

Luis Antonio dos Santos Diego

**Efeitos da glibenclamida na função e histologia
renais, em ratos submetidos à hemorragia aguda sob
anestesia com sevoflurano**

Orientadora – Prof^a. Tit. Yara Marcondes Machado Castiglia

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

**Botucatu - SP
2007**

AO MEU PAI, FRANCESCO DIEGO

À PROFESSORA YARA, MINHA ORIENTADORA NA PRESENTE TESE DE
DOUTORAMENTO, RESERVO ESPECIAL AGRADECIMENTO.

Sua reputação de eminente professora e pesquisadora de anestesiologia, tanto no âmbito da Academia quanto da Sociedade Brasileira de Anestesiologia, apesar de merecida e verdadeira, distancia-se da grandeza de mulher corajosa e de extrema sensibilidade que passei a conhecer e admirar. Orgulhar-me-ei para sempre de ter sido seu orientando, por tudo que me foi ensinado e por tudo que pude depreender do mundo com a sua convivência nestes últimos três anos. Meu sincero muito obrigado, Yara!

AGRADECIMENTOS AFETIVOS

A Deus, criador e acima de todas as coisas.

À minha esposa, Regina Elizabeth Müller, por seu carinho e inestimável colaboração em diversas etapas deste trabalho.

À minha mãe Ruth e a meus filhos Fernanda, Carolina e Marcelo, pela compreensão da ausência filial e paterna.

Aos meus irmãos Carlos Alberto, Kátia Isabel e Paulo César, por comporem a base familiar, fonte primeira na formação e solidez do caráter humano.

AGRADECIMENTOS

À Dr^a Regina Maria de Aquino Xavier, pessoalmente e como representante de todos os colegas do Instituto Nacional de Cardiologia (Laranjeiras), especialmente os membros do Serviço de Anestesiologia, por seu estímulo e apoio à realização deste curso de pós-graduação e ao Dr. Bernardo Rangel Tura por seus sábios conselhos.

Aos Doutores Allan Queiroz, Marcos Piedade e Paulo Albuquerque, cirurgiões e amigos que tanto contribuíram, adequando, muitas das vezes, suas agendas de trabalho à minha disponibilidade presencial, assim como a todos aqueles, também membros do Hospital São Vicente de Paulo, que estimularam a realização deste projeto e, de algum modo, colaboraram com ele.

À Dr^a Christiane D'Oliveira Marques, Residente em Anestesiologia da Unesp e colaboradora no desenvolvimento do trabalho experimental.

Aos Doutores Antonio Carlos Campos de Carvalho e Fredson Costa Serejo, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, por suas colaborações com a glibenclamida e seu manuseio.

À Dr^a Rosa Marlene Viero e demais colaboradores do Departamento de Patologia da Unesp, por sua participação no estudo histopatológico.

À Dr^a Maria Luíza Cassetari e demais colaboradores do Departamento de Saúde Pública da Unesp, por sua participação nas dosagens com "HPLC".

Aos colaboradores do Laboratório Experimental de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, em especial ao Sr. Cristiano Correa de Oliveira, por seu trabalho diretamente com os animais.

Agradecimentos

Aos colaboradores da secretaria do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, em especial às Sras. Joana Teixeira, Nelì Pavan e Sônia Martins da Silva e ao Sr. Danilo Godoy, por suas inestimáveis orientações administrativas.

À Rosemary Cristina da Silva e Selma Maria de Jesus, bibliotecárias do Campus de Botucatu, Unesp, pela orientação bibliográfica e pela ficha catalográfica, respectivamente.

Meu sincero muito obrigado!

"MAN SIEHT NUR DAS, WAS MAN WEIß"

Só se vê o que se conhece.

J.W. von Goethe (1749-1832), em
"Kassandra", poema inacabado

Diego LAS. Efeitos da glibenclamida na função e histologia renais, em ratos submetidos à hemorragia aguda sob anestesia com sevoflurano. Botucatu, 2007, 131p. Tese (Doutorado em Anestesiologia) – Faculdade de Medicina, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

A glibenclamida, sulfoniluréia muito utilizada clinicamente no controle do diabetes mellitus, possui propriedade bloqueadora dos canais de potássio dependentes de adenosina trifosfatona (K^+_{ATP}), opondo-se à possível propriedade pré-condicionante do sevoflurano. Hipovolemia conseqüente à hemorragia suscita reações compensadoras de proteção orgânica. Entretanto, mecanismos protetores como a ativação do sistema renina-angiotensina ensejam agressão renal por vasoconstrição com interferência na função depuradora. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da glibenclamida na função e histologia renais de ratos sob anestesia com sevoflurano em cenário de choque hemorrágico. Neste intuito, estudou-se uma amostra de 20 ratos Wistar. O delineamento consistiu em estudar os animais quanto à pressão arterial, à temperatura retal e ao hematócrito e quantificar atributos da função renal, tais como: ritmo de filtração glomerular (RGF), estudar os animais quanto ao peso, pressão arterial média, temperatura retal e hematócrito e fluxo plasmático renal efetivo (FPR efetivo), fluxo sangüíneo renal e resistência vascular renal (RVR), além de se analisarem as alterações histológicas após a imposição da condição experimental. A amostra foi aleatoriamente dividida em 2 grupos de 10 animais cada (G1 e G2), entretanto apenas um destes (G2) foi submetido a tratamento com glibenclamida venosa (1 mcg.g^{-1}), 60 min antes do início de sangria. Os animais de ambos os grupos foram anestesiados com sevoflurano a 4% sob campânula apropriada e mantidos em respiração espontânea com ar enriquecido com oxigênio, além de sofrerem sangria de 30% da volemia (esta calculada como 6% do peso corporal) em 3 etapas com intervalo de 10 min. Para avaliar-se a função renal utilizou-se a estimativa dos *clearances* renais de para-aminohipurato

(FPR efetivo) e iotalamato de sódio (RGF), enquanto a histologia renal foi avaliada investigando-se o grau de dilatação tubular e vascular, congestão vascular, vacuolização tubular, necrose e evidências de regeneração tubular, e atribuindo-lhes valores que puderam ser quantificados. Os atributos relativos à função renal foram avaliados em 3 momentos: M1 e M2, coincidentes com a primeira e terceira etapas de sangramento; e M3, após 30 min de M2 quando, então, os animais foram submetidos à nefrectomia bilateral antes de serem sacrificados. Ambos os rins de cada animal foram preparados para a análise histopatológica posterior. Para os atributos avaliados ao longo do tempo foi efetuada análise de perfil, enquanto que para os escores histológicos a comparação entre os grupos foi efetuada a prova não-paramétrica de Mann-Whitney para grupos independentes. Os resultados não evidenciaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em relação ao peso (Teste "t" de Student) e também quanto à temperatura, à pressão arterial média, ao hematócrito, ao ritmo de filtração glomerular e ao fluxo sanguíneo renal. Houve diferença significativa, porém, em relação ao *clearance* de para-aminohipurato; assim, evidenciou-se diminuição do FPR efetivo em G1 quando comparado a G2. Quanto à RVR, foram observados maiores valores em G2. O exame histopatológico mostrou maior vulnerabilidade dos rins expostos apenas ao sevoflurano (G1), de modo que, na análise final, concluiu-se que o tratamento prévio com a glibenclamida, nas condições metodológicas do experimento, pode atenuar agudamente a agressão renal.

