

# EFEITOS DO ALOPURINOL SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO DE MEMBRANAS CELULARES RENAIIS NA SÍNDROME DA ISQUEMIA E REPERFUSÃO: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS<sup>1</sup>.

Ernani Luís Rhoden<sup>2</sup>  
Marcelo Mauri<sup>3</sup>  
Leonardo Petteffi<sup>4</sup>  
Francisco Dacanal<sup>3</sup>  
Marco Pilla<sup>3</sup>  
Adriane Belló-Klein<sup>5</sup>  
Cláudio Telöken<sup>6</sup>  
Elvino Barros<sup>7</sup>  
Cláudia Ramos Rhoden<sup>8</sup>

## RESUMO:

**Objetivo:** Vários estudos têm demonstrado que Radicais Livres de Oxigênio (RLO) contribuem para o dano celular decorrente da isquemia e reperfusão. Este estudo foi desenvolvido como o objetivo de avaliar os efeitos da isquemia e reperfusão renal em ratos, tratados ou não com alopurinol, sobre a lipoperoxidação (LPO) das membranas celulares renais. **Método:** Foram usados ratos Wistar distribuídos em 4 grupos e submetidos a períodos de isquemia e reperfusão renal ou não, dependendo do grupo. Também foram submetidos ou não a tratamento com alopurinol na dose de 50 e 150 mg/Kg por via intraperitoneal, 5 e 1 horas antes do procedimento. Na avaliação da lipoperoxidação utilizou-se os métodos do TBARS e QL. **Resultados:** Os resultados demonstraram aumento da LPO nos animais submetidos a isquemia e reperfusão renal. No entanto, estes efeitos deletérios foram reduzidos com o pré-tratamento com alopurinol ( $p < 0,05$ ). **Conclusão:** O dano causado em animais submetidos a isquemia e reperfusão renal pode ser demonstrado e quantificado pela LPO. Além disso, o alopurinol demonstrou proteção renal contra o dano decorrente desta síndrome, diminuindo a LPO nestes animais. Estes resultados sugerem que a via da xantina oxidase é uma das mais importantes rotas metabólicas envolvidas na geração de RLO, estes responsáveis em parte pelos danos funcionais do rim na síndrome da isquemia e reperfusão deste órgão. **Descritores:** Radicais livres de oxigênio, Lipoperoxidação, Isquemia e reperfusão renal.

## INTRODUÇÃO

A isquemia e reperfusão de órgãos tem sido amplamente reconhecida como fonte importante de EAO, com consequências deletérias sobre estes órgãos devido a peroxidação de lipídios existentes em membranas celulares (LPO)<sup>1-12</sup>. Na literatura têm sido descritas várias condições clínicas, nas quais as espécies ativas de oxigênio (EAO) ou radicais livres de oxigênio (RLO) podem estar implicadas como elementos fisiopatológicos, destacando-se entre estes as síndromes isquêmico-reperfusionais, tais como, infarto do miocárdio, isquemia intestinal, enterocolite necrotizante, isquemia cerebral<sup>1-7</sup>. 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 a formação das EAO e suas consequências<sup>12-15</sup>. Durante o período isquêmico podemos observar dano tecidual em função das alterações iônicas do cálcio e da proteólise (lesão isquêmica)<sup>16</sup>. Entretanto, após restabelecida a reperfusão sanguínea arterial e, por conseguinte, fluxo de oxigênio aos tecidos, a oxidação da hipoxantina e xantina é processada pela xantina-oxidase e consequentemente, altas proporções de EAO são formadas<sup>7,9-12,15,17-19</sup>.

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 e desta forma formaria o radical superóxido ( $O_2^-$ )<sup>7,20-26</sup>. Estudos experimentais diversos têm sido efetuados no sentido de respaldar a teoria da xantina oxidase na geração das EAO, assim drogas como alopurinol, pelo seu efeito inibidor da xantina oxidase, tem sido testado em modelos de isquemia tecidual, mostrando efeito protetor superior aos grupos não tratados<sup>20,27,28</sup>.

Este estudo foi desenvolvido como o objetivo de avaliar os efeitos da isquemia e reperfusão renal em ratos, tratados e não com o alopurinol, sobre a lipoperoxidação das membranas celulares renais.

