO inhibition increased oxidative stress and serum creatinine values at 192 hours after renal ischaemia-reperfusion in rats, and its correlation with additional ROS generation such as $\cdot\text{ONOO}^-$ seems to be an important event in the mediation of lipid peroxidation of the cellular membranes during ischaemia-reperfusion. Nevertheless, more work involving humans is needed to elucidate the real value of the inhibitors and precursors of NO during tissue ischaemia-reperfusion.

REFERENCES

1. Bonventre JV (1993). Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney International*, 43: 1160-1178.
2. Defraigne JO, Detry O, Pincemail J, Franssen C, Meurisse M, Lamy M & Limet R (1994). Direct evidence of free radical production after ischaemia and reperfusion and protective effect of desferrioxamine: ESR and vitamin E studies. *European Journal of Vascular Surgery*, 8: 537-543.
3. Paller MS, Hoidal JR & Ferris TF (1984). Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *Journal of Clinical Investigation*, 74: 1156-1164.
4. Bird JE, Milhoan K, Wilson CB, Young SG, Mundy CA, Parthasarathy S & Blantz RC (1988). Ischemic acute renal failure and antioxidant therapy in the rat: the relation between glomerular and tubular dysfunction. *Journal of Clinical Investigation*, 81: 1630-1638.
5. Rhoden EL, Petteffi L, Mauri M, Belló-Klein A, Kalil A, Pereira-Lima L & Rhoden CR (1996). Role of oxygen free radicals in hepatic damage caused by hepatic ischemia-reperfusion in rats. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 24: 89-93.
6. Moncada S, Palmer RMJ & Higgs A (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacology Review*, 43: 109-143.
7. Lucas ML & Rhoden CR (1999). Therapeutic potential of inhibitors of the enzyme nitric oxide synthase. *Revista Brasileira de Clínica & Terapêutica*, 25: 28-36.

8. Weight SC, Furness PN & Nicholson ML (1999). Biphasic role of nitric oxide in experimental renal warm ischaemia-reperfusion injury. *British Journal of Surgery*, 86: 1039-1046.
9. Gross SS & Wolin MS (1995). Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annual Review Physiology*, 57: 737-769.
10. Grisham MB (1995). Interaction between nitric oxide and superoxide: role in modulating leukocyte adhesion in the postischemic microvasculature. *Transplantation Proceedings*, 27: 2842-2843.
11. Buege Já & Aust D (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Method of Enzimology*, 52: 302-309.
12. Gonzalez-Flecha B, Llesuy S & Boveris A (1991). Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Rad Biol Med*, 10: 93-100.
13. Salazar FJ, Pinilla JM, López F, Romero JC & Quesada T (1992). Renal effects of prolonged synthesis inhibition of endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension*, 20: 113-117.
14. Lahera V, Salom MG, Miranda-Guardiola F, Moncada S & Romero C (1991). Effects of N^G-nitro-L-arginine methyl ester on renal function and blood pressure. *American Journal of Physiology*, 261: F1033-F1037.
15. Waz WR, Van Liew JB & Feld LG (1998). Nitric oxide metabolism following unilateral renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Pediatric Nephrology*, 12: 26-29.
16. Chintala MS, Chiu PJS & Vemulapalli S (1993). Inhibition of endothelium derived relaxing factor (EDRF) aggravates ischemic acute renal failure in

anesthetized rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 348: 305-310.

17. Bhardwaj R & Moore PK (1989). The effect of arginine and nitric oxide on resistance blood vessels of the perfused rat kidney. *British Journal of Pharmacology*, 97: 739-744.

Table 1. Effect of L-NAME on kidney-levels of malondialdehyde (MDA) and chemiluminescence (CL) in rats subjected to renal ischaemia-reperfusion.

GROUPS	MDA (nmol/mg of protein)	CL (cps/mg of protein)
C (n=9)	0.49 ± 0.05	3763 ± 633
I (n=9)	0.59 ± 0.06*	6360 ± 715*
I/R (n=5)	0.79 ± 0.06**	13660 ± 1104**
L-NAME + I/R (n=8)	1.16 ± 0.11***	17482 ± 4397***

LEGEND OF TABLE 1

* $P < 0.05$ vs. Group C; ** $P < 0.05$ vs. Groups C and I; *** $P < 0.05$ vs. Groups C, I, and I/R. C: control group (sham-operated); I: fifty minutes of renal ischaemia; I/R: renal ischaemia-reperfusion; and L-NAME + I/R: pretreatment with L-NAME (20mg/kg; IP) plus renal ischaemia-reperfusion. Values are expressed in mean \pm SD. Analysis of variance (ANOVA) method followed by Bonferroni's t test ($P < 0.05$).

Table 2. Effect of L-NAME on serum creatinine levels (mg/dl) in rats subjected to renal ischaemia-reperfusion.

GROUPS	24h	96h	192h
C (n=10)	0.43 ± 0.08	0.31 ± 0.10	0.42 ± 0.01
I/R (n=10)	2.98 ± 0.89*	1.22 ± 0.66*	0.45 ± 0.07
L-NAME + I/R (n=10)	3.54 ± 0.63*	1.74 ± 0.92*	0.70 ± 0.27 [#]

LEGEND OF TABLE 2

* $P < 0.05$ vs. Group C; # $P < 0.05$ vs. Groups C and I/R. C: control group (sham-operated); I/R: renal ischaemia-reperfusion; and L-NAME + I/R: pretreatment with L-NAME (20mg/kg; IP) plus renal ischaemia-reperfusion. Values are expressed in mean \pm SD. Analysis of variance (ANOVA) method followed by Bonferroni's t test ($P < 0.05$).

Versão em Portugues do Trabalho número 2

**Pré-tratamento com L-NAME aumenta o estresse oxidativo após
isquemia-reperfusão renal em ratos.**

E. L. Rhoden¹; L. Pereira-Lima¹; M. L. Lucas²; C. R. Rhoden²; and A. Belló-Klein³.

Curso de Pós-Graduação em Clínica-Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Departamento de Cirurgia e Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas de Porto Alegre/Hospital Universitário Santa Casa, e Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Título corrente: L-NAME na isquemia-reperfusão renal.

Pedidos de reimpressão com Dr. Ernani Luis Rhoden, Rua Jaraguá, 370/302,
90450-140, Porto Alegre, RS, Brasil. Fax: 051 224 8615 e 051 226 7913.

E-mail: ernanirh@terra.com.br

RESUMO

Nosso objetivo foi o de avaliar as conseqüências do pré-tratamento com L-NAME (N^G-nitro-L-arginina metiléster – um inibidor da formação do óxido nítrico) sobre os níveis da lipoperoxidação lipídica de tecidos renais durante isquemia-reperfusão deste órgão em ratos. Foram utilizados ratos Wistar divididos em quatro grupos: (I) – Grupo controle (*Sham-operation*); (II) – ratos submetidos à isquemia reanal por 50 minutos; (III) – ratos submetidos à isquemia renal seguida por 50 minutos de reperfusão; e (IV) – ratos pré-tratados com L-NAME (20mg/kg; intraperitoneal) 20 minutos antes da isquemia-reperfusão renal. Foi medida a peroxidação lipídica celular renal através dos níveis de malondialdeído (MDA) e de quimiluminescência (QL). Para analisar a função renal, medimos os níveis séricos de creatinina às 24, 96 e 192 horas após os seguintes procedimentos nos grupos: (V): Grupo Controle (*sham-operation*); (VI): ratos submetidos à isquemia renal por 50 minutos; e (VII): ratos pré-tratados com L-NAME (20mg/kg; intraperitoneal) 20 minutos antes da isquemia-reperfusão. Pré tratamento com L-NAME elevou significativamente o valores do MDA (1.16 ± 0.11 vs. 0.79 ± 0.06 nmol/mg de proteína) e da QL (17482 ± 4397 vs. 13660 ± 1104 13660 ± 1104) após a isquemia-reperfusão renal ($P < 0.05$). Entretanto, L-NAME não alterou os valores séricos de creatinina às 24 e às 48 horas após a isquemia-reperfusão renal, contudo piorou significativamente os valores séricos de creatinina às 192 horas. O óxido nítrico (ON) parece exercer um importante papel durante a isquemia-reperfusão renal em ratos pois sua inibição elevou o estresse oxidativo após procedimento. Contudo, L-

NAME alterou os valores da creatinina sérica apenas às 192h. Estes dados demonstram que ON exerce uma tendência em exercer efeitos benéficos durante a isquemia-reperfusão renal em ratos.

Palavras-chave: isquemia renal; óxido nítrico; L-NAME; estresse oxidativo.

INTRODUÇÃO

A lesão renal decorrente isquemia-reperfusão é uma causa importante de disfunção deste órgão em diversas situações como nos transplantes renais, revascularizações cirúrgicas da artéria renal, nefrectomias parciais, nefrolitotomias e tratamento de aneurismas aórticos suprarrenais (1,2). Os mecanismos propostos para explicar a indução da lesão durante o evento isquêmico-reperfusional são vários e incluem a anóxia; liberação de espécies ativas do oxigênio (EAO) como o radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) durante a reperfusão; acúmulo de neutrófilos; e subsequente liberação de EAO adicionais e enzimas líticas (1,3). Entretanto, vários estudos demonstraram que as EAO possuem um importante papel na lesão decorrente da isquemia-reperfusão de tecidos através da sua ação peroxidativa lipídica das membranas celulares dos mesmos (3,4,5).

O óxido nítrico (NO), derivado da L-arginina por ação enzimática da óxido nítrico sintase (NOS), é um vasodilatador endógeno de grande importância fisiológica e envolvido em uma série de mecanismos fisiopatológicos no organismo humano (6,7). Duas isoformas da NOS são expressas nos rins: NOS_c (constitutiva) localizada predominantemente na vasculatura pré-glomerular, mácula densa e ductos coletores, e a NOS_i (induzida) com uma distribuição mais geral com exceção das vasos venosos e mácula densa (8). Diversos estudos sugerem uma ação protetora do NO em tecidos submetidos à isquemia transitória (9). Na isquemia, NO parece preservar o fluxo sanguíneo pela sua ação

vasodilatadora; entretanto, durante a reperfusão tecidual, pode reagir com $\cdot\text{O}_2^-$ formando o radical livre peróxinitrito ($\cdot\text{ONOO}^-$), um agente extremamente intável e reativo com potencial oxidativo sobre as membranas celulares (10,11).

Este estudo tem como objetivo investigar se o pré-tratamento com L-NAME (N^{G} -nitro-L-arginina metiléster – um inibidor da ONS) influencia a lesão induzida por EAO durante a isquemia-reperfusão renal em ratos. Avaliamos os efeitos do L-NAME no estresse oxidativo e valores séricos da creatinina em ratos submetidos à isquemia-reperfusão renal.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados no presente experimento ratos Wistar, machos, adultos (peso corporal de 250 a 330g), criados no Laboratório da Farmacologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre. Todos os animais foram mantidos no mesmo local de confinamento com temperatura constante ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo claro das 7:00 às 19:00 horas, com ração alimentícia (Nutripal, Porto Alegre, Brasil) e água potável *ad libitum*. Os animais foram acomodados em gaiolas plásticas (47x18x4cm, quatro animais por caixa), e ficaram desprovidos de alimentação 12 horas antes da cirurgia. Todos os experimentos foram realizados segundo os protocolos aprovados Comitê Local para Uso e Cuidado com os Animais.

Os ratos foram anestesiados com solução (1:1) de hidrocloridato de quetamina(25mg/kg IP) e xilasina (10mg/kg IP) (König, Avellaneda, Argentina). Doses adicionais foram administradas quando necessárias. O rim esquerdo foi exposto por uma incisão no flanco. O pedículo renal esquerdo foi dissecado e preparado para conseqüente oclusão (exceção do ureter) com uma pinça vascular não-traumática. Para o estudo da peroxidação lipídica, os animais foram subdivididos em quatro grupos: (I) – Grupo controle (*sham*)(n=9) submetido a lombotomia e dissecação do pedículo renal; (II) – ratos submetidos à isquemia renal por 50 minutos (n=9); (III) – ratos submetidos à isquemia renal por 50 minutos seguida por 50 minutos de reperusão (n=5); e (IV) – ratos pré-tratados com L-

NAME (Sigma Chemical Co, Brasil) (20mg/kg; intraperitoneal) 20 minutos antes da isquemia-reperfusão renal (n=8).