Palavras-chave: glibenclamida; sevoflurano; função renal; histopatologia renal; pré-condicionamento; hemorragia aguda; ratos.

Diego LAS. Effects of glibenclamide on renal function and histology in rats subjected to acute hemorrhage under sevoflurane anesthesia. Botucatu, 2007, 131p. Dissertation (Ph.D. in Anesthesiology) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, São Paulo, Brazil.

ABSTRACT

Glibenclamide, a sulfonylurea widely used clinically for controlling diabetes mellitus, blocks adenosine triphosphate-dependent potassium (K^+_{ATP}) channels, thus opposing the possible preconditioning property of sevoflurane. Hypovolemia from hemorrhage evokes protective compensatory reactions. However, protective mechanisms such as activation of the renin-angiotensin system result in renal impairment by vasoconstriction interfering in the clearance function. This study was designed to evaluate the effects of glibenclamide on renal function and histology in rats in a state of hemorrhagic shock under sevoflurane anesthesia. A sample of 20 Wistar rats was studied for that purpose. The design consisted in studying mean arterial pressure, rectal temperature and hematocrit and quantifying glomerular filtration rate (GFR), effective renal plasma flow (ERPF), renal blood flow (RBF) and renal vascular resistance (RVR), and analyzing histological alterations after the experimental conditions were attained. The sample was randomized into 2 groups of 10 animals each (G1 and G2), only one of which (G2) was treated with intravenous glibenclamide (1 mcg.g^{-1}), 60 min before bleeding was begun. Both groups were anesthetized with sevoflurane at 4% under an appropriate bell jar and kept on spontaneous respiration with oxygen-enriched air, while being bled of 30% of volemia (calculated as 6% of body weight) in 3 stages with 10-min intervals. Evaluation of renal function used estimated renal clearances of para-aminohippurate (ERPF) and sodium iothalamate (GFR), while renal histology was evaluated by investigating the degree of vascular and tubular dilatation, vascular congestion, tubular vacuolization, necrosis and signs of tubular regeneration, and attributing quantifiable values to them. Renal function

attributes were evaluated at 3 moments: M1 and M2, coinciding with the first and third stages of bleeding; and M3, 30 min after M2, when the rats were subjected to bilateral nephrectomy before being sacrificed. Both kidneys from each rat were prepared for later histopathological analysis. A profile analysis was made of the attributes evaluated over time, while histological scores were compared between the groups by the non-parametric Mann-Whitney test for independent groups. The results yielded no significant differences ($p < 0.05$) between the groups in terms of weight (Student "t" test) or temperature, mean arterial pressure, hematocrit, glomerular filtration rate or RBF. Significant differences were found, however, in para-aminohippurate clearance; and evidence of reduced ERPF in G1 as compared with G2. Higher RVR values were observed in G2. Histopathological examination showed the greater vulnerability of kidneys exposed to sevoflurane alone (G1), so that, in the final analysis, it was concluded that prior treatment with glibenclamide, in the methodological conditions of the experiment, can attenuate renal impairment acutely.

Keywords: glibenclamide; sevoflurane; renal function; renal histopathology; preconditioning; acute hemorrhage; rats.

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO.....	22
1.1 Importância clínica da pesquisa.....	22
1.2 Apresentação do problema.....	24
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	37
2.1 Resposta inflamatória.....	37
2.2 Radicais livres de oxigênio.....	37
2.3 Óxido nítrico.....	38
2.4 Transporte iônico.....	39
2.5 Pré-condicionamento isquêmico “clássico”.....	40
2.6 Pré-condicionamento anestésico (PCA).....	42
2.7 Glibenclamida.....	45
2.8 Canais de potássio dependentes de adenosina trifosfatona.....	48
3 OBJETIVO.....	52
4 MATERIAL E MÉTODO.....	54
4.1 Análise histológica.....	58
4.2 Equipamento laboratorial.....	59
4.3 Fórmulas utilizadas.....	61
4.4 Métodos estatísticos.....	62
5 RESULTADOS.....	65
6 DISCUSSÃO.....	82
6.1 Modelo experimental.....	82
6.2 População da amostra.....	83
6.3 Ventilação espontânea.....	83
6.4 Glibenclamida e hipoglicemia.....	84
6.5 Temperatura.....	85
6.6 Hematócrito.....	85
6.7 Pressão arterial média.....	86
6.8 <i>Clearance</i> de PAH.....	89
6.9 <i>Clearance</i> de IOT.....	90
6.10 Fração de filtração.....	91
6.11 Fluxo sanguíneo renal.....	91
6.12 Resistência vascular renal.....	92
6.13 Análise histológica.....	94
6.14 Análise global dos resultados do experimento.....	98
7 CONCLUSÃO.....	105
8 REFERÊNCIAS.....	107
9 APÊNDICE.....	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Média do peso (g) dos animais em cada grupo.....	65
Figura 2	Médias dos valores da temperatura retal (°C) em cada momento nos dois grupos experimentais.....	66
Figura 3	Média dos valores da pressão arterial média (mmHg) observados em cada momento nos dois grupos experimentais.....	67
Figura 4	Médias dos valores de hematócrito (%) em cada momento em ambos os grupos.....	68
Figura 5	Médias dos valores do <i>clearance</i> de para-aminohipurato de sódio (mL.min ⁻¹ .g ⁻¹ .10 ³).....	69
Figura 6	Médias dos valores de <i>clearance</i> de iotalamato de sódio (mL. min ⁻¹) em cada momento nos dois grupos....	70
Figura 7	Médias dos valores da fração de filtração em cada momento nos dois grupos experimentais x 100.....	71
Figura 8	Médias dos valores do fluxo sanguíneo renal (mL.min ⁻¹ .g ⁻¹) observados em cada momento em ambos os grupos.....	72
Figura 9	Médias dos valores da resistência vascular renal (mmHg.mL ⁻¹ .min) observados em cada momento em ambos os grupos.....	73
Figura 10	Grau de dilatação tubular. Escores de dilatação tubular dos rins direito e esquerdo de cada rato em ambos os grupos.....	74
Figura 11	Grau de dilatação vascular. Escores de dilatação vascular dos rins direito e esquerdo de cada rato em ambos os grupos.....	75
Figura 12	Grau de congestão vascular. Escores de congestão vascular dos rins direito esquerdo de cada rato em ambos os grupos.....	76