## MÉTODOS

### # Amostra:

Para este estudo foram utilizados 40 ratos Wistar machos, adultos, pesando entre 250 e 350 gramas, criados no Biotério da Disciplina de Farmacologia e Toxicologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA). Os animais foram mantidos em número máximo de 6 em gaiolas plásticas com dimensões de 47x34x18 cm, em sala com temperatura controlada de  $22 \pm 2^\circ C$  e, ciclo claro de luz das 7 às 19h, recebendo ração padronizada (Purina, Nutripal, Porto Alegre, RS, Brasil) e água "ad libitum". O estudo foi desenvolvido conforme a Declaração de Helsinki.

### # Procedimentos:

Suspensão de alopurinol (Zyloric, 100mg por comprimido, Glaxo Welcome, Brasil) 25 mg/ml, preparada em solução fisiológica e administrada 5 e 1 horas antes do procedimento cirúrgico. A solução controle foi a solução fisiológica.

A solução anestésica utilizada compreendeu uma solução composta por partes iguais (1:1) de Cloridrato de Xilasina 20 mg/ml (Kensol, Köning, Industria Argentina) e Cloridrato de Quetamina 50 mg/ml (Vetanarcol, Köning, Industria Argentina), administrada por via intraperitoneal (i.p.) na dose de 1ml/ Kg.

### # Descrição da técnica cirúrgica da isquemia renal:

Para realização dos procedimentos cirúrgicos os animais foram anestesiados com a solução anestésica descrita na dose de 1ml/ kg. Após o estabelecimento de um nível anestésico apropriado os ratos

foram colocados em decúbito lateral direito sobre mesas cirúrgicas, especialmente confeccionadas para animais de pequeno porte, sendo suas 4 patas fixadas com borrachas elásticas. Imediatamente efetuou-se uma lombotomia subcostal com aproximadamente 3 cm de extensão. O rim foi dissecado da gordura perirrenal e o pólo superior liberado da supra-renal, permitindo trazer o órgão, através de manobras digitais delicadas, para uma situação bastante superficial ao nível da incisão. O pedículo renal foi cuidadosamente dissecado identificando-se artéria, veia, pelve e ureter proximal. A artéria renal identificada e isolada permitindo o seu pinçamento através de pinças vasculares atraumáticas (EDLO- 7- 794), conforme desejado ou não de acordo com o experimento proposto.

### **# Determinação da lipoperoxidação (LPO) das membranas celulares através dos métodos de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS) e da Quimiluminescência (QL):**

Determinou-se a lipoperoxidação das membranas celulares dos hepatócitos causada pela formação de radicais livres através do método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)<sup>29</sup>, o qual mede a quantidade de malondialdeído derivado da lipoperoxidação, sendo seu valor expresso em nanomoles por miligrama de proteína (nmol/mg de proteína) e Quimiluminescência iniciada por hidroperóxido de tert-butil (CL)<sup>20</sup> com valores baseados e expressos em contas por segundo por miligrama de proteína (cps/mg. de proteína) de energia luminosa emitida pelo retorno ao estado fundamental de carbonilas excitadas e oxigênio singel durante a LPO. O tecido foi homogeneizado em KCl 1,15% num homogeneizador Ultra Turrax, na proporção de 1g de tecido para 9 ml de KCl 1,15%, sendo centrifugado por 10 min. à 1000g<sup>31</sup>. O precipitado era desprezado e o sobrenadante utilizado para a medida de LPO.

Para o método TBARS, o homogeneizado foi incubado com ácido tiobarbitúrico (Sigma, St. Louis, MO, USA) em meio ácido à 100 ° C durante 15 min. e, após, quantificava-se a formação de um pigmento rosa espectrofotometricamente (535 nm). Para o método de CL, o homogeneizado foi colocado em vials de cintilação com tampão fosfato (KCl 140 mM, 20 mM Pi - pH 7,4) na presença de hidroperóxido de tert-butil (3mM). A emissão de luz foi medida em um contador de cintilação (LKB - Rack Beta - Liquid scintillation Spectrometer - 1215, LKB Produkter, AB, Bromma, Sweden). A concentração de proteína foi medida pelo método de Lowry e colaboradores<sup>32</sup>, utilizando albumina bovina como padrão.

*Os animais foram distribuídos em 4 grupos de 10 ratos cada:*

- **GRUPO 1 (Controle):** Estes animais foram submetidos a anestesia e, imediatamente após a lombotomia e dissecação do rim direito, permanecendo assim por 50 minutos, ao final dos quais, efetuou-se a nefrectomia direita.