Em todos os grupos, os rins esquerdos foram prontamente removidos e preparados para ser analisada a peroxidação lipídica celular renal. O índice de peroxidação lipídica foi avaliado através do Método de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), sendo os valores expressados valores em nmol de MDA/mg de proteína (11) e, pela técnica da quimioluminescência iniciada pelo hidroxidoperóxido de tert-butyl (QL), a qual mede a energia luminosa emitida pelas carbonilas excitadas e pelo oxigênio singlet durante a peroxidação lipídica, sendo esses valores expressos em contagens por segundo/mg de proteína(12).

Outros três grupos foram usados para avaliar a função renal através dos níveis séricos de creatinina: (V): Grupo controle (*sham-operation*) submetidos a lombotomia e dissecação do pedículo renal (n=10); (VI): ratos submetidos à isquemia renal por 50 minutos (n=10); e (VII): ratos pré-tratados com L-NAME (20mg/kg; intraperitoneal) 20 minutos antes da isquemia transitória renal (n=10). Os valores séricos da creatinina (mg/dL) foram mensurados às 24, 96 e às 192 horas após os procedimentos.

As análises estatísticas foram realizadas pelo método de análise de variância (ANOVA) seguidas teste “t” de Bonferroni. Um *P* menor que 0.05 foi considerado significativo. Todos os dados estão apresentados como média ± desvio padrão (DP).

RESULTADOS

As concentrações teciduais renais do MDA demonstraram diferenças significativas entre todos os grupos ($P<0.05$) (Tabela 1). O pré-tratamento com L-NAME aumentou significativamente a concentração de MDA após a isquemia-reperfusão renal (1.16 ± 0.11 vs. 0.79 ± 0.06 nmol/mg de proteína; $P<0.05$). Os valores da peroxidação lipídica avaliados através do método da QL foram, igualmente, significativos entre os grupos ($P<0.05$) (ver também Tabela 1). Pré-tratamento com L-NAME elevou os valores renais da quimioluminescência na isquemia-reperfusão (17482 ± 4397 vs. 13660 ± 1104 cps/mg de proteína; $P<0.05$).

Os valores séricos da creatinina são apresentados na Tabela 2. No grupo de ratos submetidos a isquemia, os níveis séricos de creatinina elevaram-se significativamente comparados ao grupo não submetido a esta intervenção às 24 e às 96 horas após a reperfusion ($P<0.05$). Além disso, às 192 horas após o procedimento, o grupo pré-tratado com L-NAME demonstrou os níveis mais elevados de creatinina sérica ($P<0.05$).

DISCUSSÃO

Sintetizando os nossos resultados, pudemos observar que o fenômeno da isquemia-reperfusão renal causa uma diminuição da função renal e aumento do estresse oxidativo tecidual renal em ratos. A disfunção renal não foi exacerbada com o L-NAME às 24 e às 96 horas. Observamos que o pré-tratamento com L-NAME causou um atraso na recuperação da função renal normal após a isquemia transitória deste órgão, sendo os valores séricos de creatinina mais elevados que os outros grupos às 192 horas.

A integridade funcional renal depende do balanço entre fatores vasodilatadores e vasoconstritores. Durante a isquemia renal, o dano endotelial pode desencadear um ciclo vicioso de lesão isquêmica, com liberação de substâncias vasoconstritoras (p. ex. endotelinas) e diminuição dos fatores vasodilatadores (p. ex. ON) (1). Não obstante, vários autores supõem que o tecido renal é muito sensível ao descenso das reservas de NO quando comparado com outros tecidos, pois o pré-tratamento com L-NAME reduz significativamente a natriurese, diurese e filtração glomerular sem alterar a pressão sangüínea (13,14).

Neste estudo, tanto o TBARS como as técnicas de QL demonstraram a importância da peroxidação lipídica nas membranas celulares renais durante a isquemia-reperfusão renal unilateral em ratos. Além disso, nossos dados mostraram que o pré-tratamento com L-NAME eleva marcadamente o estresse oxidativo tecidual renal após a isquemia-reperfusão renal em ratos.

De acordo com vários autores durante a isquemia-reperfusão renal, EAO ($\cdot O_2^-$; H_2O_2 ; e $\cdot OH$) podem produzir lesões a nível celular através da peroxidação lipídica das membranas mitocondriais, lisosomais, e plasmáticas, as quais podem alterar tanto a estrutura como a função da membrana (3). O radical superóxido

($\cdot\text{O}_2^-$) pode reagir com o NO formando o radical peróxinitrito ($\cdot\text{ONOO}^-$), um importante radical livre, causador de peroxidação lipídica de membranas celulares durante a isquemia-reperfusão tecidual(10).

Uma produção basal de NO é necessária para a função glomerular normal, e a inibição da síntese do NO leva ao aumento da resistência ao nível da arteríola eferente e à elevação da pressão glomerular capilar com significativas repercussões histológicas(15). Por essa razão, diversos autores sugerem que a inibição da síntese do NO exacerbaria a disfunção renal, e tratamentos com precursores ou doadores de NO poderiam exercer efeitos benéficos ao nível de função renal em determinadas condições clínicas (16). Em concordância com nosso estudo, Salazar *et al.* (1992) mostraram que o dano da função renal causado pela depleção de NO, é transitório : após um período de disfunção renal, o rim é capaz de recuperar a sua função normal em poucos dias (13).

Bhardwaj *et al.* (17) demonstraram que a L-arginina (um doador de NO) diminui a resistência vascular renal e melhora a recuperação da função renal após danos isquêmicos. Essas observações nos induzem a pensar sobre o efeito protetor do NO durante a isquemia-reperfusão renal. O papel protetor do NO observado no tecido submetido à isquemia-reperfusão parece originário da ação inibitória no acúmulo de leucócitos e sua ação vasodilatadora durante a fase isquêmica, a passo que o papel dos metabólitos derivados do NO tem sido sugerido como resultante da formação de espécies reativas de NO como o $\cdot\text{ONOO}^-$ (9).

Por outro lado, alguns autores demonstraram que a inibição do NN pode atenuar o estresse oxidativo na isquemia-reperfusão renal. Lopez-Neblina e cols.,

demonstrara que um doador de NO (nitroprussiato de sódio) apresentou o maior efeito benéfico na taxa de sobrevivência, estrutura histológica e função renal após isquemia-reperfusão renal em ratos. Esse efeito foi independente do índice de peroxidação lipídica, pois os ratos tratados com nitroprussiato de sódio tiveram os maiores níveis de peroxidação lipídica. Em outro estudo, Weight e cols., observaram que as diferentes isoformas da óxido nítrico sintase (NOS) possuíam funções opostas após isquemia-reperfusão renal em ratos, com a NOSc (enzima constitutiva) sendo citoprotetora e, a NOSi (enzima induzida) sendo deletéria. Usamos em nosso estudo L-NAME, um inibidor prodominante da NOSc, a enzima citoprotetora. Lopez-Neblina e cols., usou L-NMMA, um inibidor não seletivo da NOSc. Talvez devido a esse aspecto obtemos resultados tão diferentes daqueles obtidos por Lopez-Neblina e cols. Além disso, Weight e cols demonstraram que o NO tem um papel bifásico durante a isquemia-reperfusão renal. Logo no início da perfusão, NO e o superóxido ligam-se para formar peróxinitrito o qual possui uma curtíssima meia-vida e é precursor dos mais prejudiciais radicais livres hidroxila, contribuindo para a precoce citotoxicidade do NO. A citoproteção tardia pode ser originada da interação do NO com os leucócitos. O dano secundário causado pela seqüestração de neutrófilos ativados e manutenção do fluxo sangüíneo renal, o NO pode portanto ser citoprotetor a longo prazo. Lopez-Neblina e cols., mediram a peroxidação lipídica na fase precoce após a isquemia-reperfusão renal. Conseqüentemente, de acordo com Weight e cols., os valores da peroxidação lipídica deveriam ser maiores em animais tratados com doadores de NO, devido a níveis maiores de NO aumentarem o estresse oxidativo via formação de peróxido-nitrito. Contrariamente a esses autores, obtemos os maiores

níveis de peroxidação lipídica com o pré-tratamento com L-NAME, mas não usamos qualquer doador de NO ou precursor para sabermos se esses valores da peroxidação lipídica pudessem ser maiores ou menores daqueles obtidos com o pré-tratamento com L-NAME. Adicionalmente, cuidado deve ser usado na interpretação desses resultados pois análogos da L-arginina como L-NAME podem interferir nas enzimas centralizadoras de ferro e na estimulação da formação do NO nas células endoteliais, agravando a peroxidação lipídica via peróxinitrito (8).

Por outro lado, Lopez-Neblina e cols., avaliaram a função renal em fases intermediárias e tardias após a isquemia-reperfusão renal. De acordo com Weight e cols., os melhores resultados obtidos (melhor função renal) devem estar presentes em ratos tratados com doador de NO.

Neste estudo, concluímos que a inibição do NO eleva o estresse oxidativo e os valores séricos de creatinina 192 horas após a isquemia-reperfusão renal em ratos, e a sua correlação com as EAO adicionais como por exemplo $\cdot\text{ONOO}\cdot$, parecendo ser um importante evento na mediação da peroxidação lipídica das membranas celulares durante a isquemia-reperfusão. Entretanto, outros estudos envolvendo também seres humanos são necessários para elucidar o valor real dos inibidores e precursores do NO durante a isquemia-reperfusão renal.

REFERÊNCIAS

1. Bonventre JV (1993). Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney International*, 43: 1160-1178.
2. Defraigne JO, Detry O, Pincemail J, Franssen C, Meurisse M, Lamy M & Limet R (1994). Direct evidence of free radical production after ischaemia and reperfusion and protective effect of desferrioxamine: ESR and vitamin E studies. *European Journal of Vascular Surgery*, 8: 537-543.
3. Paller MS, Hoidal JR & Ferris TF (1984). Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *Journal of Clinical Investigation*, 74: 1156-1164.
4. Bird JE, Milhoan K, Wilson CB, Young SG, Mundy CA, Parthasarathy S & Blantz RC (1988). Ischemic acute renal failure and antioxidant therapy in the rat: the relation between glomerular and tubular dysfunction. *Journal of Clinical Investigation*, 81: 1630-1638.
5. Rhoden EL, Petteffi L, Mauri M, Belló-Klein A, Kalil A, Pereira-Lima L & Rhoden CR (1996). Role of oxygen free radicals in hepatic damage caused by hepatic ischemia-reperfusion in rats. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 24: 89-93.
6. Moncada S, Palmer RMJ & Higgs A (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacology Review*, 43: 109-143.
7. Lucas ML & Rhoden CR (1999). Therapeutic potential of inhibitors of the enzyme nitric oxide synthase. *Revista Brasileira de Clínica & Terapêutica*, 25: 28-36.
8. Weight SC, Furness PN & Nicholson ML (1999). Biphasic role of nitric oxide in experimental renal warm ischaemia-reperfusion injury. *British Journal of Surgery*,

- 86: 1039-1046.
9. Gross SS & Wolin MS (1995). Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annual Review Physiology*, 57: 737-769.
10. Grisham MB (1995). Interaction between nitric oxide and superoxide: role in modulating leukocyte adhesion in the postischemic microvasculature. *Transplantation Proceedings*, 27: 2842-2843.
11. Buege Já & Aust D (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Method of Enzimology*, 52: 302-309.
12. Gonzalez-Flecha B, Llesuy S & Boveris A (1991). Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Rad Biol Med*, 10: 93-100.
13. Salazar FJ, Pinilla JM, López F, Romero JC & Quesada T (1992). Renal effects of prolonged synthesis inhibition of endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension*, 20: 113-117.
14. Lahera V, Salom MG, Miranda-Guardiola F, Moncada S & Romero C (1991). Effects of N^G-nitro-L-arginine methyl ester on renal function and blood pressure. *American Journal of Physiology*, 261: F1033-F1037.
15. Waz WR, Van Liew JB & Feld LG (1998). Nitric oxide metabolism following unilateral renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Pediatric Nephrology*, 12: 26-29.
16. Chintala MS, Chiu PJS & Vemulapalli S (1993). Inhibition of endothelium derived relaxing factor (EDRF) aggravates ischemic acute renal failure in anesthetized rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 348: 305-310.

17. Bhardwaj R & Moore PK (1989). The effect of arginine and nitric oxide on resistance blood vessels of the perfused rat kidney. *British Journal of Pharmacology*, 97: 739-744.