Figura 13	Grau de vacuolização tubular. Escores de vacuolização tubular dos rins direito e esquerdo de cada rato em ambos os grupos.....	77
Figura 14	Grau de necrose. Escores dos rins direito (D) e esquerdo (E) de cada rato em ambos os grupos.....	78
Figura 15	Grau de regeneração tubular. Escores de regeneração tubular dos rins direito e esquerdo de cada rato em ambos os grupos.....	79
Figura 16	Análise histológica de rim de rato de G2. Área preservada. HE-40x.....	80
Figura 17	Análise histológica de rim de rato de G1. Túbulos com vacuolização citoplasmática. HE-40x.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Média e desvio padrão do peso (g) dos animais utilizados nos experimentos de ambos os grupos.....	65
Tabela 2	Temperatura retal (°C). Média e desvio padrão dos valores observados em cada momento nos dois grupos experimentais.....	66
Tabela 3	Pressão arterial média (mmHg). Média e desvio padrão dos valores observados em cada momento nos dois grupos experimentais.....	67
Tabela 4	Hematócrito (%). Média e desvio padrão dos valores observados em cada momento nos dois grupos experimentais.....	68
Tabela 5	<i>Clearance</i> de para-aminohipurato de sódio (mL.min ⁻¹ .g ⁻¹). Média e desvio padrão dos valores observados em cada momento nos dois grupos experimentais.....	69
Tabela 6	<i>Clearance</i> de iotalamato de sódio (mL. min ⁻¹). Média e desvio padrão dos valores observados em cada momento nos dois grupos experimentais.....	70
Tabela 7	Fração de filtração. Média e desvio padrão dos valores observados em cada momento nos dois grupos experimentais.....	71
Tabela 8	Fluxo sangüíneo renal (mL.min ⁻¹ .g ⁻¹). Média e desvio padrão dos valores observados em cada momento nos dois grupos experimentais.....	72
Tabela 9	Resistência vascular renal (mmHg.mL ⁻¹ .min). Média e desvio padrão dos valores observados em cada momento nos dois grupos experimentais.....	73
Tabela 10	Grau de dilatação tubular. Escores dos rins direito (D) e esquerdo (E) de cada rato em ambos os grupos.....	74
Tabela 11	Grau de dilatação vascular. Escores dos rins direito (D) e esquerdo (E) de cada rato em ambos os grupos.....	75
Tabela 12	Grau de congestão vascular. Escores dos rins direito (D) e esquerdo (E) de cada rato em ambos os grupos...	76

Tabela 13	Grau de vacuolização tubular. Escores dos rins direito (D) e esquerdo (E) de cada rato em ambos os grupos...	77
Tabela 14	Grau de necrose. Escores dos rins direito (D) e esquerdo (E) de cada rato em ambos os grupos.....	78
Tabela 15	Grau de regeneração tubular. Escores dos rins direito (D) e esquerdo (E) de cada rato em ambos os grupos...	79
Tabela 16	Resultados do exame histopatológico dos rins dos ratos de G1.....	124
Tabela 17	Resultados do exame histopatológico dos rins dos ratos de G2.....	125
Tabela 18	Peso (g) dos ratos do grupo controle (G1). Pressão arterial média (mmHg) (PAM) e temperatura retal (°C) (T) dos ratos do grupo controle nos três momentos estudados.....	126
Tabela 19	Peso (g) dos ratos do grupo glibenclamida (G2). Pressão arterial média (mmHg) (PAM) e temperatura retal (°C) (T) dos ratos do grupo glibenclamida (G2) nos três momentos estudados.....	127
Tabela 20	Valores de <i>clearance</i> de para-aminohipurato de sódio (mL. min ⁻¹ . g ⁻¹) (C _{PAH}), <i>clearance</i> de iotalamato de sódio (mL. min ⁻¹) (C _{IOT}) e fração de filtração (FF) dos ratos do grupo controle (G1) nos três momentos estudados.....	128
Tabela 21	Valores de <i>clearance</i> de para-aminohipurato de sódio (mL. min ⁻¹ . g ⁻¹) (C _{PAH}), <i>clearance</i> de iotalamato de sódio (mL. min ⁻¹) (C _{IOT}) e fração de filtração (FF) dos ratos do grupo glibenclamida (G2) nos três momentos estudados.....	129
Tabela 22	Valores de fluxo sanguíneo renal (mL. min ⁻¹ . g ⁻¹) (FSR), resistência vascular renal (mmHg. mL ⁻¹ . min) (RVR) e hematócrito (%) (Ht) dos ratos do grupo controle (G1) nos três momentos estudados.....	130
Tabela 23	Valores de fluxo sanguíneo renal (mL. min ⁻¹ . g ⁻¹) (FSR), resistência vascular renal (mmHg.mL ⁻¹ .min) (RVR) e hematócrito (%) (Ht) dos ratos do grupo glibenclamida (G2) nos três momentos estudados.....	131

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Agonistas e antagonistas dos receptores sK^+_{ATP} e mK^+_{ATP} (Hanley <i>et al.</i> , 2005) *5-HD (somente durante a isquemia - Notsu <i>et al.</i> (1992).....	43
Quadro 2	Temperatura retal. Hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários.....	66
Quadro 3	Pressão arterial média. Hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários.....	67
Quadro 4	Hematócrito. Hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários.....	68
Quadro 5	<i>Clearance</i> de para-aminohipurato de sódio. Hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários.....	69
Quadro 6	<i>Clearance</i> de iotalamato de sódio. Hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários.....	70
Quadro 7	Fração de filtração. Hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários.....	71
Quadro 8	Fluxo sangüíneo renal. Hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários.....	72
Quadro 9	Resistência vascular renal. Hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários.....	73
Quadro 10	Dilatação tubular dos rins direito e esquerdo de cada rato em ambos os grupos. Estatística e Comentário....	74
Quadro 11	Dilatação vascular dos rins direito e esquerdo de cada rato em ambos os grupos. Estatística e comentário.....	75
Quadro 12	Congestão vascular dos rins direito e esquerdo de cada rato em ambos os grupos. Estatística e comentário.....	76
Quadro 13	Vacuolização tubular dos rins direito e esquerdo de cada rato em ambos os grupos. Estatística e comentário.....	77