- **GRUPO 2 (Isquemia):**

Neste grupo os animais foram submetidos a anestesia, e a seguir a lombotomia direita e dissecação renal e interrupção do fluxo sanguíneo arterial para o rim direito, através do pinçamento da artéria renal por um período de 50 minutos em normotermia. Ao

final deste período de tempo, o rim foi imediatamente removido, sem ter sido permitida a reperfusão sanguínea, e acondicionado conforme descrito na técnica para determinação da lipoperoxidação.

• **GRUPO 3 (Isquemia/reperfusão):** Neste grupo os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos realizados no Grupo 2. Entretanto, foi permitida a reperfusão sanguínea arterial por um período de 1 hora, ao final da qual o rim direito foi removido e acondicionado conforme descrito anteriormente.

• **GRUPO 4 (Isquemia/reperfusão e alopurinol):** Estes animais receberam suspensão de alopurinol na dose de 50 e 150 mg/Kg de peso por via intraperitoneal, 5 e 1 hora, respectivamente, previamente ao procedimento cirúrgico conforme descrito no grupo 3.

#### # Análise estatística:

Os parâmetros estudados neste trabalho foram os níveis de lipoperoxidação das membranas celulares das células do parênquima renal através dos métodos do TBA-RS e da QL. Os resultados foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni considerando-se um nível de significância de 95% (alfa = 5%).

## RESULTADOS

Pelo método TBARS observamos uma maior formação de malondialdeído no grupo submetido a isquemia e reperfusão sem pré-tratamento com alopurinol (grupo 3) que se diferenciou estatisticamente quando comparado com os demais grupos de animais (grupos 1, 2 e 4) ( $p < 0,05$ ). Além disso, a formação de malondialdeído no grupo de animais pré-tratados com alopurinol e submetidos a isquemia e reperfusão (grupo 4) foi menor quando comparada com o grupo 3, no entanto verificamos uma maior formação deste se comparados com animais controle ( $p < 0,05$ ). Os resultados estão expressos na [tabela I](#).

**TABELA I.**

Valores médios da concentração de malondialdeído (lipoperoxidação) medidos pelo método das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).

	<b>TBARS (nmol/mg de proteína)</b>
Grupo 1 (Controle)	0,743 ± 0,08
Grupo 2 (I)	1,063 ± 0,23
Grupo 3 (I/R)	1,687 ± 0,21*
Grupo 4 (I/R+ alopurinol)	1,161 ± 0,16**

Diferença estatisticamente significativa quando comparamos: \* 3 em relação com 1, 2 e 4; \*\* 4 em relação com 1 e 3. ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). Grupo 1: controle; Grupo 2: isquemia; Grupo 3: isquemia/reperfusão e Grupo 4:

isquemia/reperfusão + alopurinol. Cada grupo representa a média de 10 animais  $\pm$  o desvio padrão.

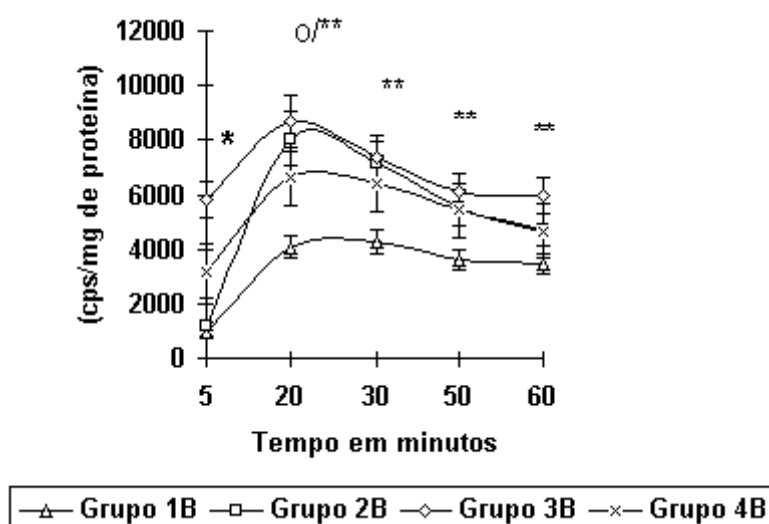
Pelo método da QL, os resultados observados foram semelhantes aos obtidos pelo método TBARS, ratificando os resultados. Observou-se aumento nos valores obtidos no grupo 3 se comparados com os demais, valores estes, decorrentes do dano tecidual devido a síndrome isquemia-reperfusão que ( $p < 0,05$ ). No entanto, estes valores foram menores nos animais tratados com alopurinol ( $p < 0,05$ ) ([tabela II](#)). O perfil cinético da quimiluminescência iniciada por hidróperóxido de tert-butil está expresso no [figura 1](#).