Tabela 1. Efeitos do L-NAME nos valores teciduais renais de malondialdeído (MDA) e Quimiluminescência (QL) em ratos submetidos à isquemia-reperfusão.

GRUPOS	MDA(nmol/mg de proteína)	QL(cps/mg de proteína)
C (n=9)	0.49 ± 0.05	3763 ± 633
I (n=9)	0.59 ± 0.06*	6360 ± 715*
I/R (n=5)	0.79 ± 0.06**	13660 ± 1104**
L-NAME + I/R (n=8)	1.16 ± 0.11***	17482 ± 4397***

LEGENDA TABELA 1

* $P < 0.05$ vs. Grupo C; ** $P < 0.05$ vs. Grupos C e I; *** $P < 0.05$ vs. Grupos C, I, e I/R. C: grupo controle (*sham-operation*); I: cinquenta minutos de isquemia renal; I/R: isquemia-reperfusão renal; e L-NAME + I/R: pré-tratamento com L-NAME (20mg/kg; IP) mais isquemia-reperfusão renal. Valores são expressos em média \pm DP. Método de análise de variância(ANOVA) seguido por teste “t” de Bonferroni ($P < 0.05$)

Table 2. Efeitos do L-NAME nos valores séricos de creatinina (mg/dl) em ratos submetidos à isquemia-reperfusão.

GRUPOS	24h	96h	192h
C (n=10)	0.43 ± 0.08	0.31 ± 0.10	0.42 ± 0.01
I/R (n=10)	2.98 ± 0.89*	1.22 ± 0.66*	0.45 ± 0.07
L-NAME + I/R (n=10)	3.54 ± 0.63*	1.74 ± 0.92*	0.70 ± 0.27 [#]

LEGENDA TABELA 2

* $P < 0.05$ vs. Grupo C; # $P < 0.05$ vs. Grupos C e I/R. C: grupo controle (sham-operation); I/R: isquemia-reperfusão renal; e L-NAME + I/R: pré-tratamento com L-NAME (20mg/kg; IP) mais isquemia-reperfusão renal. Valores expressos com média \pm DP. Método de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste “t” Bonferroni ($P < 0.05$).

**Trabalho número 3 aceito para publicação na Revista British
Journal of Urology**

Effects of L-arginine on the kidney-levels of malondialdehyde in rats submitted to renal ischaemia-reperfusion.

E. L. Rhoden¹; L. Pereira-Lima¹; M. L. Lucas²; C. R. Rhoden²; and A. Belló-Klein³.

From the Course of Post-Graduation in Medical Clinic of the Clinical Hospital of Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul and Departments of Surgery¹ and Pharmacology² of the Porto Alegre School of Medical Science/Santa Casa University Hospital, and Laboratory of Cardiovascular Physiology of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author:

Ernani Luís Rhoden, Rua Jaraguá, 370/302, Bairro Bela Vista, Porto Alegre - RS
- Brazil - CEP 90450-140. E-mail address: ernanirh@terra.com.br

SUMMARY

Objective: To evaluate the effects of L-arginine, a nitric oxide (NO) donor, on kidney-levels of malondialdehyde (a product of cellular lipid peroxidation), serum creatinine levels, and urinary volume in rats submitted to unilateral renal ischaemia-reperfusion.

Materials and methods: One-hundred-seventeen Wistar rats were randomly into four experimental studies: renal cell lipid peroxidation (kidney-levels of malondialdehyde – MDA), serum creatinine (Cr_s) levels, and urinary volume (UV). The rats were submitted to uninephrectomy followed by contralateral renal ischaemia-reperfusion with or without pretreatment with L-arginine (200mg/kg) given intraperitoneally.

Results: Pretreatment with L-arginine significantly increased the kidney-levels of MDA when compared with the no-treated group ($P<0.05$). Furthermore, L-arginine, when given prior to surgery, attenuated the increment of Cr_s levels and significantly increased UV in rats subjected to renal ischaemia-reperfusion ($P<0.05$).

Conclusion: L-arginine has a tendency to exert a beneficial effect on renal function during renal ischaemia-reperfusion in rats. Moreover, pretreatment with L-arginine (200mg/kg; intraperitoneally) seem to increase the renal damage by increasing kidney-levels of malondialdehyde.

Key Words: nitric oxide; kidney; ischaemia; L-arginine; malondialdehyde.

INTRODUCTION

Renal ischaemia-reperfusion (RIR) is a complex syndrome involving several mechanisms such as renal vasoconstriction, extensive tubular damage, and glomerular injury which occurs during renal transplantation, surgical revascularization of the renal artery, and treatment of suprarenal aortic aneurysms [1]. Reactive oxygen species (ROS) such as superoxide free radical ($\cdot\text{O}_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl free radical ($\cdot\text{OH}$) have been implicated in the pathogenesis of tissue injury during RIR [1, 2]. These ROS can produce cellular injury by attacking membranes through peroxidation of polyunsaturated fatty acids [3]. Lipid peroxidation (LPO) of mitochondrial, lysosomal, and plasma membranes can alter both membrane structure and function [3]. Malondialdehyde (MDA) is a secondary product of oxidative stress formed during LPO and assayed with a colorimetric assay of thiobarbituric acid [4]. The reaction of lipid peroxides with TBA is widely used to assay the LPO in animal tissue and it is considered an indirect method for measurement of the ROS activity [1-3, 5].

Nitric oxide (NO), a soluble free radical gas, is a very important endogenous vasodilator which has a variety of physiological and pathological effects in biological systems [6, 7]. NO is synthesized from L-arginine and molecular oxygen by the enzyme nitric oxide synthase (NOS) [6, 8]. It is produced by the endothelial cells and causes relaxation of preglomerular arteries, improving renal blood flow [9, 10]. During RIR, ROS can disrupt the integrity of the endothelium and can affect NO production, resulting in increment of renal vascular resistance [9]. Furthermore, NO can interact with $\cdot\text{O}_2^-$ to form the peroxynitrite free

radical ($\cdot\text{ONNO}^-$), an important agent that causes LPO of cellular membranes [7]. The purpose of this experimental study was to determine the role of L-arginine (a precursor of NO) on the kidney-levels of MDA in a rat model of RIR. Furthermore, we analyzed the effects of L-arginine on serum creatinine levels and urinary volume of the affected kidneys.

MATERIAL AND METHODS

One hundred seventeen male, Wistar rats (body weight between 230- 320g) were randomly divided into three experiments: analysis of renal cell lipid peroxidation (kidney-levels of malondialdehyde - MDA), study of serum creatinine (Cr_s) levels, and urinary volume (UV). All the animals were kept in an environmentally room (22 ± 2 °C and illuminated from 7:00 a.m. to 7:00 p.m.), with food pellets and potable water available *ad libitum*. The animals were housed in plastic cages ($47 \times 34 \times 18$ cm, four animals per cage) lined with saw-dust renewed every 48h. All the experiments were approved by the local Committee for Animal Use and Care. The animals went through a 12-hour fasting period prior to the surgery and received general anaesthesia with 25 mg/kg ketamine hydrochloride and 10 mg/kg xylazine given intramuscularly. Throughout the experiments, body temperature was kept at 36° to 38° C by placing the rats on a heating pad. A right nephrectomy was performed in the animals through a right flank incision (2 to 2,5 cm) seven days before the ischemic procedures in the contralateral kidneys. Renal ischaemia required performing a left flank incision and dissecting the left renal pedicle so as to expose the renal vessels. Nontraumatic vascular clamps were used to stop blood flow during fifty minutes. Reperfusion was established by removing the clamps. The abdominal wall (muscular layer and skin) was closed with 3.0 polypropylene and 4.0 mononylon sutures, respectively [5].

Serum creatinine levels

Thirty-nine rats were randomly divided into four groups undergoing: group C (control animals/n=10), a sham-operation; group U (uninephrectomized rats/n=10): a contralateral sham-operation; group I-R (n=10), left renal ischaemia-reperfusion; and group L-arg (n=9), pretreated with 200mg/kg of L-arginine (*Sigma*, Brazil) given intraperitoneally, 20 minutes before the renal ischaemia-reperfusion.

Lipid peroxidation of renal cells

Other fifty-eight uninephrectomized rats were randomly divided into four groups undergoing: group C (n=9), a sham-operation; group I (n=9), left renal ischaemia for 50 minutes; group I-R (n=10), left renal ischaemia for 50 minutes, followed by renal reperfusion; and group L-arg (n=10), pretreated with L-arginine (200mg/kg, intraperitoneally) given 20 minutes before the surgery.

Assay of renal function

After the proceedings for each group, the animals were placed in metabolic steel cages to collect urine in 24, 96, and 192 hours of renal reperfusion. The cages had a mechanism to separate animal stool, food and drinking water from urine. Blood was collected at 24, 96, and 192 hours after the procedures to determine serum creatinine levels (mg/ml) through the spectrophotometric techniques (CELM, E 210) using the Diagnostic System Labtest Kits (Brazil). A volume of 0,9% NaCl solution equal to that of the blood removed was given intraperitoneally. Twenty four-hour urine outputs was measured to determine urinary volume in ml/kg/day.

Assay of malondialdehyde (MDA) concentration

Lipid peroxidation of the renal cellular membranes was measured as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), with the results being expressed as nmol of MDA/mg of protein [11]. The renal tissue was promptly excised, weighed, washed with 0,9% NaCl, and immediately homogenized in 1,15% KCl (1g of renal tissue for each 9 ml of KCl) during 1 minute, and centrifuged during 10 minutes at 1000g [4, 12]. The precipitate was thrown away and the suspension (approximately 1 mg/ml of protein) used for measuring lipid peroxidation by the TBARS method. The suspension obtained as described above was incubated with thiobarbituric acid (Sigma, St. Louis, MO, USA) in an acid environment at 100 °C for 5 minutes. Butanol, 3 ml, was then added to the suspension that was centrifuged at 2500 rpm during 10 minutes. The precipitate was thrown away and the suspension was used for measuring the absorbance at 535 nm in a spectrophotometer [11]. Protein concentration was measured by the method of Lowry *et al* [13] with the use of bovine albumin as a standard.

One-way analysis of variance (ANOVA) method followed by Bonferroni's t test were used to analyze the MDA values, serum creatinine levels, and urinary volume. A *P* value less than 0.05 was considered significant.

RESULTS

Serum creatinine (Cr_s) levels are shown in Figure 1. Occlusion of the renal vessels for 50 minutes followed by reperfusion in uninephrectomized rats caused a marked decrease on Cr_s levels that recovered within 192 hours of renal reperfusion. The peak of Cr_s was observed on day 1 after RIR. Pretreatment with L-arginine resulted in a significant attenuation on Cr_s in rats subjected to renal ischemia followed 24 and 96 hours of reperfusion. Moreover, L-arginine did not have protection on 192h of reperfusion.

Values of urinary volume (UV) are demonstrated in Figure 2. The urinary volume of the uninephrectomized rats was not significantly different when compared to the control group, except on 96h of reperfusion ($23,6\pm 3,2$ vs. $9,53\pm 2,4$ ml/kg/day; $P<0.05$). Renal ischaemia-reperfusion increased UV in uninephrectomized rats, with statistical difference in all times of analysis. Furthermore, pretreatment with L-arginine significantly increased the UV in uninephrectomized rats subjected to left renal ischaemia in all periods of reperfusion.

Left renal ischaemia did not alter the MDA concentration in rats previously uninephrectomized ($0,59\pm 0,06$ vs. $0,49\pm 0,05$ mmol/mg of protein; $P>0.05$). Kidneys submitted to renal ischaemia followed by reperfusion demonstrated a significative increment of MDA content ($0,79\pm 0,06$ vs. $0,59\pm 0,06$ mmol/ mg of protein; $P<0.05$). Pretreatment with L-arginine significantly increased the kidney-levels of MDA in

uninephrectomized rats subjected to left renal ischaemia-reperfusion ($0,97\pm 0,24$ vs. $0,79\pm 0,06$ mmol /mg of protein; $P<0.05$).

DISCUSSÃO

Our results demonstrated that the pretreatment with L-arginine significantly increased the kidney-levels of MDA during left renal ischaemia-reperfusion in uninephrectomized rats. However, L-arginine attenuated the acute renal dysfunction and increased the urinary volume in these animals.