Quadro 14	Necrose dos rins direito e esquerdo de cada rato em ambos os grupos. Estatística e comentário.....	78
Quadro 15	Regeneração tubular dos rins direito e esquerdo de cada rato em ambos os grupos. Estatística e comentário.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt	serina-treonina proteína cinase
ATP	adenosina trifosfatona
AV	anestésicos voláteis
CaC	dissecção/canulização da artéria carótida interna
CAM	concentração alveolar mínima
CEC	circulação extracorpórea
CO₂	dióxido de carbono
COX-2	cicloxigenase-2
C_{PAH}	clearance de para-aminohipurato de sódio
Cr	creatinina
CVJI	dissecção/canulização da veia jugular interna
CysC	cistatina c
DC	débito cardíaco
DNA	ácido desóxirribonucleico
FDVE	fluorometil-2,2-difluor-1-(trifluormetil)vinil eter
FF	fração de filtração
FPRefetivo	fluxo plasmático renal efetivo
FSR	fluxo sanguíneo renal
GLIB	glibenclamida
HE	hematoxilina-eosina
HPLC	“high performance liquid chromatography”
Ht	hematócrito
ICAM-1	molécula de adesão intracelular-1
IL-1	interleucina 1
IOT	iotalamato de sódio
JAK	“janus-cinase”
K⁺_{ATP}	canal potássio dependente de adenosina trifosfatona
Kir	subunidade “inward rectifying”
MAPKS	proteína-cinase ativada por mitogênese
MCP-1	proteína quimioatrativa de monócito 1
MIP-2	proteína inflamatória macrofágica 2
mK⁺_{ATP}	canal potássio dependente de adenosina trifosfatona na mitocondria

MPAK	“mitogen-activated protein kinase”
mPTP	“mitochondrial permeability transition pore”
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo difosfato
NEH-1	sistema de troca Na ⁺ /H ⁺ tipo 1
NOS	óxido nítrico sintetase
NTA	necrose tubular aguda
ON	óxido nítrico
PAH	para-aminohipurato de sódio
PAM	pressão arterial média
PC	pré-condicionamento
PCA	pré-condicionamento anestésico
PCF	pré-condicionamento farmacológico
PCI	pré-condicionamento isquêmico
PGE2	prostaglandina tipo E2
PI3K	cinase-fosfadil-inositol-3
PKC	proteína cinase c
PL	fosfolipase
PO2	pressão parcial de oxigênio
PPR	pressão de perfusão renal
RDPG	estado renal prostaglandina-dependente
Re	resistência da arteríola eferente
RFG	rítmo de filtração glomerular
RISK	“reperfusion induced salvage kinases”
RL	solução de Ringer com lactato
RLO	radicais livres de oxigênio
sK⁺_{ATP}	canal potássio dependente de adenosina trifosfato no sarcolema
STAT-3	“signal transducer and activator of transcription-3”
SUR	receptor de sulfoniluréia
SWOP	“second window of protection”
Tr	temperatura retal
TK	tirosina cinase
TNF	fator de necrose tumoral
VPPI	ventilação com pressão positiva intermitente

I INTRODUÇÃO

1.1 Importância clínica da pesquisa

A ocorrência de disfunção renal, em estágios de menor ou maior gravidade, impacta, sobretudo, nos resultados do tratamento cirúrgico de pacientes com risco mais elevado submetidos a procedimentos mais complexos. Conforme a população estudada e critérios utilizados para defini-la, a insuficiência renal aguda (IRA) cursa entre 1 e 25% de pacientes internados em unidades de cuidados intensivos (Chertow *et al.*, 1998). Herrera-Gutierrez *et al.* (2006) coordenaram estudo multicêntrico realizado em 43 unidades intensivas na Espanha durante 8 meses e consideraram pacientes em IRA aqueles cuja creatinina sérica apresentava valores iguais ou superiores a 2 mg.dL⁻¹ ou diurese nas 24 horas abaixo de 400 mL. Registraram incidência de 5,7% (n= 901) de IRA, sendo que 38,4% dos casos, por necrose tubular aguda, 36,6%, por comprometimento pré-renal e 21,2%, por ambas as causas. A mortalidade observada em pacientes na vigência de IRA foi de 42,3%, com risco independente acrescido (*odds rate*=2,06) para pacientes diabéticos. Uchino *et al.* (2005) realizaram estudo multicêntrico-multinacional em 23 diferentes países e 54 hospitais entre setembro de 2000 e dezembro de 2001. Cerca de 1740 pacientes, dos 29269 (5,7%) com internações em unidades intensivas neste período, apresentaram disfunção renal. A mortalidade, neste estudo, chegou a 60,3% dos pacientes. A alta mortalidade determina a importância que deve ser dispensada às medidas preventivas, devendo-se nelas incluir o cuidado redobrado com medicações nefrotóxicas, especialmente de uso contínuo e em pacientes de maior risco.

A proteção de órgãos faz-se presente na prática clínica diária da medicina hodierna, e especialmente em anestesiologia, devido à crescente complexidade dos procedimentos cirúrgicos e “invasivos”. O prolongamento da fronteira etária da população atendida também enseja o pensar na proteção orgânica. Nesse sentido, faz-se necessária a compreensão, cada vez maior, de seus mecanismos intrínsecos, de tal modo que medidas preventivas eficazes, tanto na redução da morbidade, quanto da mortalidade, per e pós-operatórias, possam ser implementadas pelo anestesiológico. A falência renal não interessa tão-somente à própria função renal comprometida, mas também às complicações a ela associadas, tais como sepse, lesões neurológicas, hemorragia gastrintestinal, etc.

O avanço tecnológico observado no campo de pesquisa da biologia celular e molecular durante as duas últimas décadas permitiu o estudo mais aprofundado de muitos fenômenos fisiopatológicos, dentre eles destacando-se aspectos relacionados à morte celular e a mecanismos endógenos de autoproteção. Também a farmacologia experimentou salto qualitativo por igual motivo; a farmacodinâmica, em especial, cresce vigorosamente com os detalhes possíveis da biologia molecular e da genética. Doutro modo, a pesquisa clínica, em animais ou no homem, permite que os indícios observados na bancada do laboratório possam ser confirmados, ou não.