**TABELA II.**

Valores médios da lipoperoxidação das membranas celulares renais pelo método da Quimiluminescência (QL) iniciada pelo hidróperóxido de tert-butil.

	<b>QLmáx. (cps/mg de proteína)</b>
Grupo 1 (controle)	4334 $\pm$ 655
Grupo 2 (I)	7062 $\pm$ 1461
Grupo 3 (I/R)	9215 $\pm$ 1294*
Grupo 4 (I/R + alopurinol)	6860 $\pm$ 758**

Diferença estatisticamente significativa quando comparamos: \* 3 em relação com 1, 2 e 4; \*\* 4 em relação com 1 e 3. ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). Grupo 1: controle; Grupo 2: isquemia; Grupo 3: isquemia/reperfusão e Grupo 4: isquemia/reperfusão + alopurinol. Cada grupo representa a média de 10 animais  $\pm$  o desvio padrão.



**Figura 1-** Perfil cinético da quimiluminescência iniciada por hidróperóxido de tert-butil. Diferença estatisticamente significativa quando comparamos: \* 3 em relação com 1, 2 e 4; \*\* 1 em relação com 2, 3 e 4; ° 3 em relação com 4. ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). Grupo 1: controle; Grupo 2:

isquemia; Grupo 3: isquemia/reperfusão e Grupo 4: isquemia/reperfusão + alopurinol. Cada ponto representa a média de 10 animais  $\pm$  o desvio padrão.

Em ambos os métodos, observamos diferença entre os grupos submetidos apenas a isquemia (grupo 2) e isquemia e reperfusão (grupo 3) ( $p < 0,05$ ), demonstrando a importância do aporte de oxigênio na fisiopatologia da síndrome isquemia-reperfusão.

## DISCUSSÃO

Vários estudos têm descrito o envolvimento das EAO como um dos mecanismos envolvidos na lesão e morte celular, principalmente, quando se trata da injúria decorrente da isquemia de tecidos e órgãos<sup>5,10,12,15,26,33</sup>. Estas EAO seriam formadas no período reperfusional, sendo considerado por alguns autores<sup>8,28,33-35</sup> mais deletério para a estrutura celular do que o período isquêmico propriamente dito<sup>12,15-17,34,36</sup>. Associado a este fenômeno ocorre a elevação do cálcio citosólico, que possuem a propriedade de ativar proteases capazes de converter a xantina desidrogenase tipo D em xantina oxidase tipo O, enzima ricamente distribuída nos tecidos como o intestinal, pulmonar, hepático e renal<sup>4,9,14,35-37</sup>.

O oxigênio fornecido pela reperfusão sanguínea aos tecidos previamente isquêmicos, seria o substrato final para a ativação da xantina oxidase, através de uma oxidação sulfidrílica ou proteólise<sup>4,8,12</sup>. A transformação da hipoxantina em xantina é consequência da ativação desta enzima propiciando a formação de uratos e as EAO<sup>2,4,5,11,12,36,38</sup>. As EAO, moléculas altamente reativas, em função de suas propriedades oxidativas podem agir diretamente sobre os componentes lipídicos das membranas celulares<sup>4,8,11</sup> com tendência de gerar reações em cadeia para produzir espécies radicais resultando em uma amplificação do processo que culmina com um efeito destrutivo sobre a célula<sup>8</sup>. 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<sup>8</sup>.