Acute renal failure due to ischaemia is a complex syndrome involving renal vasoconstriction, extensive tubular damage, tubular cell necrosis, glomerular filtration failure, and glomerular injury [1, 14]. The mechanisms proposed to explain the ischemia-reperfusion-induced injury include anoxia, release of ROS during reperfusion, neutrophil accumulation, and the subsequent release of additional ROS and lytic enzymes [14, 15, 16]. ROS have been strongly implicated in the pathogenesis of cellular damage associated to renal ischaemia-reperfusion (RIR) [2, 3]. Our work confirms these findings through the lipid peroxidation (LPO) study: in accordance to these authors, we were capable to detect a significant increase on the malondialdehyde (MDA) levels after RIR in uninephrectomized rats [2, 3]. Furthermore, this increment was higher in rats pretreated with L-arginine. Thus, either L-arginine was incapable to exert an antioxidant effect through the inactivation of $\cdot\text{O}_2^-$ by NO (a product of L-arginine) or it increased available of NO, arising the interaction of NO and $\cdot\text{O}_2^-$ with subsequent release of $\cdot\text{ONOO}^-$, causing more LPO of renal cell membranes.

Xanthine oxidase is probably the main source of ROS during tissue ischaemia-reperfusion [17, 18]. In the kidney, renal ischaemia results in a decrease of adenosine triphosphate (ATP) and a rise in the ATP products such as

adenosine, inosine, and hypoxanthine [1-3, 5]. Accumulation of hypoxanthine during ischaemia might be the generation of ROS through the conversion of hypoxanthine to xanthine by the xanthine oxidase [1-3, 5].

Various experimental studies have been demonstrated that RIR produces an important decrease of renal function in rats [1-3]. In our experiment, in accordance to these authors, the peak of Cr_s levels was observed on day 1 after renal ischaemia with reestablishment to the normal values after 7 days of reperfusion [1, 3].

Other studies have demonstrated that contralateral nephrectomy offers partial protection against ischaemic renal injury [19, 20]. Uninephrectomy might increase the urinary volume in rats and uninephrectomy followed by RIR can offer a substantial increase in this parameter [19, 20]. Furthermore, RIR-induced injury results in decreased of renal blood flow and increased of urine output [21]. Our results corroborate these findings: urine flow rate was higher in kidneys submitted to RIR when compared to control group.

Renal ischaemia-reperfusion also is characterized by decrease of renal blood flow and glomerular filtration rate and NO plays an important role in this process [21]. Basal production of NO is necessary for normal glomerular function, and during RIR, NO inhibition exacerbates the renal dysfunction [22]. ROS are also implicated as the cause of damage of endothelial cells with decrease of NO production by endothelial cells during RIR [1, 2, 10].

Nitric oxide (NO) seems to have a beneficial role during RIR: during ischaemia, NO protects the ischaemic tissue due to its vasodilatory action. In the reoxygenation phase, NO can react with $\cdot O_2^-$, impeding the chain of reaction for

additional production of ROS such as $\cdot\text{OH}$ and H_2O_2 [23]. However, the interaction between NO and $\cdot\text{O}_2^-$ can be capable to origin peroxynitrite free radical ($\cdot\text{ONOO}^-$), which could cause LPO of cellular membranes [7]. NO also diminishes the leukocyte adhesion, neutrophil infiltration and the formation of inflammatory mediators during tissue ischaemia-reperfusion [23]. NO is a potential renal vasodilator that has been shown to decrease the renal vascular resistance and improve recovery of renal function after ischaemic damage [10]. L-arginine dilates resistance blood vessels probably through NO release from vascular endothelial cells [24]. NO metabolism is altered during ischemia: some authors have related a biphasic response of NOS activity to RIR in rats with early stimulation (2h), followed by a period of depressed activity (24h) until renal function and NOS activity returned to baseline simultaneously (7 days) [10]. L-arginine improves glomerular filtration rate after RIR in rodents [22] and renal vascular resistance in rabbit kidneys was significantly increased in animals pretreated with L-NAME and submitted to long term cold ischaemia [9].

Shoskes *et al* [10] demonstrated that the pretreatment with oral L-arginine (5g/l) significantly decreased Cr_s levels in uninephrectomized rats subjected to left RIR in the day 7. Lopez-Neblina *et al* [26] found a protective effect on Cr_s levels in rats treated with nitroprusside, but not with L-arginine, suggesting that NO dependence of recovery from IR injury may be dependent on an intact endothelium in addition to depletion of L-arginine.

In our study, pretreatment with L-arginine significantly increased the kidney-levels of MDA after RIR. Nevertheless, these findings did not corroborate those obtained for Cr_s analysis because

L-arginine demonstrated a significant beneficial effect on acute renal damage by attenuation on the renal function after 24 and 96 hours of renal reperfusion.

The animals pretreated with L-arginine also demonstrated a protector effect on urinary volume when compared to the no-treated group. Thus, L-arginine has a strong tendency to exert a beneficial role after RIR maybe due to the rise of NO bioavailability, and increase of the glomerular filtration rate, creatinine clearance and urinary volume.

In the other hand, the NOS inhibitors seem to exert a prejudicial effect during tissue ischaemia-reperfusion [26]. The kidney appears to be more sensitive than other organs to acute inhibition of NO production by L-NAME (N^G-nitro-L-arginine methyl ester), a well studied NOS inhibitor [22]. Inhibition of NO production causes decrease of glomerular flow rate, diuresis and natriuresis [27]. Moreover, other authors have been demonstrated that increment of NO production was not capable to increase the urinary volume in rats subjected to renal ischaemia-reperfusion [16].

L-NAME produced a significant decrease in urine volume in normal rats which was inhibited by the simultaneous administration of L-arginine [27]. However, infusion of L-arginine alone during 3 consecutive days failed to induce a beneficial renal effect on urinary flow rate, suggesting that NO production is not limited by the availability of its substrate [27]. In another study, pretreatment with L-NAME significantly decreased the creatinine clearance in rats subjected to RIR [28]. L-NMMA (N^G-monoethyl-L-arginine), another NOS inhibitor, aggravated the renal function and markedly reduced the urine flow rate in a rat model of RIR. In this study, it was not demonstrated that L-arginine could be capable to increase the urine flow after RIR [22].

In the other hand, some authors have been demonstrated that pretreatment with L-arginine increases the tubular damage induced by RIR and L-

NAME attenuates this damage [29]. This discrepancy may be explained by the tendency of NO to form $\cdot\text{ONOO}^-$ which can be prevented by the administration of an $\cdot\text{O}_2^-$ scavenger such as superoxide dismutase together with L-arginine [21]. Thus, Caramelo *et al* [16] demonstrated that the combination of L-arginine plus superoxide dismutase had a synergistic effect during RIR by the significant increase of urinary volume and renal function.

In conclusion, L-arginine (a NO precursor) has a tendency to exert a beneficial effect in the renal ischaemia-reperfusion in rats due to its role in increasing the urinary volume and decreasing the serum creatinine levels. Moreover, pretreatment with L-arginine (200mg/kg; given intraperitoneally) was capable to increase the production of malondialdehyde (a product of renal cell lipid peroxidation) much probably by the increment of peroxynitrite free radical ($\cdot\text{ONNO}^-$) production, although we did not measure the activity of this free radical. The beneficial effect of L-arginine on renal dysfunction was probably exerted by its vasodilatory property and not by its possible action of $\cdot\text{O}_2^-$ scavenger through the inactivation of this free radical by NO (a product of L-arginine). Further studies should be performed to better elucidate the role of L-arginine during renal ischaemia-reperfusion mainly in trials involving humans.

REFERENCES

1. Bird JE, Milhoan K, Wilson CB *et al.* Ischemic acute renal failure and antioxidant therapy in the rat: the relation between glomerular and tubular dysfunction. *J Clin Invest* 1988; **81**: 1630-38.
2. Baker GL, Corry RJ, Autor AP. Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion: protective effect of superoxide dismutase. *Ann Surg* 1985; **202**: 628-41.
3. Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radical in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest* 1984; **74**: 1156-64.
4. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analyt Biochem* 1979; **95**: 351-8.
5. Rhoden EL, Rhoden CR, Mauri M *et al.* Experimental model of renal ischemia-reperfusion in rats: study of the stress oxidative induced by oxygen-derived free radicals. *Braz J Urol* 1999; **25**: 431-6.
6. Moncada S, Higgs A. The L-arginine/nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; **329**: 2002-12.
7. Gross SS, Wolin MS. Nitric oxide: pathophysiologic mechanisms. *Ann Rev Physiol* 1995; **57**: 737-69.
8. Förstmann U, Clors EI, Pollock JS *et al.* Nitric oxide synthase isoenzymes: Characterization, purification, molecular cloning and functions. *Hypertension* 1994; **23**: 1121-31.
9. Hanssen TN, D'Alessandro A, Southard JH. Long term cold ischemia reduces nitric oxide metabolism in reperfused rabbit kidneys. *Transplant Proc* 1997; **29**: 3417-19.
10. Shoskes DA, Xie Y, Gonzalez-Cadavid NF. Nitric oxide synthase activity in renal ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation* 1997; **63**: 495-500.
11. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Meth Enzymol* 1978; **52**: 302-9.
12. Llesuy SF, Milei J, Molina H *et al.* Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori* 1985; **71**: 241-9.

13. Lowry OH, Rosebrough MJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the foline reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**: 265.
14. Weinberg JM. The cell biology of ischemic renal injury. *Kidney Int* 1991; **39**: 476-500.
15. Bonventre JV. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 1993; **43**: 1160-78.
16. Caramelo C, Espinosa G, Manzarbeitia F *et al.* Role of endothelium-related mechanisms on the pathophysiology of renal ischemia-reperfusion in normal rabbits. *Circ Res* 1996; **79**: 1031-38.
17. Rhoden EL, Pereira-Lima L, Mauri M, Lucas ML, Rhoden CR, Belló-Klein A. Effect of the inhibition of xanthine oxidase in hepatic cells lipid peroxidation. *Med Sci Res* 1999; **27**: 829-30.
18. Greene E, Paller MS. Xanthine oxidase produces $\cdot\text{O}_2^-$ in post-hypoxic injury of renal epithelial cells. *Am J Physiol* 1992; **263**:251-5.
19. Kato A, Hishida A, Tanaka I, Komatsu K. Uninephrectomy prevents the ischemia-induced increase in renin activity. *Nephron* 1997; **75**: 72-6.
20. Finn WF, Fernandez-Repollet E, Goldfarb D, Iaina A, Eliahou H. Attenuation of injury due to unilateral renal ischemia: delayed effects of contralateral nephrectomy. *J Lab Clin Med* 1984; **103**: 193-203.
21. Waz WR, Van Liew JB, Feld LG. Nitric oxide metabolism following unilateral renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Pediatr Nephrol* 1998; **12**: 26-29.
22. Chintala MS, Chiu PJS, Vemulapalli S *et al.* Inhibition of endothelium derived relaxing factor (EDRF) aggravates ischemic acute renal failure in anesthetized rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1993; **348**: 305-310.
23. Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T *et al.* Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Surg Res* 1995; **59**: 772-779.
24. Bhardwaj R, Moore PK. The effect of arginine and nitric oxide on resistance blood vessels of the perfused rat kidney. *Br J Pharmacol* 1989; **97**: 739.
25. Lopez-Neblina F, Paez AJ, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. Role of nitric oxide in ischemia-reperfusion of the rat kidney. *Circ Shock* 1994; **44**: 91-5.

26. Lucas ML, Rhoden CR. Therapeutic potential of the inhibitors of nitric oxide synthase. *Rev Bras Cin Terap* 1999; **25**: 29-37.
27. Salazar FJ, Pinilla JM, López F *et al*. Renal effects of prolonged synthesis inhibition of endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension* 1992; **20**: 113-117.
28. Kin S, Sasaki T, Gu K *et al*. The cytoprotective role of nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in the rat kidney. *Transplant Proc* 1995; **27**: 754-6.
29. Yu L, Gengaro PE, Niederberger M, Burke TJ, Schrier RW. Nitric oxide: a mediator in rat tubular hypoxia-reoxygenation injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 1691-95.