1.2 Apresentação do problema

Isquemia tecidual, isto é, comprometimento do aporte sanguíneo arterial a determinado órgão, conduzirá à lesão celular, e infarto, principalmente em função do tempo de isquemia e do metabolismo energético do órgão acometido. Intuitivamente, a reperfusão imediata traria o pronto restabelecimento das funções teciduais, entretanto a fisiopatologia não obedece, muitas vezes, ao raciocínio lógico, e, paradoxalmente, poderá vir a ser este o momento de maior agravamento dos processos biológicos determinantes do dano tecidual (Menger *et al.*,1992; Kerrigan *et al.*,1993). Conferiu-se o termo “lesão por isquemia-reperfusão”, a este fenômeno, por denotar a incapacidade de se diferenciar, clinicamente, uma da outra, muito embora diferenças importantes entre elas existam; a reperfusão tecidual faz-se necessária à apoptose celular por prover o substrato energético (ATP) fundamental a esse peculiar processo de morte celular – o que não ocorre com a necrose celular estabelecida em processo isquêmico prolongado, ou definitivo.

A lesão por isquemia-reperfusão no rim também determina uma síndrome complexa que envolve diversos mecanismos celulares e moleculares que poderão desencadear distúrbios funcionais e estruturais, tais como vasoconstrição renal, dano tubular e lesão glomerular. Dentre os possíveis mecanismos, a liberação de radicais livres de oxigênio pelo endotélio vascular, assim como mecanismos inflamatórios de recrutamento e ativação de

neutrófilos, e edema (Garcia-Dorado *et al.*, 1992), também parecem estar envolvidos.

O preceito de que nenhum benefício orgânico poderia vir a ocorrer como conseqüência do processo isquemia-reperfusão propriamente dito foi desconstruído, cientificamente, a partir do pioneiro estudo experimental realizado por Murry *et al.* (1986). Puderam, naquela ocasião, observar menor área de infarto do miocárdio em cães que sofreram, como intervenção, quatro breves períodos de interrupção (5 min de isquemia com 5 min de intervalo entre eles) do fluxo coronariano, aplicados imediatamente antes de períodos mais prolongados (40 min). Empiricamente comprovaram a existência de mecanismos de adaptação endógena à isquemia. Desde então, o termo “pré-condicionamento” (PC) vem sendo empregado para designar o efeito benéfico que determinado estresse físico (pré-condicionamento isquêmico - PCI) ou agente farmacológico (PCF), previamente infligido ao órgão alvo, pode proporcionar-lhe em decorrência da maior tolerância adquirida a estímulos posteriores, mais duradouros e intensos. Gho *et al.* (1996) sugeriram, após pesquisas em rim e intestino de ratos, a existência de PC remoto (miocárdio), i.e., em decorrência de ativação neurogênica (cardioproteção suscetível a bloqueio ganglionar) e hormonal, mas ainda por vias muito pouco esclarecidas.

O fenômeno pré-condicionamento já possui grande número de pesquisas realizadas – cerca de cinco mil artigos publicados no PubMed até fevereiro de 2006 (Opie, 2006); em dezembro de 2006, no mesmo PubMed, já foram encontradas mais 1000 novas pesquisas com o termo “preconditioning”, o que denota a importância cada vez maior do tema (De Hert, 2004). O intuito

de muitas destas pesquisas é poder desvendar seus mecanismos celulares e moleculares, porém, até o momento, o mecanismo específico da proteção permanece desconhecido – tampouco faz parte do escopo desta pesquisa. Por outro lado, muitos destes trabalhos contribuíram para elucidar algumas das vias que conduzem o sinal extracelular iniciado pelo estímulo pré-condicionante (adenosina, bradicinina, opióides, noradrenalina, anestésicos voláteis, etc.) até o sítio de ação intracelular. Em relação à ocorrência de pré-condicionamento no rim, muito já tem sido pesquisado, pouco, porém, comparativamente ao pré-condicionamento cardíaco. A literatura já acumulada sobre o tema sustenta a propriedade do fenômeno também no tecido renal, até mesmo porque, em animais, a proteção oferecida por intervenções pré-condicionantes é maior do que aquela obtida com quaisquer outros agentes farmacológicos (Bonventre, 2002).

O termo “pré-condicionamento anestésico” (PCA) vem sendo utilizado para designar a ação protetora de que se beneficia um determinado órgão, em regime de isquemia-reperusão, quando exposto a anestésicos voláteis. PCA foi primeiramente estudado em corações de coelhos, por Haessler *et al.* (1994), e confirmado por Schlack *et al.* (1996) em preparações de coração isolado de ratos. Em princípio, a proteção conferida pelo PC diferencia-se de possíveis benefícios provenientes, exclusivamente, de suas propriedades hemodinâmicas, isto é, do equilíbrio entre oferta e demanda de substrato celular (Bland & Loweinstein, 1976; Buljubasic *et al.*,1992). Os anestésicos voláteis possuem, portanto, propriedades específicas que interferem na condução e desencadeamento dos fenômenos biológicos durante

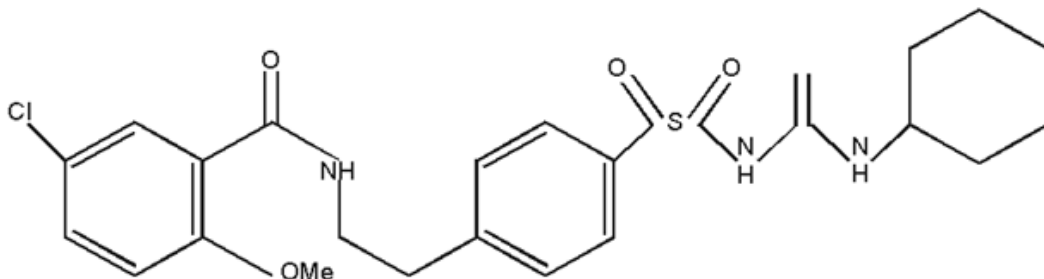
a reperfusão, de tal modo que podem alterar o curso dos processos fisiopatológicos e permitir a redução dos danos teciduais decorrentes da lesão por isquemia-reperfusão (Preckel *et al.*, 1999).