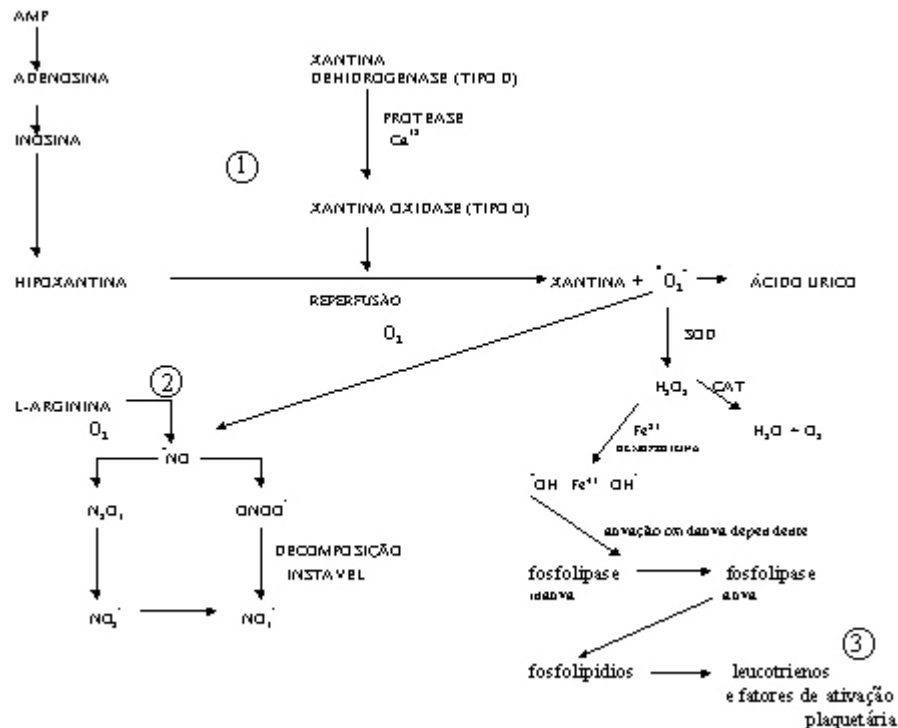
O dano à membrana celular pode afetar o envelope celular por si só, mas também podem romper as membranas das organelas, tais como das mitocôndrias e lisossomas, cuja estrutura é bastante semelhante a da celular<sup>1,37</sup> com a consequente liberação de enzimas citotóxicas potencializando o dano celular induzido pelo radical livre<sup>8</sup>. Portanto, a isquemia e reperfusão de órgãos está associado a uma série de eventos complexos que envolvem a quase totalidade dos componentes celulares, contudo, a evidência de qual o(s) mecanismo(s) que finalmente tornam irreversível a morte celular não é clara e permanecem como fonte inexorável de pesquisa e estudos científicos tendo em vista a importância que isso representa para a biologia orgânica e consequente aplicação clínica<sup>38</sup>. A repercussão dos fenômenos descritos podem ser avaliados através da sua interferência sobre a função do órgão, assim como, pela determinação indireta de seus efeitos a nível de membranas celulares avaliados através da lipoperoxidação.

Estudos prévios em animais vivos têm demonstrado o envolvimento fisiopatológico das EAO na injúria renal decorrente de situações pós-isquêmicas, entretanto, a fonte ou o sítio de geração destas

espécies reativas a nível renal ainda é controversa<sup>27</sup>. Recentemente, estes mesmos autores, demonstraram, experimentalmente, que o provável sítio de mais alta produção das EAO se situa a nível das células do túbulo renal proximal. Além disso, foi demonstrado que culturas de células do túbulo renal proximal contêm quantidades consideráveis da enzima xantina oxidase, entretanto, outras células do parênquima renal como as endoteliais e mesangiais apresentam concentrações significativas desta enzima<sup>27,39</sup>. A alteração funcional característica que se sucede a isquemia e reperfusão renal é a insuficiência renal aguda que se caracteriza por uma elevação transitória na taxas séricas da creatinina e uma redução da depuração endógena da mesma<sup>40</sup>.