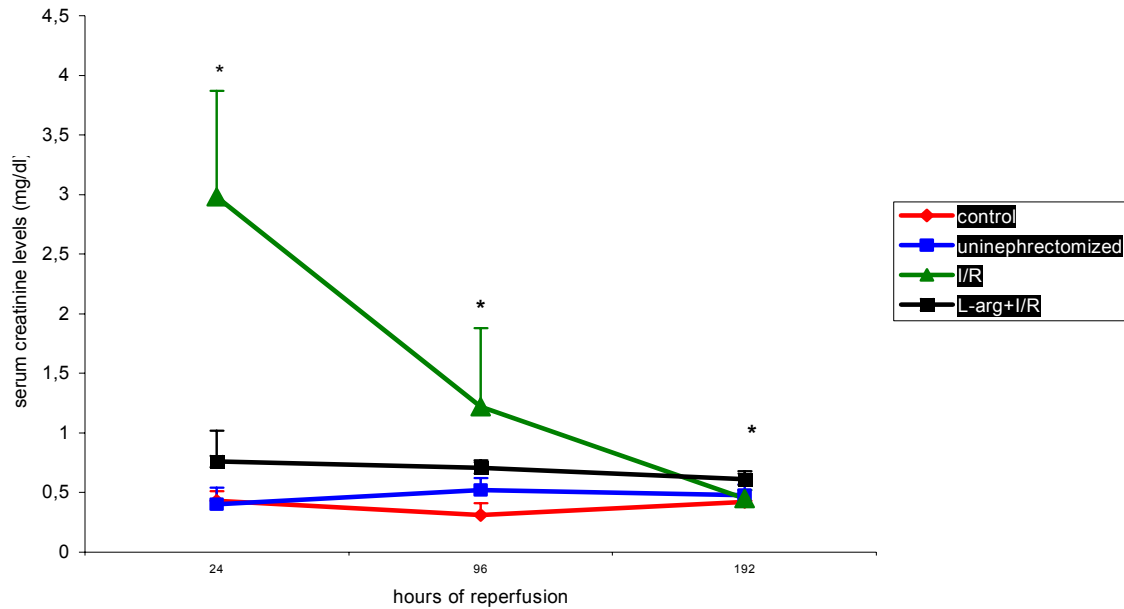


Fig. 1. The mean (SD) values of serum creatinine levels (mg/dl) in the four groups of rats: red, control; blue, uninephrectomized; green, renal ischaemia-reperfusion; and black, L-arginine plus renal ischaemia-reperfusion. ANOVA method followed by Bonferroni's *t* test. * $P < 0.05$.

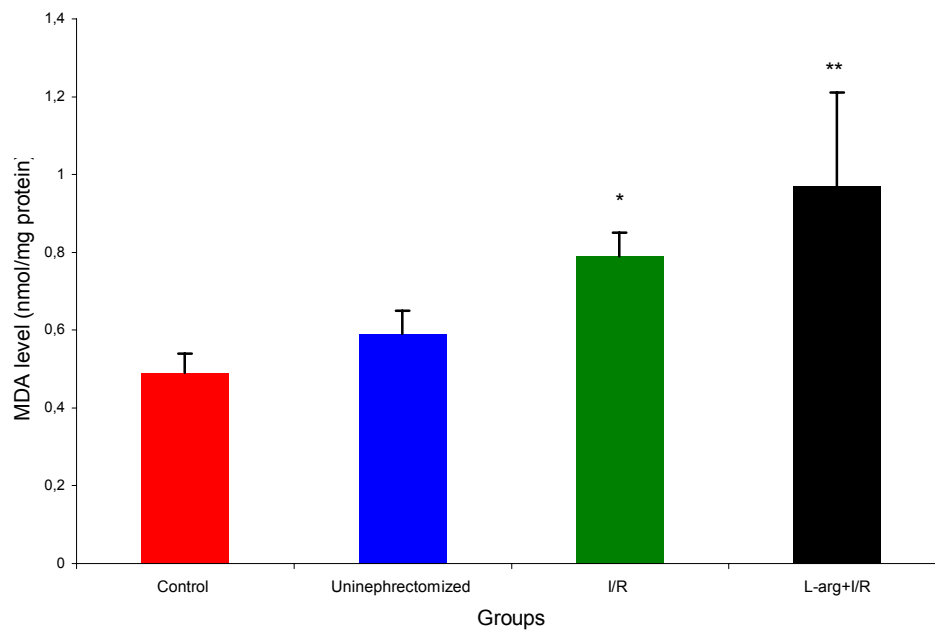


Fig. 2. The mean (SD) values of kidney-levels of malondialdehyde (nmol/mg of protein) in the four groups of rats: red, control; blue, uninephrectomized; green, renal ischaemia-reperfusion; and black, L-arginine plus renal ischaemia-reperfusion. ANOVA method followed by Bonferroni's *t* test. * and ** $P < 0.05$.

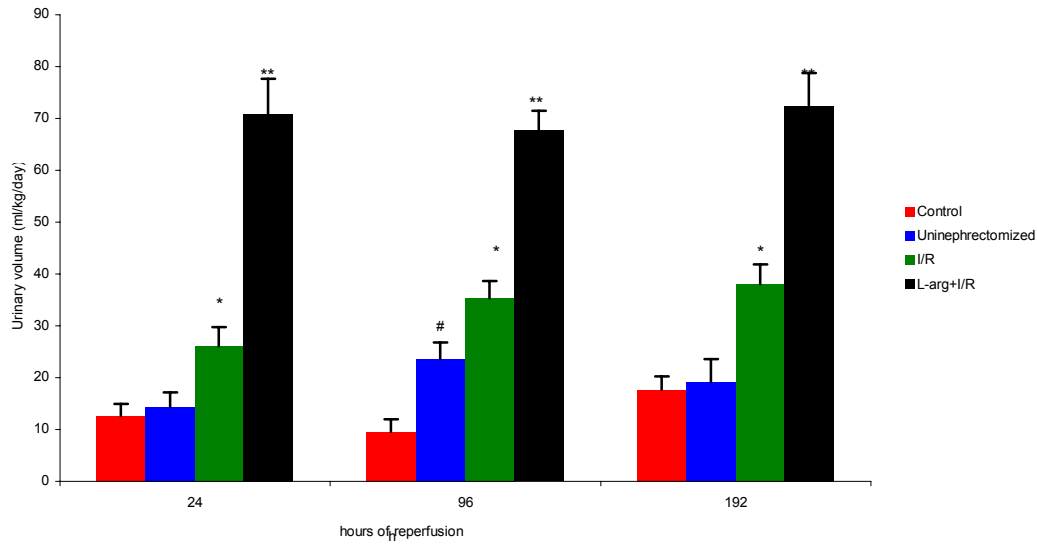


Fig. 3. The mean (SD) values of urinary volume (ml/kg/24h) in the four groups of rats: red, control; blue, uninephrectomized; green, renal ischaemia-reperfusion; and black, L-arginine plus renal ischaemia-reperfusion. ANOVA method followed by Bonferroni's *t* test. * , # and ** $P < 0.05$.

Versão em Portugues do trabalho número 3

Efeitos da L-arginina nos valores teciduais renais de malondialdeído em ratos submetidos à isquemia-reperfusão renal.

E. L. Rhoden¹; L. Pereira-Lima¹; M. L. Lucas²; C. R. Rhoden²; and A. Belló-Klein³.

From the Course of Post-Graduation in Medical Clinic of the Clinical Hospital of Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul and Departments of Surgery¹ and Pharmacology² of the Porto Alegre School of Medical Science/Santa Casa University Hospital, and Laboratory of Cardiovascular Physiology of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondência ao Autor:

Ernani Luís Rhoden, Rua Jaraguá, 370/302, Bairro Bela Vista, Porto Alegre - RS
- Brasil - CEP 90450-140. E-mail: ernanirh@terra.com.br

RESUMO

Objetivo: Avaliar os efeitos da L-arginina, um doador de óxido nítrico (NO), nos valores teciduais renais de malondialdeído (produto da peroxidação lipídica celular), níveis séricos de creatinina, e volume urinário em ratos submetidos à isquemia-reperfusão renal unilateral.

Material e métodos: Cento e dezessete ratos Wistar foram divididos aleatoriamente em quatro estudos experimentais: peroxidação lipídica das células renais (valores renais de malondialdeído – MDA), valores séricos de creatinina (Cr_s) e volume urinário (VU). Os ratos foram submetidos à uninefrectomia seguida por isquemia-reperfusão renal contralateral com ou sem pré-tratamento com L-arginina (200mg/kg) administrada por via intraperitoneal

Resultados: O pré-tratamento com L-arginina elevou significativamente os valores renais de MDA quando comparados com o grupo não-tratado ($p < 0,05$). Além disso, a L-arginina atenuou o incremento dos valores de Cr_s e aumentou significativamente o VU em ratos submetidos à isquemia-reperfusão ($p < 0,05$).

Conclusão: L-arginina apresentou uma tendência em exercer um efeito benéfico na função renal durante a isquemia-reperfusão deste órgão em ratos. Não obstante, o pré-tratamento com L-arginina (200mg/kg; intraperitoneal) parece agravar o dano renal aumentando os valores renais de malondialdeído.

Palavras-chave: óxido nítrico; rim; isquemia; L-arginina; malondialdeído.

INTRODUÇÃO

A isquemia-reperfusão renal (IRR) é um fenômeno complexo que envolve vários mecanismos fisiopatológicos tais como a vasoconstrição renal, o dano tubular extenso e lesão glomerular (1). Esta situação clínico-cirúrgica é um evento presente em transplantes renais, revascularizações cirúrgicas das artérias renais, tratamentos de aneurismas supra-aórticos, nefrectomias parciais e nefrolitotomias (1). Espécies reativas de oxigênio (EAO) como o radical livre superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical livre hidroxila ($\cdot\text{OH}^-$) estão implicados na patogênese da lesão tecidual durante IRR (1,2). Essas EAO lesam as estruturas celulares exercendo um efeito deletério sobre as membranas através de uma peroxidação lipídica dos ácidos graxos polinsaturados das mesmas (3). A peroxidação lipídica (POL) das membranas mitocondriais, lisossomais e plasmáticas podem alterar tanto a estrutura como a função desta (3). O malondialdeído (MDA) é um produto secundário do estresse oxidativo formado durante a POL e pode ser avaliado através de estudos colorimétrico do ácido tiobarbitúrico (ATB) (4). A reação da peroxidação lipídica com ATB é largamente utilizada na avaliação da POL em tecidos animais e é considerada um método indireto de mensuração da atividade das EAO (1-3,5).

O óxido nítrico (NO), um radical livre gasoso solúvel, é um importante vasodilatador endógeno e possui uma variedade de efeitos fisiológicos e fisiopatológicos nos diversos sistemas biológicos (6,7). É originado a partir da L-arginina e do oxigênio molecular através de uma ação enzimática exercida pela

enzima óxido nítrico sintase (NOS) (6,8). É produzido pelas células endoteliais e causa relaxamento das artérias pré-glomerulares, melhorando o fluxo sanguíneo renal (9,10). Durante a IRR, as EAO podem interromper a integridade do endotélio e podem afetar a produção de NO, resultando num incremento da resistência vascular renal (9). Além disso, NO pode interagir com $\cdot\text{O}_2^-$ formando o radical livre peróxinitrito ($\cdot\text{ONNO}^-$), um importante agente causador de POL nas membranas celulares(7).

O propósito deste estudo experimental foi o de determinar o papel da L-arginina (um precursor do NO) nos valores teciduais renais de MDA em um modelo experimental de IRR em ratos. Também analisamos os efeitos da L-arginina nos valores séricos da creatinina e do volume urinário nestes animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Cento e dezessete ratos Wistar machos (pesando entre 230 e 320g) foram divididos randomizadamente para três experimentos: análise da peroxidação lipídica celular renal (níveis teciduais renais de malondialdeído – MDA), estudo dos valores séricos de creatinina Cr_s e do volume urinário. Todos os animais foram mantidos em um quarto ambientalizado (22 ± 2 °C e iluminado das 7h às 19h), com ração alimentar e água potável disponíveis *ad libitum*. Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas (47 × 34 × 18 cm, quatro animais por gaiola) forradas com serragem trocada a cada 48h. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética local para o Uso e Cuidado com Animais de experimentação. Os animais foram privados de alimentação 12h antes da realização da cirurgia e receberam anestesia geral com 25mg/kg de hidrocloreto de quetamina e 10mg/kg de xilasina, administrados intramuscularmente. Durante o procedimento cirúrgico a temperatura corporal dos animais foi mantida entre 36° e 38°C, colocando os mesmos em suportes aquecidos. Uma nefrectomia à direita foi realizada através de uma incisão no flanco direito (2 a 2,5cm) quinze dias antes dos procedimentos de isquemia transitória no rim contra-lateral. A isquemia renal foi efetuada abordando os respectivos órgão através da realização de uma incisão no flanco esquerdo e dissecação do pedículo renal. Pinças vasculares não-traumáticas foram utilizadas para interromper o fluxo sanguíneo durante 50 minutos. A reperusão foi estabelecida removendo-se as pinças. A parede

abdominal (camada muscular e pele) foi fechada com suturas de polipropileno 3.0 e mononylon 4.0, respectivamente.