A partir da confirmação científica laboratorial do PCA, o paradigma que norteava as pesquisas em anestesiologia, especialmente em anestesia inalatória, sofreu importante mudança. Até o início dos anos 1990 pensava-se no desenvolvimento de anestésicos mais seguros, de fácil manuseio e armazenamento, com início de ação e despertar mais rápidos, fatores que favoreciam o maior desenvolvimento da cirurgia ambulatorial. O aumento da competitividade no mundo globalizado também havia direcionado a gestão dos recursos para uma relação custo-benefício mais favorável economicamente. Anestésicos voláteis com propriedades farmacológicas direcionadas a esse perfil da prática anestésica foram desenvolvidos e comercializados. A grande aceitação clínica de anestésicos como o isoflurano, o sevoflurano e o desflurano, por suas características, segurança e conforto de administração, não favorecia maiores investimentos no setor¹. Entretanto, com as evidências laboratoriais do PCA, descortinou-se um novo campo de estudo e pesquisa. A complexidade da lesão isquemia-reperfusão, com o envolvimento de diversos tipos celulares, mediadores e agentes sinalizadores, não mutuamente exclusivos e emergindo em diversos momentos do evento, dificulta substanciar-se as evidências laboratoriais em medidas terapêuticas possíveis. Considerando estas dificuldades, Vinten-Johansen *et al.* (2005)

¹ Charley H. Mcleskey, Abbott Laboratories. Comunicação Pessoal em palestra sobre História do Sevoflurano – São Paulo, março/2006.

discutem, à luz de novas constatações científicas, novas possibilidades terapêuticas, como o pós-condicionamento, ou seja, o controle da reperfusão em função de maior proteção orgânica posterior ao insulto isquêmico letal. De Hert *et al.* (2004), em estudo clínico, testaram propofol e sevoflurano em quatro grupos de pacientes (n=50) submetidos à revascularização do miocárdio em diversos esquemas (GI = somente propofol, GII = propofol substituído por sevoflurano após esternotomia até início da CEC, GIII = propofol substituído por sevoflurano após término das anastomoses e GIV = propofol até esternotomia, e substituído por sevoflurano até o final), e acompanharam valores de troponina I por 48 h e função cardíaca por 24 h no pós-operatório. Analisando os resultados, observaram que as concentrações pós-operatórias de troponina I foram menores em GIV do que nos outros grupos e, ainda, o tempo de permanência do paciente na unidade de terapia intensiva pós-operatória foi significativamente maior em GI. Dentre suas conclusões, expressam a importância do uso continuado do sevoflurano durante todo o procedimento para que os seus efeitos cardioprotetores possam ser clinicamente considerados. Diversos pesquisadores (Scognamiglio *et al.*, 2002; Julier *et al.*, 2003) vêm apresentando outros estudos clínicos na tentativa de corroborar as inferências científicas laboratoriais. Todavia, o real impacto que a aplicação clínica dessas evidências irá determinar na morbi-mortalidade necessitará de estudos clínicos muito bem desenhados (“trials” multicêntricos com elevado número de pacientes e variáveis bem controladas e metanálises), e de difícil elaboração, uma vez que as variáveis se avolumam no dia-a-dia da prática cirúrgica.

As sulfoniluréias têm sido muito utilizadas no tratamento do diabetes tipo II, devido, principalmente, à simplicidade de administração em dose única diária por via oral e eficácia comprovada em paciente com diagnóstico recente. Em recente editorial, Riddle (2003) apresenta ao debate científico a pertinência da continuidade do uso clínico da glibenclamida (Fórmula 1), sulfoniluréia das mais utilizadas clinicamente, mas que, desde 1970, quando foi apresentado estudo do “University Group Diabetes Program” – UGDP (Meinert *et al.*, 1970), recebe críticas contumazes por seus efeitos prejudiciais ao sistema cardiovascular. Seus argumentos, atualmente, encontram maior fundamento científico devido aos conhecimentos adquiridos com os estudos sobre pré-condicionamento (Cleveland *et al.*, 1997).

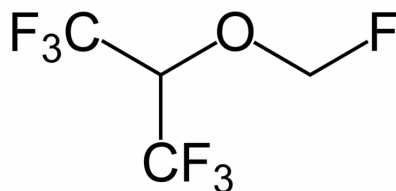


Fórmula 1 – Fórmula química da glibenclamida: cloroN[2[4 (ciclohexilcarbamoilsulfamoil) fenil]etil]-2-metoxi-benzamida.

Inicialmente Liu *et al.* (1991) identificaram a adenosina nucleotida endógena, com ação estimulante em receptor A_1 , como substância essencial ao PCI. O'Rourke (2000) sugeriu que os canais de K^+_{ATP} possuíam papel

relevante na farmacodinâmica das sulfoniluréias. Inicialmente descritos na membrana celular dos miócitos ventriculares, os canais de K^+_{ATP} também foram identificados em células do epitélio renal. Agentes farmacológicos que abrem esses canais parecem possuir efeitos protetores similares ao do PC isquêmico. De outro modo, substâncias como as sulfoniluréias, que determinam seu fechamento, se oporiam ao benefício do PC. Da Silva-Santos *et al.* (2002) demonstraram possível relação entre a ação da glibenclamida nos canais K_{ATP} e os efeitos inflamatórios e, posteriormente, Pompermayer *et al.* (2005) relataram a melhora da disfunção renal após a utilização da glibenclamida em ratos. Rahgozar *et al.* (2003), entretanto, em preparação de rim isolado de rato, utilizando diazóxido e glibenclamida, constataram lesão renal de alça ascendente e diminuição da resistência vascular renal após a isquemia.

O sevoflurano ($CH_2F-O-CH(CF_3)_2$; fluorometil 2,2,2-trifluoro-1-[trifluorometil] etil éter) (Fórmula 2) é um agente anestésico inalatório halogenado, que contém flúor em sua estrutura química, e apresenta, como característica principal, baixa solubilidade sangüínea.



Fórmula 2 – Fórmula química do sevoflurano: fluorometil 2,2,2-trifluoro-1-[trifluorometil] etil éter.