A possibilidade da existência de outros mediadores na injúria renal oriunda da isquemia e reperfusão devem ser considerados, como por exemplo, a via do óxido nítrico e do ácido araquidônico. Após a formação do radical superóxido através da via xantina oxidase é convertido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (reação de dismutação) sob a ação da superóxido dismutase e, este por sua vez sob a ação da catalase é transformado em água ( $H_2O$ ) e oxigênio molecular ( $O_2$ ). Entretanto, o  $H_2O_2$  em presença de metais de transição (ferro, hemoproteínas) pode dar origem ao potente radical hidroxil (Reação de Fenton), com grande atividade reativa, o qual agindo diretamente sobre moléculas de ácidos graxos das membranas celulares ou através da ativação oxidativa da fosfolipase origina mediadores inflamatórios (leucotrienos e fatores de ativação plaquetária, entre outros) (Via do Ácido Araquidônico). O óxido nítrico, formado a partir da l-arginina pelo óxido nítrico sintase, ao nível do endotélio microvascular, age como detoxificador do radical superóxido formando nitrato ( $NO_3^-$ ), a partir da decomposição de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), 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)<sup>5,13,21</sup> (Figura 2). Estudos experimentais têm claramente demonstrado que a cascata de ativação leucocitária e interação leucócito-endotélio, assim como, a liberação de componentes citotóxicos pelos leucócitos, promovem as manifestações de injúria reperfusional, aspecto evidenciado pelo fato de que a inibição com anticorpos monoclonais de interações leucocitárias e da liberação de seus mediadores citotóxicos atenua a injúria microvascular e disfunção orgânica<sup>22,41</sup>. Além disso, autores<sup>42,43</sup> 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.

ISQUEMIA



**Figura 2-**

Principais rotas metabólicas envolvidas na geração de Espécies Ativas do Oxigênio pela isquemia e reperfusão. Radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), água ( $H_2O$ ), oxigênio molecular ( $O_2$ ), radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ), nitrato ( $NO_3^{\cdot}$ ), peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ), óxido nítrico ( $NO$ ), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). 1- Via da xantina oxidase; 2- Via do óxido nítrico e 3- Via do ácido araquidônico.

Ao analisarmos os resultados obtidos pelo método do TBARS, o qual quantifica a substância malondialdeído<sup>29</sup>, produto final da oxidação dos ácidos graxos, como uma medida indireta da formação e ação de substâncias altamente reativas e oxidantes, podemos observar, à semelhança do estudo desenvolvido por Hansson et al<sup>10</sup> uma elevação significativa de malondialdeído, nos animais não tratados com alopurinol quando comparados com aqueles que receberam esta substância. Outro dado a ressaltar, e que confirma que o período reperfusional se associa e é essencial na geração das espécies ativas oxidantes, é o fato de que naqueles animais nos quais não foi permitida a reperfusão, a concentração de malondialdeído foi semelhante a do grupo controle.

Quando observamos os resultados obtidos pelo método da quimiluminescência, o qual avalia a quantidade de energia luminosa emitida pelas carbonilas excitadas quando as mesmas, formadas no período reperfusional, retornam ao seu estado fundamental, mostrou um aumento nos valores dos animais submetidos à isquemia e reperfusão e que não receberam previamente o alopurinol quando comparados com demais grupos. Também observou-se uma diminuição destes resultados com o uso de alopurinol e a importância da reperfusão para a formação de EAO. Estes dados denotam uma concordância fundamental entre ambos os métodos utilizados no presente experimento. Estes dados analisados isoladamente definem características fundamentais na



síndrome isquêmica reperfusional, ou seja, a geração de espécies reativas oxidantes estão principalmente associadas à reperfusão, sendo a enzima xantina oxidase a fonte principal na geração das mesmas.

Podemos observar que o uso de alopurinol foi capaz de reduzir a lipoperoxidação dos ácidos graxos das membranas celulares a nível renal, fato este devido a inibição da enzima xantina-oxidase. Entretanto, a possibilidade da participação de outros mecanismos envolvidos na síndrome isquêmica reperfusional deve ser considerada, tendo em vista a possibilidade de rotas metabólicas distintas, como a do óxido nítrico e da via do ácido araquidônico e possivelmente outras que ainda serão definidas deve ser considerada. Assim, uma melhor compreensão dos fenômenos fisiopatológicos da síndrome isquemia-reperfusão, permite interferir, através de uma maneira racional, nas diferentes situações clínicas associadas a mesma com que nos deparamos frequentemente.