Valores séricos de creatinina

Trinta e nove ratos foram divididos randomizadamente em quatro grupos e submetidos aos seguintes procedimentos: Grupo C (animais controle/n=10), operação simulada (*sham*); Grupo U (ratos uninefrectomizados/n=10), uma operação contra-lateral simulada (*Sham*); Grupo I-R (uninefrectomizados/n=10), isquemia-reperfusão renal esquerda; e Grupo L-arg (uninefrectomizados/n=9), pré-tratados com 200mg/kg de L-arginina (*Sigma*, Brasil), via intraperitoneal, 20 minutos antes da isquemia-reperfusão renal.

Peroxidação lipídica das células renais

Outros trinta e oito ratos foram divididos randomizadamente em quatro grupos submetidos à: Grupo C (n=9), grupo operado simuladamente (*Sham*); Grupo I (n=9), isquemia renal por 50 minutos; Grupo I-R (n=10), isquemia renal esquerda por 50 minutos seguida pela perfusão renal de uma hora; e Grupo L-arg (n=10), pré-tratados com L-arginina (200mg/kg, intraperitoneal), via intraperitoneal, 20 minutos antes da isquemia de 50 minutos seguido de perfusão de 1 hora.

Avaliação da função renal

Após os procedimentos de cada grupo, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas de aço para colheita de urina às 24, 96 e 192 horas após a

isquemia transitória. As gaiolas possuíam um mecanismo de separação dos excrementos animais, comida e água potável da urina. O sangue foi coletado às 24, 96 e 192 horas após o procedimento para determinar os valores séricos de creatinina (mg/mL) através de técnicas espectrofotométricas (CELM, E 210) usando os Kits de Sistema de Diagnóstico Laboratoriais (Brasil). Um volume de solução de NaCl a 0,9% igual ao volume de sangue retirado para análise foi administrado intraperitonealmente. A produção urinária em vinte e quatro horas foi medida para determinar o volume urinário em mL/kg/dia.

Avaliação da concentração de malondialdeído (MDA)

A peroxidação lipídica das membranas celulares renais foi medida pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)), sendo os resultados expressos em nmol da MDA/mg de proteína(11). O tecido renal foi prontamente excisado após os terminos dos experimentos, pesado, lavado com NaCl a 0,9% e imediatamente homogeneizado em KCl a 1,15% (1g de tecido renal para cada 9 mL de KCl) durante 1 minuto, e centrifugado durante 10 minutos à 1000g (4,12). O precipitado foi descartado e a suspensão (aproximadamente 1mg/mL de proteína) foi usada para a medição da peroxidação lipídica pelo método das TBARS. A suspensão obtida como descrito acima foi incubada com ácido tiobarbitúrico (Sigma, St. Louis, MO, USA) em um ambiente ácido à 100 °C por 5 minutos. Butanol, 3mL, foi então adicionado à suspensão que foi centrifugada à 2500rpm durante 10 minutos. O precipitado foi descartado e a suspensão usada para medir a absorvância à 535nm em um

espectrofotômetro(11). A concentração protéica foi mensurada pelo método de Lowry *et al*s (13), utilizando a albumina bovina como padrão.

O método de análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste “t” de Bonferroni foram utilizados para analisar os valores de MDA, valores séricos de creatinina e volume urinário. Um valor de p menor que 0,05 foi considerado significativo.

RESULTADOS

Os valores séricos da creatinina (Cr_s) estão mostrados na Figura 1. A oclusão dos vasos renais por 50 minutos seguido da reperfusão do órgão em ratos uninefrectomizados, causaram um marcado descenso nos níveis de Cr_s , retornando aos níveis basais 192 horas após o procedimento cirúrgico. O pico de Cr_s foi observado um dia após IRR. O pré-tratamento com L-arginina resultou em uma significativa atenuação da elevação da Cr_s em ratos submetidos à isquemia renal seguida de 24 e 96 horas de reperfusão. Além do mais, a L-arginina não exerceu uma proteção na medida das 192 horas após a reperfusão.

Os valores do volume urinário (VU) estão demonstrados na Figura 2. O volume urinário dos ratos uninefrectomizados não foi significativamente diferente quando comparado ao grupo controle, com exceção da medida efetuada 96 horas após o término do procedimento ($23,6 \pm 3,2$ vs. $9,53 \pm 2,4$ mL/kg/dia; $P < 0.05$). A isquemia-reperfusão renal elevou o VU em ratos uninefrectomizados, com diferenças estatísticas em todos os tempos de análise. Além disso, o pré-tratamento com L-arginina elevou significativamente o VU em ratos uninefrectomizados submetidos à isquemia renal e todos os períodos de reperfusão.

Isquemia renal esquerda não alterou a concentração de MDA em ratos previamente uninefrectomizados ($0,59 \pm 0,06$ vs. $0,49 \pm 0,05$ mmol/mg de proteína; $P > 0.05$). Os rins submetidos à isquemia renal seguida por reperfusão, demonstraram um incremento significativo da mensuração do MDA ($0,79 \pm 0,06$ vs.

0,59±0,06 mmol/ mg de proteína; $P<0.05$). O pré-tratamento com L-arginina aumentou significativamente os valores teciduais renais de MDA em ratos submetidos à isquemia-reperfusão renal (0,97±0,24 vs. 0,79±0,06 mmol /mg de proteína; $P<0.05$).

DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento com L-arginina aumenta significativamente os valores teciduais renais de MDA durante a isquemia-reperfusão renal em ratos uninefrectomizados. Contudo, a L-arginina atenuou a disfunção renal aguda e elevou o volume urinário nesses animais.

A insuficiência renal aguda devido à isquemia é uma síndrome complexa envolvendo uma vasoconstrição renal, extenso dano tubular, necrose das células tubulares, falência da filtração glomerular e lesão glomerular (1,14). Os mecanismos propostos para explicar a lesão induzida pela isquemia-reperfusão incluem a anóxia, liberação de EAO durante a perfusão, acúmulo de neutrófilos e a subsequente liberação de EAO adicionais e enzimas líticas(14, 15, 16). EAO estão fortemente implicadas na patogênese do dano celular associado à isquemia-reperfusão renal (IRR)(2,3). Nosso trabalho confirma esses achados pelo estudo da peroxidação lipídica (POL): de acordo com esses autores, fomos capazes de detectar um aumento significativo dos níveis teciduais renais de malondialdeído (MDA) após IRR em ratos (2,3). Além disso, esse incremento foi maior em ratos pré-tratados com L-arginina. Portanto, tanto a L-arginina foi capaz de exercer um efeito antioxidante através da inativação do $\cdot O_2^-$ pelo NO (um produto da L-arginina) como pelo aumento do NO disponível, aumentando a interação do NO com $\cdot O_2^-$ com liberação subsequente de $\cdot ONOO^-$ causando mais POL nas membranas celulares renais.

A xantina oxidase é provavelmente a principal fonte de EAO durante isquemia-reperfusão tecidual (17,18). No rim, a isquemia renal resulta em um

descenso de adenosina trifosfato (ATP) e elevação de produtos do ATP como adenosina, inosina e hipoxantina (1-3, 5). O acúmulo de hipoxantina durante a isquemia pode ser o gerador de EAO durante a conversão da hipoxantina em xantina pela xantina oxidase(1-3, 5).

Vários estudos experimentais demonstraram que a IRR produz um importante descenso na função renal em ratos (1-3). Em nosso experimento, o pico dos níveis Cr_s foram observados um dia após isquemia renal com o restabelecimento dos valores normais após 7 dias do procedimento cirúrgico (1,3).

Outros estudos demonstraram que a nefrectomia contralateral oferece proteção parcial contra lesão isquêmica renal (19,20). A uninefrectomia pode aumentar o volume urinário em ratos e a uninefrectomia seguida por IRR pode ocasionar um aumento substancial neste parâmetro (19,20). Além disso, a lesão induzida por IRR resulta em um descenso do fluxo sanguíneo renal e aumento da produção de urina (21). Nossos resultados corroboram esses achados: a taxa de fluxo renal é maior em rins submetidos à IRR quando comparada ao grupo controle.

A isquemia-reperfusão renal também é caracterizada pela diminuição do fluxo sanguíneo renal e taxa de filtração glomerular e o NO desempenha um importante papel neste processo (21). Uma produção basal de NO é necessária para manter uma função glomerular normal e, durante a IRR, a inibição de NO pode, portanto, ser extremamente deletéria para a função renal (22). As EAO estão também implicadas como tendo o potencial de causar um dano endotelial com diminuição da produção de NO pelas células endoteliais durante o fenômeno IRR (1, 2, 10).

Portanto, o óxido nítrico (NO) parece exercer um efeito benéfico durante a IRR, ou seja, durante a isquemia, o NO protege o tecido isquêmico devido a sua ação vasodilatadora. Na fase de reoxigenação, o NO pode reagir com o $\cdot O_2^-$, impedindo a reação em cadeia dos produtos adicionais das EAO como $\cdot OH^-$ e

H_2O_2 (23). Contudo, a interação entre NO e $\cdot O_2^-$ pode ser capaz de originar o radical livre peróxinitrito ($\cdot ONOO^-$), o qual pode causar POL das membranas celulares (7). O NO também diminui a adesão leucocitária, infiltração neutrofílica e a formação de mediadores inflamatórios durante a isquemia-reperfusão tecidual(23). O NO é um vasodilatador renal e esta ação já foi demonstrada em estudos nos quais a resistência vascular renal foi significativamente reduzida e melhorou a recuperação da função renal após dano isquêmico (10). A L-arginina dilata os vasos resistentes ao fluxo sanguíneo provavelmente pela liberação de NO pelas células endoteliais vasculares (24). O metabolismo do NO é alterado durante a isquemia: alguns autores relataram uma resposta bifásica da atividade da NOS durante a IRR em ratos, ou seja, a primeira fase caracterizando-se por uma estimulação precoce (2h) da mesma, seguido por um período de atividade deprimida (24h) até que a função renal e a atividade da NOS retornassem aos valores de basais simultaneamente (7 dias)(10). A L-arginina aumenta a taxa de filtração glomerular após IRR em roedores (22) e, por outro lado, a resistência vascular renal em rins de coelhos eleva-se significativamente em animais pré-tratados com L-NAME e submetidos à isquemia fria de longo prazo(9).

Shoskes e cols. (10) demonstraram que o pré-tratamento com L-arginina oral (5g/L) diminuiu significativamente os valores de Cr_s em ratos uninefrectomizados submetidos à IRR esquerda. Lopez-Neblina e cols.(26) acharam um efeito protetor sobre a função renal avaliada pelas concentrações séricas de Cr_s em ratos tratados com nitroprussiato de sódio, mas não com L-arginina, sugerindo que a recuperação ou preservação da produção de NO e seus

efeitos benéficos sobre a função renal na isquemia-reperfusão, seja dependente de um endotélio intacto, em adição à depleção de L-arginina.

No nosso estudo, o pré-tratamento com L-arginina aumentou significativamente os valores renais de MDA após IRR. Entretanto, esses achados não corroboraram aqueles obtidos pela análise da Cr_s , pois a L-arginina demonstrou um benefício significativo na preservação da função renal no fenômeno isquêmico-reperfusional quando se determinou as concentrações da creatinina sérica 24 e 96 horas após o procedimento cirúrgico.

Os animais pré-tratados com L-arginina também demonstraram um efeito protetor quando se observa o volume urinário quando comparados com o grupo não-tratado. Todos estes aspectos são de alguma forma relacionados com a propriedade que a L-arginina possui de exercer um papel benéfico após IRR devido ao aumento da biodisponibilidade de NO e aumento da taxa de filtração glomerular, clearance da creatinina e volume urinário.

Por outro lado, os inibidores da NOS parecem exercer um efeito prejudicial durante a isquemia-reperfusão renal (26). O rim parece ser mais sensível que os outros órgãos à inibição aguda da produção de NO pelo L-NAME (N^G -nitro-L-arginina metiléster), um inibidor da NOS(22). A inibição da produção da síntese de NO causa um descenso da taxa de fluxo glomerular, diurese e natriurese(27). Por outro lado, outros autores demonstraram que o incremento da produção de NO não foi capaz de elevar o volume urinário em ratos submetidos à IRR(16).