Durante seu metabolismo, sofre biotransformação no sistema enzimático hepático oxidativo e utiliza-se do citocromo P450 2E1 para a peroxidação lipídica, um dos possíveis mecanismos de toxicidade hepática e renal. Semelhante ao do enflurano e metoxiflurano, o metabolismo do sevoflurano resulta no aumento da concentração plasmática de flúor inorgânico, sem, entretanto, as conseqüências danosas do metoxiflurano. Por outro lado, a degradação do sevoflurano, na presença de absorvedor de CO₂, contribui para a formação de um haloalqueno, o fluorometil-2,2-diflúor-1-(trifluormetil)vinil eter (FDVE), também denominado “Composto A”. O FDVE desencadeia nefrotoxicidade em ratos por mecanismo ainda não completamente esclarecido, porém Kharasch *et al.* (2006) analisaram o perfil genético de ratos Fischer 344 e observaram a maior expressão de genes no grupo cujos animais eram previamente expostos ao FDVE. O perfil dos genes comprometidos incluiu aqueles ligados à apoptose celular, estresse oxidativo e resposta inflamatória, relacionados ao aumento de substâncias nefrotóxicas, como osteopontina, fator inibidor de metaloproteinase 1 e receptor 12 de TNF. Foi exatamente esse perfil de agressão renal específica, em ratos, o fator decisivo para a escolha da espécie animal utilizada no desenvolvimento deste estudo. Seria o pré-condicionamento isquêmico clássico, induzido por hipovolemia, comprometido em anestesia com sevoflurano, ainda que em curto intervalo de tempo? E o efeito de PCA?

Choque hipovolêmico conseqüente à hemorragia aguda per-operatória constitui ocorrência freqüente, sobretudo em situações de emergência. Como respostas compensatórias, o organismo utiliza diversos

mecanismos fisiológicos, na intenção de proteger órgãos vitais, como cérebro e coração (Erni *et al.*, 1995). Apesar de seu importantíssimo papel na economia orgânica, o rim permite-se, nesses momentos de estresse maior, a redução de seu aporte sanguíneo – vindo, possivelmente, a comprometer seriamente seu próprio desempenho em função da sobrevivência daqueles órgãos, sobretudo, vitais. Em situações de hipovolemia aguda com conseqüente síndrome pré-renal, observa-se, usualmente, que, mesmo após o pronto restabelecimento da hemodinâmica renal, há diminuição do ritmo de filtração glomerular a valores cerca de 10% menores que aqueles observados antes da instalação da hipovolemia.

Dentre os mecanismos compensatórios da hipovolemia, destacam-se os sistemas renina-angiotensina e simpático renal, responsáveis por hormônios e neurotransmissores que determinarão vasoconstrição. Ocorre, ao rim, possuir também seus próprios mecanismos protetores e, dentre eles, encontram-se as prostaglandinas que atuam modulando efeitos vasoconstritores da angiotensina II e noradrenalina (Dunn & Zambraski, 1980). Torna-se, desse modo, a função renal primária, dependente dessas substâncias (Colletti *et al.*, 1999), as quais permitirão a manutenção do ritmo de filtração glomerular e do fluxo sanguíneo renal condizentes com função renal satisfatória à homeostase orgânica. Denomina-se essa condição de “estado renal prostaglandina-dependente” (RPGD), característica renal dos estados hipotensivos.

Murphy *et al.* (1995) testaram inibidores da lipoxigenase, como a indometacina, em preparações de corações de ratos, e observaram bloqueio

do PCI, o que confirmou a hipótese do envolvimento da fosfolipase A₂ no processo. Posteriormente, Gres *et al.* (2002) verificaram, em porcos, que o benefício adquirido com intensidades diferentes do estímulo pré-condicionante (10 min e 3 min de isquemia) – redução da área de infarto do miocárdio – era bloqueado com a indometacina tão-somente nos porcos que sofreram PC menos vigoroso (3 min). Concluem que outros “gatilhos”/mediadores, de maior intensidade, podem sobrepujar os efeitos inibitórios da indometacina, isto é, as prostaglandinas estão envolvidas no processo, mas muito ainda precisa ser pesquisado para que se possa compreender seu real mecanismo e importância no PC. O presente estudo recorre ao RPGD como possível colaborador do processo pré-condicionante.

Alterações da função renal devem-se, freqüentemente, mais ao somatório de diversos pequenos insultos ao órgão, do que à ação de um único agente agressor. Do mesmo modo, quaisquer medidas preventivas que possam somar-se, e em seu conjunto propiciar um *milieu* “protegido”, devem ser estimuladas, e pesquisadas.

Em revisão sobre a evolução histórica de mecanismos de proteção renal, Bonventre (2002) inicia seu artigo citando estudo publicado em 1912 que demonstra a regeneração epitelial dos túbulos contornados proximais após exposição prévia do rim ao urânio; e discorre sobre o assunto com a apresentação resumida de diversos outros importantes estudos que contribuíram de alguma forma para o conhecimento atual da proteção renal. Ao final deste pequeno histórico, faz os seguintes comentários:

“Assim, permanece controverso em que condições o pré-condicionamento ocorre no rim em resposta à isquemia. Mais, ainda, esses experimentos limitam-se ao estudo [de evidências de pré-condicionamento] em intervalos de tempo relativamente curtos entre o protocolo pré-condicionante e o período de isquemia prolongada [utilizada como teste]”.

O conhecimento já adquirido sobre o tema, pré-condicionamento, enseja maior ousadia nos desenhos das investigações experimentais, pois a conjunção de diversos fatores de estresse, em um mesmo experimento, pode contribuir para a elucidação desse mecanismo tão importante de adaptação endógena (Watanabe *et al.*, 2006). No entanto, o presente estudo pretendeu apenas observar possíveis alterações da função e histologia renais considerando processos bem determinados de agressão orgânica, tais como hipovolemia e perfil genético desfavorável ao sevoflurano (Kharasch *et al.*, 2006), e verificar qual o efeito do pré-tratamento com glibenclamida. Não se trata, portanto, de um novo modelo de estudo de pré-condicionamento isquêmico, ou farmacológico, como muitos há – e ainda em discussão (Bonventre, 2002; Lee *et al.*, 2004; Hashiguchi *et al.*, 2005; Lee, 2006) pois a incipiência do tema assim o determina.