## REFERÊNCIAS

1. WILLET, K.; MACEDO, D.V.; DETRY, O.; EVENS, A.; SILVA, L.P.; SLUSE, F.E. - Mitochondrial oxidative phosphorylation injuries occurring in situ and in vivo. *Transplant. Proc.*, 27(5): 2827-8, 1995. [ [Links](#) ]
2. PARKS, D.A.; BULKLEY, G.B.; GRANGER, D.N. - Role of oxygen free radicals in shock, ischemia, and organ preservation. *Surgery*, 94(3): 428-31, 1983. [ [Links](#) ]
3. POLI, G. - Liver damage due to free radicals. *Br Med Bull*, 49(3): 604-20, 1993. [ [Links](#) ]
4. 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, 1981. p. 44 -6. [ [Links](#) ]
5. 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.*, 107(4): 526-45, 1987. [ [Links](#) ]
6. 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.*, 147: 263-70, 1993. [ [Links](#) ]
7. PUNCH, J.; REES, R.; CASHMER, B.; WILKINS, E.; SMITH, D.J.; TILL, G.O. - Xanthine oxidase: Its role in the no-reflow phenomenon. *Surgery*, 111(2): 169-76, 1992. [ [Links](#) ]
8. BULKLEY, G.B. - The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery*, 94(3): 407-11, 1983. [ [Links](#) ]
9. 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*, 101(5): 566-70, 1987. [ [Links](#) ]

10. 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.*, 14(1): 51-8, 1982. [ [Links](#) ]

11. PALLER, M.S.; HOIDAL, J.R.; FERRIS, T. - Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J. Clin. Invest.*, 74: 1156-64, 1984. [ [Links](#) ]

12. McCORD, J.M. - Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.*, 312(3): 159-63, 1985. [ [Links](#) ]

13. NUNES, F.A.; KUMAR, C.; CHANCE, B.; BRASS, C.A. - Chemiluminescent measurement of increased free radical formation after ischemia/reperfusion. *Dig. Dis. Scien.*, 40(5): 1045-53, 1995. [ [Links](#) ]

14. MATIELI, J.E. - *Radicais oxigênio livres na isquemia e reperfusão hepática: estudo experimental com a catalase*, Rio de Janeiro, 1994. 63 p. [Tese - Doutorado - Universidade Federal do Rio de Janeiro]. [ [Links](#) ]

15. HASSELGREN, P.O. - Prevention and treatment of ischemia of the liver. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 164: 187-96, 1987. [ [Links](#) ]

16. ABROSIO, G.; TRITTO, I.; CHIARIELLO, M. - The role of oxygen free radicals in preconditioning. *J. Mol. Cell. Card.*, 27: 1035-39, 1 [ [Links](#) ]

17. PARKS, D.A.; BULKLEY, G.B.; GRANGER, D.N. - Role of oxygen-derived free radicals in digestive tract diseases. *Surgery*, 94(3): 415-22, 1983. [ [Links](#) ]

18. 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.*, 139: 39-46, 1990. [ [Links](#) ]

19. FRANSSON, 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.*, 27(5): 2880-3, 1995. [ [Links](#) ]

20. 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.*, 159: 355-9, 1993. [ [Links](#) ]

21. GRISHAM, M.B. - Interaction between nitric oxide and superoxide: Role in modulating leukocyte adhesion in the postischemic microvasculature. *Transplant. Proc.*, 27(5): 2842-3, 1995. [ [Links](#) ]

22. MENDER, M.D. - Microcirculatory disturbance secondary to ischemia-reperfusion. *Transplant. Proc.*, 27(5): 2863-65, 1995. [ [Links](#) ]
23. 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.*, 113: 987-93, 1994. [ [Links](#) ]
24. 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.*, 59: 772-9, 1995. [ [Links](#) ]
25. ALEXANDER, B. - The role of adenosine, ATP and nitric oxide in portal venous induced hepatic arterial vasodilation. *Liver Innerv.*, 33: 283-8, 1996. [ [Links](#) ]
26. 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*, 61(2): 1979-83, 1996. [ [Links](#) ]
27. GREENE, E.L.; PALLER, M.S. - Xanthine oxidase produces O<sub>2</sub> in porthypoxic injury of renal epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, 263: 251-255, 1992. [ [Links](#) ]
28. COHEN, P.J. - Allopurinol administered prior to hepatic ischaemia in the rat prevents chemiluminescence following restoration of circulation. *Can. J. Anaesth.*, 39: 1090-3, 1992. [ [Links](#) ]
29. BUEGE, J.A.; AUST, S.D. - Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.*, 52: 302-9, 1978. [ [Links](#) ]
30. 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.*, 10: 93-100, 1991. [ [Links](#) ]
31. LLESUY, S.F.; MILEI, J.; MOLINA, H.; BOWERIS, A.; MILEI, S. - Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4-epiadriamycin in mice. *Tumori*, 71: 241-9, 1985. [ [Links](#) ]
32. LÖWRY, O.H.; ROSEBROUGH, M.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. - Protein measurement with the folin reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951. [ [Links](#) ]
33. ORTOLANI, O.; CAGGIANO, M.; MANNELLI, R.; GOLLIETTINO, A.; TUFANO, R. - Protection from ischemia-reperfusion damage in patients with stroke: the role of rutin and GSH. *Transplant. Proc.*, 27(5): 2877-8, 1995. [ [Links](#) ]
34. GRANGER, D.N.; RUTILI, G.; McCORD, J.M. - Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology*, 81: 22-6, 1981. [ [Links](#) ]