O L-NAME produz uma diminuição significativa no volume urinário em ratos normais, sendo esta ação contrabalançada ou inibida pela administração simultânea de L-arginina (27). Todavia, a infusão isolada de L-arginina durante três dias consecutivos falhou em induzir um efeito

benéfico na taxa de fluxo urinário, sugerindo que a produção de NO não era limitada pela disponibilização do seu substrato mas sim pela integridade de um componente celular íntegro (endotélio) para produzi-lo (27). Em outro estudo, o pré-tratamento com L-NAME diminuiu, significativamente, o clearance da creatinina em ratos submetidos à IRR (28). O L-NMMA (N^G -monoetil-L-arginina), outro inibidor da NOS, agravou a disfunção renal e reduziu marcadamente a taxa do fluxo urinário em um modelo animal em ratos de IRR. Neste estudo, não foi demonstrada a propriedade da L-arginina em elevar o fluxo urinário após IRR (22).

Por outro lado, alguns autores demonstraram que o pré-tratamento com L-arginina aumenta o dano tubular induzido pela IRR e o L-NAME atenua esse dano (29). Essa discrepância pode ser explicada pela tendência do NO em formar peróxinitrito o qual pode ser prevenido pela administração de um depletor de $\cdot O_2^-$ como a superóxido dismutase juntamente com a L-arginina (21). Além disso, Caramelo e cols (16) demonstraram que a combinação da L-arginina mais o superóxido dismutase possuem um efeito sinérgico durante a IRR, elevando de forma significativa o volume urinário e a função renal.

Concluindo, a L-arginina (um precursor do ON) possui a tendência de exercer um efeito benéfico na isquemia-reperfusão renal em ratos, devido ao seu papel em incrementar o volume urinário e diminuir os níveis séricos de creatinina. Também, o pré-tratamento com L-arginina (200mg/kg; dados intraperitonealmente) foi capaz de aumentar a produção de malondialdeído (um produto da peroxidação lipídica renal) muito provavelmente pelo incremento da produção do radical livre peróxinitrito, apesar de não termos medido a atividade desse radical livre. O benefício da L-arginina na disfunção renal foi provavelmente exercido pela sua propriedade vasodilatadora e não pela sua possível ação detoxificadora de $\cdot O_2^-$, através da inativação desse radical livre pelo NO (um produto da L-arginina). Certamente outros estudos seriam extremamente interessantes para tentar responder uma série de outros aspectos relacionados a ação da L-arginina no

fenômeno isquêmico-reperfusional, principalmente em ensaios envolvendo humanos.

Referências Bibliográficas

1. Bird JE, Milhoan K, Wilson CB *et al.* Ischemic acute renal failure and antioxidant therapy in the rat: the relation between glomerular and tubular dysfunction. *J Clin Invest* 1988; **81**: 1630-38.

2. Baker GL, Corry RJ, Autor AP. Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion: protective effect of superoxide dismutase. *Ann Surg* 1985; **202**: 628-41.

3. Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radical in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest* 1984; **74**: 1156-64.
4. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analyt Biochem* 1979; **95**: 351-8.
5. Rhoden EL, Rhoden CR, Mauri M *et al.* Experimental model of renal ischemia-reperfusion in rats: study of the stress oxidative induced by oxygen-derived free radicals. *Braz J Urol* 1999; **25**: 431-6.
6. Moncada S, Higgs A. The L-arginine/nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; **329**: 2002-12.
7. Gross SS, Wolin MS. Nitric oxide: pathophysiologic mechanisms. *Ann Rev Physiol* 1995; **57**: 737-69.
8. Förstmann U, Clors EI, Pollock JS *et al.* Nitric oxide synthase isoenzymes: Characterization, purification, molecular cloning and functions. *Hypertension* 1994; **23**: 1121-31.
9. Hanssen TN, D'Alessandro A, Southard JH. Long term cold ischemia reduces nitric oxide metabolism in reperfused rabbit kidneys. *Transplant Proc* 1997; **29**: 3417-19.
10. Shoskes DA, Xie Y, Gonzalez-Cadavid NF. Nitric oxide synthase activity in renal ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation* 1997; **63**: 495-500.
11. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Meth Enzymol* 1978; **52**: 302-9.

12. Llesuy SF, Milei J, Molina H *et al.* Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori* 1985; **71**: 241-9.
13. Lowry OH, Rosebrough MJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the foline reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**: 265.
14. Weinberg JM. The cell biology of ischemic renal injury. *Kidney Int* 1991; **39**: 476-500.
15. Bonventre JV. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 1993; **43**: 1160-78.
16. Caramelo C, Espinosa G, Manzarbeitia F *et al.* Role of endothelium-related mechanisms on the pathophysiology of renal ischemia-reperfusion in normal rabbits. *Circ Res* 1996; **79**: 1031-38.
17. Rhoden EL, Pereira-Lima L, Mauri M, Lucas ML, Rhoden CR, Belló-Klein A. Effect of the inhibition of xanthine oxidase in hepatic cells lipid peroxidation. *Med Sci Res* 1999; **27**: 829-30.
18. Greene E, Paller MS. Xanthine oxidase produces $\cdot\text{O}_2^-$ in post-hypoxic injury of renal epithelial cells. *Am J Physiol* 1992; **263**: 251-5.
19. Kato A, Hishida A, Tanaka I, Komatsu K. Uninephrectomy prevents the ischemia-induced increase in renin activity. *Nephron* 1997; **75**: 72-6.
20. Finn WF, Fernandez-Repollet E, Goldfarb D, Iaina A, Eliahou H. Attenuation of injury due to unilateral renal ischemia: delayed effects of contralateral nephrectomy. *J Lab Clin Med* 1984; **103**: 193-203.

21. Waz WR, Van Liew JB, Feld LG. Nitric oxide metabolism following unilateral renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Pediatr Nephrol* 1998; **12**: 26-29.
22. Chintala MS, Chiu PJS, Vemulapalli S *et al*. Inhibition of endothelium derived relaxing factor (EDRF) aggravates ischemic acute renal failure in anesthetized rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1993; **348**: 305-310.
23. Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T *et al*. Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Surg Res* 1995; **59**: 772-779.
24. Bhardwaj R, Moore PK. The effect of arginine and nitric oxide on resistance blood vessels of the perfused rat kidney. *Br J Pharmacol* 1989; **97**: 739.
25. Lopez-Neblina F, Paez AJ, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. Role of nitric oxide in ischemia-reperfusion of the rat kidney. *Circ Shock* 1994; **44**: 91-5.
26. Lucas ML, Rhoden CR. Therapeutic potential of the inhibitors of nitric oxide synthase. *Rev Bras Cin Terap* 1999; **25**: 29-37.
27. Salazar FJ, Pinilla JM, López F *et al*. Renal effects of prolonged synthesis inhibition of endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension* 1992; **20**: 113-117.
28. Kin S, Sasaki T, Gu K *et al*. The cytoprotective role of nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in the rat kidney. *Transplant Proc* 1995; **27**: 754-6.
29. Yu L, Gengaro PE, Niederberger M, Burke TJ, Schrier RW. Nitric oxide: a mediator in rat tubular hypoxia-reoxygenation injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 1691-95.

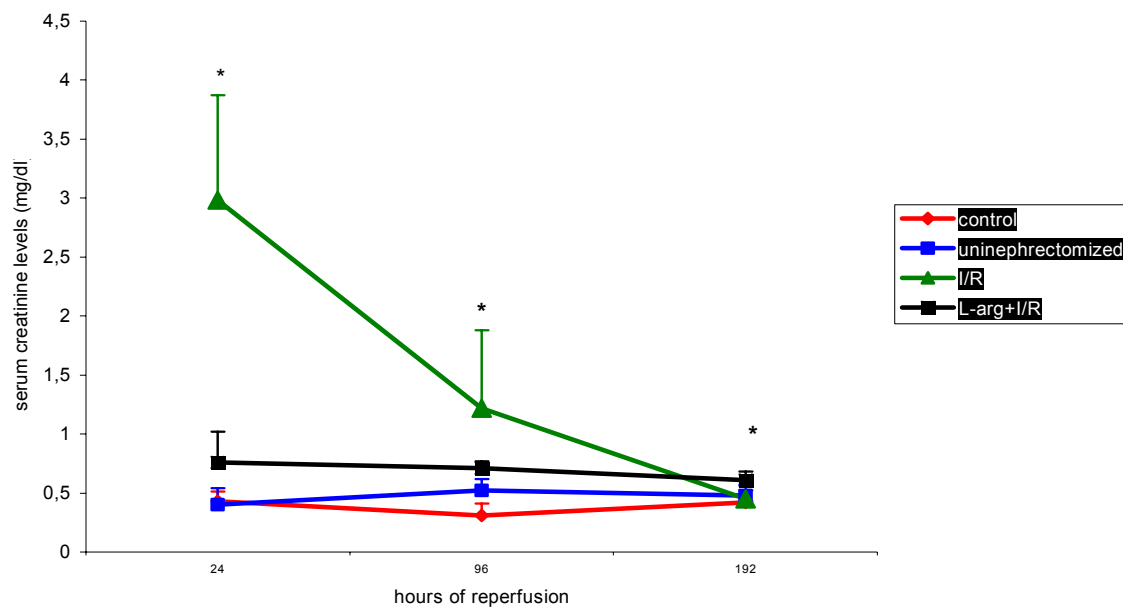


Fig. 1. Os valores médios (DP) dos níveis séricos de creatinina (mg/dL) nos quatro grupos de ratos: vermelho, controle; azul, uninefrectomizados; verde, isquemia-reperfusão renal; e preto, L-arginina mais isquemia-reperfusão. O método ANOVA seguido pelo teste “t” de Bonferroni. * $P < 0.05$.

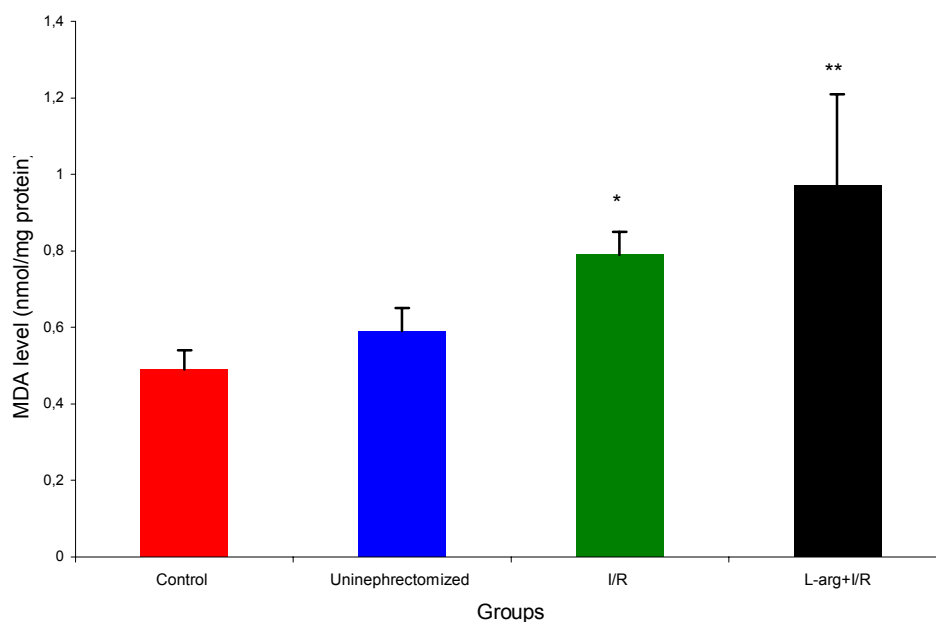


Fig. 2. Os valores médios (DP) dos níveis renais de malondialdeído (nmol/mg de proteína) nos quatro grupos de ratos: vermelho, controle; azul, uninefrectomizados; verde, isquemia-reperfusão renal; e preto, L-arginina mais

isquemia-reperfusão. O método ANOVA seguido pelo teste “t” de Bonferroni. * $P < 0.05$.