35. 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.*, 21: 743-7, 1994 [ [Links](#) ]
36. PRILLAMAN, H.M.; TURNER, T.T. - Rescue of testicular function after acute experimental torsion. *J. Urol.*, 157: 340-5, 1997. [ [Links](#) ]
37. 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.*, 27(5): 2825-6, 1995. [ [Links](#) ]
38. 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.*, 193: 275-83, 1993. [ [Links](#) ]
39. ZAGER, R.A.; GMUR, D.J. - Effects of xanthine oxidase inhibition on ischemic acute renal failure. *Acta J. Physiol.*, 257: 953-8, 1989. [ [Links](#) ]
40. DENNIS, V.W. - Avaliação da função renal. In: WYNGAARDEN, J.B.; SMITH, L.H. - *Cecil: Tratado de Medicina Interna*, 18 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1985. p. 460-6. [ [Links](#) ]
41. MARZI, I.; KNEE, J.; BÜHREN, V.; MENGER, M.; TRENTZ, O. - Reduction by superoxide dismutase of leukocyte-endothelial adherence after liver transplantation. *Surgery*, 111(1): 90-7, 1992. [ [Links](#) ]
42. 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.*, 64: 71-8, 1994. [ [Links](#) ]
43. CONNOLLY, J.K.; GUY, S.P.; PARROT, N.R. - Cytokine gene expression and eicosanoid production in renal reperfusion injury. *Transplant. Proc.*, 27(5): 2816-18, 1995. [ [Links](#) ]
44. 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.*, 86(1): 2-5, 1996. [ [Links](#) ]
45. 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*, 15(2): 49-52, 1996. [ [Links](#) ]

**SUMMARY: Background:**

**Evidence has accumulated that oxygen free radical (OFR) contribute to the cellular damage induced by ischemia-**

reperfusion. This study was undertaken to determine the effects of renal ischemia-reperfusion in rats, treated or not with allopurinol evaluating the lipid peroxidation (LPO) of renal cellular membranes. **Method:** Wistar rats were divided into 4 groups (n=10) and submitted to 50 minutes of renal ischemia and reperfusion and treated or not with allopurinol (50 and 150 mg/Kg of body, 5 and 1 hour before ischemia, respectively). The lipid peroxidation was assessed by TBARS method (Thiobarbituric acid reactivities substances) and CL method (Chemiluminescence). **Results:** The results showed that animals submitted to renal ischemia-reperfusion had renal LPO damage. These effects of ischemia and reperfusion were reduced by treatment with allopurinol ( $p < 0,05$ ). **Conclusion:** These results suggest that xanthine oxidase is one of the most important pathway involved in the generation of OFR and chemical reactivity elements with injury potential at the renal cellular membranes due to ischemia-reperfusion syndrome. At least, allopurinol showed beneficial effects preventing damage due to renal ischemia-reperfusion injury.  
**Subject headings:** Oxygen free radical, Lipid peroxidation, Renal ischemia and reperfusion.

**Endereço para separatas:**  
Cláudia Ramos Rhoden  
Av. Alberto Bins, 456/73  
CEP-90030-140 - Porto Alegre/ RS  
Fone: 051-221-6323

<sup>1</sup> Trabalho realizado no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e na Disciplina de Farmacologia e Toxicologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA).

<sup>2</sup> Médico Cirurgião Geral.

<sup>3</sup> Acadêmico de Medicina da FFFCMPA.

<sup>4</sup> Acadêmico de Medicina da UFRGS.

<sup>5</sup> Professora Adjunta do Departamento de Fisiologia da UFRGS.

<sup>6</sup> Professora Adjunta da Disciplina de Urologia da FFFCMPA.

<sup>7</sup> Professora Adjunta do Departamento de Medicina Interna da UFRGS.

<sup>8</sup> Professora Assistente da Disciplina de Farmacologia da FFFCMPA.