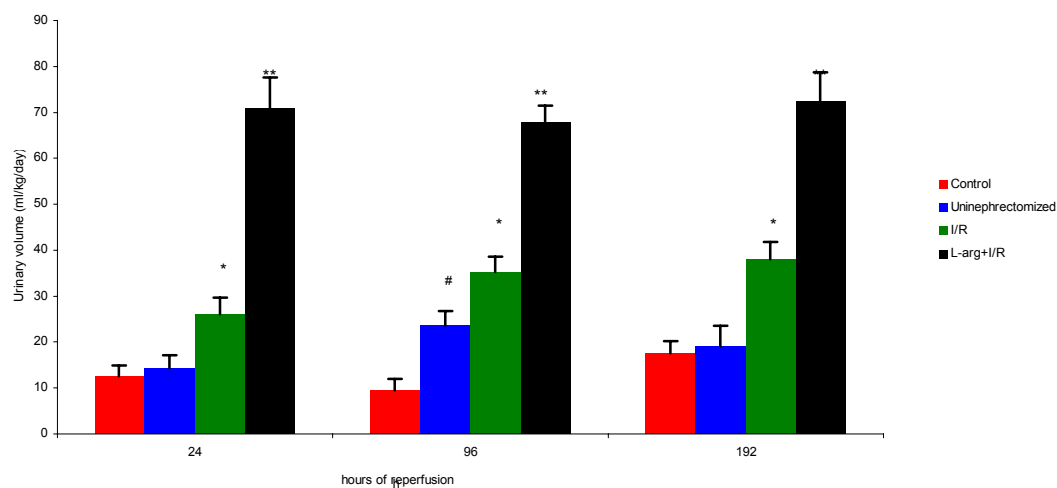


Fig. 3. Os valores médios (DP) do volume urinário (ml/kg/24h) nos quatro grupos de ratos: vermelho, controle; azul, uninefrectomizados; verde, isquemia-reperfusão renal; e preto, L-arginina mais isquemia-reperfusão. O método ANOVA seguido pelo teste “t” de Bonferroni. * $P < 0.05$.

ANEXO 1

Volumes urinários

Colheitas de urina de 24 horas foram efetuadas colocando-se os animais em gaiolas metabólicas, adequadamente confeccionadas para o objetivo proposto, utilizando-se os animais do experimento no qual foi determinada a creatinina sérica.

Resultados:

As análises dos volumes urinários nas medidas efetuadas às 24 , 96 e 192 horas após a isquemia renal demonstraram diurese mais elevadas naqueles animais submetidos a referida intervenção (G. 3, 4, 5 e 6) quando comparados com os volumes urinários obtidos nos animais dos grupos controle (Grupos 1 e 2) ($p < 0.05$). Os animais pré-tratados com L-arginina (G. 5) quando comparados aos grupos submetidos a mesma intervenção porém pré-tratados (G.4) ou não (G.3) com L-NAME apresentaram maiores volumes urinários nas avaliações efetuadas 24 e 96 horas após os procedimentos ($p < 0,05$). O L-NAME exerceu também um maior ($p < 0,05$) efeito em termos de débito urinário quando comparado ao seu controle (G.3) 24 horas após a cirurgia. Comportamentos semelhantes apresentaram os animais pré-tratados com as duas drogas simultaneamente (G.6).

TABELA I- Volume urinário em ratos normais ou ratos com rim único submetidos ou não a isquemia renal normotérmica transitória pré-tratados ou não L-NAME e L-arginina.

Grupos	24 horas	96horas	192horas
Grupo 1 (n=10)	3,80± 1,3	2,86± 1,4	5,30± 1,6
Grupo 2 (n=10)	4,30± 1,9	7,08± 3,2	5,74± 4,5
Grupo 3 (n=10)	7,80± 3,7*	10,6± 2,3*	11,40± 3,8*

Grupo 4 (n=10)	13,72± 4,59 ^{*/**}	11,05± 4,26 [*]	14,44± 5,14 [*]
Grupo 5 (n=10)	21,27± 6,7 ^{*/♣}	20,32± 2,89 ^{*/♣}	21,77± 9,26 [*]
Grupo 6 (n=10)	18,56± 8,05 ^{*/**}	15,31± 8,25 [*]	21,86± 14,7 [*]
F (5%; 5;36)	14.31	25.94	6.64

Valores expressos em média ± desvio padrão; diferença estatisticamente significativa: * em relação aos grupos 1 e 2; ** em relação ao grupo 3;

♣ em relação aos grupos 3 e 4;

ANOVA seguido pelo Teste t de Bonferroni, p<0.05

Grupo 1 (Controle 1; normais); Grupo 2 (Controle 2; rim único); Grupo 3 (Isquemia); Grupo 4 (Isquemia/L-NAME); Grupo 5(Isquemia/L-Arginina); Grupo 6 (Isquemia/L-NAME+L-Arginina).

ANEXO 2

Taxas de mortalidade

As taxas de mortalidade observadas nos diferentes grupamentos de animais estão representadas na Tabela III. Pode-se observar uma tendência para uma maior mortalidade no grupo de animais pré-tratados com L-NAME, principalmente nas primeiras 24 horas após a intervenção cirúrgica, porém sem expressão de significância estatística (p>0,05).

Tabela II – Determinação das taxas de mortalidade pós-operatória de ratos normais ou ratos com rim único submetidos ou não a isquemia renal normotérmica pré-tratados ou não com L-NAME e L-arginina.

Grupos	24h		96h		192h	
	n	%	n	%	n	%
G.1: Controle (n=10)	-	0	-	0	-	0
G.2: Controle (n=10)	-	0	-	0	-	0
G.3: Isquemia (n=10)	1	10	-	0	-	0
G.4: L-NAME (n=10)	3	30	1	10	-	0
G.5: L-arginina (n=10)	1	10	-	0	-	0
G.6: L-NAME+L-arginina (n=10)	1	10	-	0	-	0
X² (5%;59)	6,667		5,984		não faz	

p=0,272

p=,344

*Diferença estatisticamente significativa. Teste do Qui-quadrado para um nível de significância de 95%.

Grupo 1 (Controle; normais); Grupo 2 (Controle; rim único); Grupo 3 (Isquemia); Grupo 4 (Isquemia/L-NAME); Grupo 5 (Isquemia/L-Arginina); Grupo 6 (Isquemia/L-NAME+L-Arginina).

ANEXO 3

Características histopatológicas

Estudo das características histológicas dos rins de ratos normais e de animais submetidos a isquemia e reperfusão sanguínea, pré-tratados ou não com L-NAME e L-arginina.

Avaliou-se as alterações histológicas 24 horas e no oitavo dia após o procedimento cirúrgico. Para a análise dos efeitos da isquemia transitória renal sob o ponto de vista histológico no oitavo dia, foram utilizados os rins dos animais do Experimento 1, imediatamente após terem sido sacrificados.

Entretanto, para o estudo das características histológicas no primeiro dia após o procedimento um grupo novo de animais foi pré-tratado ou não com as respectivas drogas e submetido ao procedimento de isquemia transitória exceto os controles normais. Logo após ressecados, os rins foram seccionados longitudinalmente, identificados e acondicionados em recipientes contendo formol a 10%; após, esse material foi colocado em álcool etílico a 100% por 12 horas, em seguida no Xilol e depois preparado para inclusão em parafina. Posteriormente, os blocos de parafina foram cortados em micrótomo e este material foi disposto sobre lâminas de vidro e corados pelo corante de Hematoxilina-Eosina e Tri-crômico de Masson, sendo a seguir

analisadas em microscopia óptica com auxílio de um Médico-Patologista, que não era conhecedor do grupamento aos quais pertenciam os tecidos analisados.

Para fins de avaliação e quantificação das alterações decorrentes da isquemia sobre as características histológicas renais considerou-se os efeitos a nível de tubulos renais (necrose tubular e atrofia tubular) , infiltrado inflamatório e fibrose intersticial.

Estas amostras foram avaliadas considerando-se as seguintes características: a) na avaliação das 24 horas: necrose tubular, infiltrado inflamatório; b) na avaliação do oitavo dia: necrose tubular, atrofia tubular, infiltrado inflamatório e fibrose intersticial. Para tanto, utilizou-se uma escala semi-quantitativa graduada de 0 a 4+ (RIERA et al., 1999), aonde :

0: ausência de anormalidades

1+: alterações afetando <25% da amostra

2+: alterações presente em 25 a 50% da amostra.

3+: alterações presentes em mais de 50% da amostra.

Os dados referentes às alterações histopatológicas dos rins foram expressos através de mediana e analisados estatisticamente pelo Teste de Kruskal-Wallis (Siegel, 1979) seguido pelo Método de Dunn, considerando para efeitos de significância estatística um alfa=5%.

RESULTADOS

As principais alterações histopatológicas renais observadas nas primeiras 24 horas após o procedimento cirúrgico, isto é, isquemia renal, mostraram como principais características a presença de necrose tubular e infiltrado inflamatório. No que concerne a intensidade das alterações referidas como necrose tubular a mesma esteve presente de maneira uniforme ($p>0,05$) em todos os rins submetidos a isquemia transitória normotérmica independentemente da intervenção farmacológica pré-operatória. Quando se analisou a intensidade do infiltrado inflamatório ao nível do parênquima renal, 24 horas após o procedimento de isquemia renal observou-se que o mesmo foi mais proeminente nos animais dos grupos isquemia e isquemia e L-NAME quando os mesmos foram comparados aos grupos controle (G.1 e 2). A diferença quanto a esta variável não foi estatisticamente significativa quando se analisou os resultados observados nos animais tratados previamente com L-arginina ($p>0,05$).

Nas análises das características histológicas avaliadas no oitavo dia após a isquemia observa-se uma significativa redução das alterações observadas no primeiro dia após a cirurgia, ou seja, a necrose tubular e infiltrado inflamatório intersticial. Entretanto, tornam-se mais evidentes a atrofia tubular e a fibrose intersticial como consequências do evento isquêmico transitório realizado previamente. Apesar disto, observou-se a presença de um infiltrado inflamatório intersticial mais pronunciado ($p<0,05$) no parênquima renal de animais pré-

tratados com L-NAME quando comparados com aqueles dos grupos controles e os que receberam L-arginina.

O grupo de animais submetidos a isquemia renal sem nenhum tratamento pré-operatório apresentou os graus mais significativos de atrofia tubular em relação aos demais grupamentos ($p < 0,05$), exceto quando comparados com o grau de intensidade das alterações observadas nos animais previamente tratados com L-arginina (G.5) ($p > 0,05$).

A fibrose intersticial renal apresentou um comportamento uniforme nas avaliações histológicas efetuadas naqueles grupos de animais submetidos a isquemia renal transitória independente da intervenção farmacológica efetuada no período pré-operatório ($p > 0,05$), entretanto, todos distintos em relação aos grupos controles (G.1 e 2) ($p < 0,05$). Os resultados estão expressos na Tabela abaixo:

Tabela III- Estudo histopatológico de rins de ratos normais e submetidos a isquemia renal, pré-tratados e não com L-NAME e L-Arginina, nas primeiras 24 horas e no oitavo dia após o procedimento cirúrgico.

Grupos	Primeiro Dia		Oitavo Dia		Atrofia Tubular	Fibrose Intersticial
	Necrose Tubular	Infiltrado inflamatório	Necrose Tubular	Infiltrado Inflamatório		
Grupo 1	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Grupo 2	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Grupo 3	3 (2-3)*	1 (1-1)*	0 (0-1)	0 (0-1)	2 (2-2)♣	2 (2-2) ^σ
Grupo 4	2 (2-2)*	1 (1-1)*	1 (0-1)	1 (1-1) ^α	1 (1-1)•	1,5 (1-2) ^σ
Grupo 5	1 (1-1)*	0,5(0-1)	0 (0-1)	0 (0-0)	2 (1-2)•	1 (1-1) ^σ
Grupo 6	2 (2-2)*	0 (0-1,75)	0 (0-1)	0 (0-0,5)	1 (1-1)•	1 (0-2) ^σ
H _(5%;4)	91,37	57,083	36,25	57,08	71,15	77,80

Diferença estatisticamente significativa:

*em relação aos grupos 1,2;

♣ em relação aos grupos 1,2,4 e 6;

• em relação aos grupos 1,2 ;

α em relação aos grupos 1, 2 e 5;

σ em relação aos grupos 1 e 2.

Valores expressos em mediana- Kruskal-Wallis seguido pelo Método de Dunn; Grupo 1 (Controle; normais); Grupo 2 (Controle; rim único); Grupo 3 (Isquemia); Grupo 4 (Isquemia/L-NAME); Grupo 5 (Isquemia/L-Arginina); Grupo 6 (Isquemia/L-NAME+L-Arginina).