Como fator de intervenção no experimento, a glibenclamida, em decorrência de suas propriedades farmacológicas, apresenta-se, em princípio, como fator inibidor dos processos pré-condicionantes. As outras variáveis – hipovolemia e anestesia com sevoflurano – possuem critérios ambíguos no experimento (agressão e condições pré-condicionantes – isquêmica e

farmacológica) que, além de o fortalecerem com um cenário de estresse muito próximo da realidade do anestesiológista, podem, também, colaborar para o silogismo tão caro ao método científico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Resposta inflamatória

Resposta inflamatória local, decorrente da interação entre neutrófilos e células endoteliais durante a reperfusão, aumenta radicais livres de oxigênio que desempenham relevante função apoptótica (Dragun *et al.*, 1998). Citocinas são liberadas dos órgãos lesados e estimulam moléculas de adesão, como, por exemplo, a molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1), e quimiocinas, como a proteína inflamatória macrofágica 2 (MIP-2) e a proteína quimioatrativa de monócito 1 (MCP-1). As citocinas TNF- α e IL-1 parecem ter importante ação na isquemia-reperfusão renais (Haq *et al.*, 1998). Mecanismo de “upregulation” da expressão da síntese de TNF- α facilita a expressão de genes importantes na atividade pró-inflamatória e determina uma reação escalonada até a apoptose celular, com conseqüente disfunção orgânica grave (Meldrum *et al.*, 1999). De outro modo, estímulos de receptores de membrana acoplados a proteínas G despertam mecanismos que conduzem à hipertrofia e proliferação celular. Estes achados sugerem que os radicais livres de oxigênio possuem ação central no controle entre vida e morte celular.

2.2 Radicais livres de oxigênio

Radicais livres de oxigênio (RLO) são moléculas que apresentam elétrons não-pareados ligados à última camada de O₂. São extremamente reativos com diversos substratos orgânicos, tais como aminoácidos, fosfolipídeos e ácido desoxirribonucléico (McCord, 1985). Durante isquemia-

reperfusão, os RLO provenientes da cadeia de elétrons mitocondriais, ou da xantina oxidase, podem induzir peroxidação lipídica de membranas (mitocôndria e retículo sarcoplasmático) dos miócitos (Hess *et al.*, 1984), vindo a comprometer o endotélio vascular, principalmente na produção de adenosina e óxido nítrico (Gunther *et al.*, 1991). Outras fontes de radicais livres incluem a oxidação de catecolaminas e o metabolismo do ácido aracdônico. Neutrófilos ativados geram radicais livres de oxigênio via NADPH oxidase e desempenham papel relevante na fisiopatologia da circulação extracorpórea, por exemplo (Vinten-Johansen *et al.*, 2005). Durante episódios isquêmicos, o comprometimento celular torna-se ainda mais grave devido à exaustão de substâncias antioxidantes, como glutatião, catalases e superóxido-dismutase (Guarnieri *et al.*, 1980).

2.3 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) exerce importante ação regulatória na fisiologia renal, podendo influir no ritmo de filtração glomerular, transporte tubular e secreção de renina. Qualquer uma das três isoformas do óxido nítrico sintetase (NOS) expressa-se constitutivamente no rim (neuronal - nNOS, induzível - iNOS e endotelial - eNOS). A presença de óxido nítrico não se restringe tão-somente ao endotélio vascular renal, mas ocorre também na mácula densa e nas células mesangiais e tubulares. Sua ação, portanto, não é uniforme e varia conforme a tensão tecidual de oxigênio, a osmolaridade, o pH e a concentração de íons cálcio observada no tecido renal específico (Beltowski *et al.*, 2003).

Doutro modo, a expressão enzimática (NOS) também é modulada por vias sinalizadoras (transcrição genética) da inflamação, tais como o fator nuclear kappa ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) e a proteína-cinase ativada por mitogênese (MAPKS) – mecanismos com lugar reservado, principalmente, na fase mais tardia do pré-condicionamento (“SWOP”).

2.4 Transporte iônico

O acúmulo de (H^+) durante a isquemia estimula o sistema de troca Na^+/H^+ do tipo 1 (NHE-1) que expulsa o H^+ da célula, mas favorece o acúmulo de Na^+ . Este acúmulo de Na^+ no intracelular poderá, por sua vez, favorecer o acúmulo de Ca^{++} devido à disfunção da bomba $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ (Allen & Xiao, 2003). Nakagawara *et al.* (1986), há duas décadas, demonstraram propriedade inibitória do halotano e enflurano, de modo dose-dependente, sobre a mobilização do Ca^{++} em neutrófilos e sua correlação com o aumento de radicais livres de oxigênio. O íon Ca^{++} atua como segundo mensageiro na ativação da NADPH oxidase, fonte de radicais livres de oxigênio. Fröhlich *et al.* (1998) relataram que a ativação direta da proteína cinase C (PKC) resultava na geração de radicais livres de oxigênio, e que esse processo não era modificado com a exposição a anestésicos voláteis. Neste mesmo ano, entretanto, Rehring *et al.* (1998), ao estudarem o pH em preparações de corações isolados de ratos após estímulo de PCI, observaram diminuição da acidose, possivelmente dependente de PKC e troca de Na^+/H^+ .

2.5 Pré-condicionamento isquêmico – “clássico”

A fase inicial do PC, ou “clássica”, permanece por cerca de duas horas após o evento pré-condicionante, porém esse primeiro estímulo irá determinar uma nova fase do PC que pode permanecer por até 72 h e denomina-se “second window of protection - SWOP”. Nessa fase, o processo determinará resposta genômica e síntese protéica específica (Sergeev *et al.*, 2004).

Inicialmente, o PC isquêmico (PCI) do miocárdio foi o mais estudado, entretanto logo surgiram evidências de que diversos outros órgãos também seriam suscetíveis a mecanismo protetor semelhante, tais como sistema nervoso central (Matsuyama *et al.*, 1997), musculatura esquelética (Pang *et al.*, 1997), pulmões (Du *et al.*, 1996), fígado (Kume *et al.*, 1996) e intestino (Hotter *et al.*, 1996).

Em condições de estresse e concentração de Ca^{++} aumentada, poros não-específicos, com permeabilidade transitória da mitocôndria (“mitochondrial permeability transition pore” – mPTP), localizados na parte interior da membrana mitocondrial, tornam-se, na reperfusão, permeáveis a proteínas que usualmente não chegam ao interior da mitocôndria, determinando edema mitocondrial, disfunção da cadeia de elétrons e, como consequência, inibição da fosforilação oxidativa. Baines *et al.*, (2003) admitem que estes poros poderiam ser um dos possíveis alvos das vias sinalizadoras. Muitas destas vias envolvem proteínas cinases C (PKC) que compõem o sistema RISK (“reperfusion induced salvage kinases”). São onze as isoformas

conhecidas (Hausenloy & Yellon, 2006), que podem ser ativadas, em sua maioria, por Ca^{++} ou lipídios (diacilglicerol, fosfatidilserina). A importância de cada uma das isoformas, como agentes mediadores, ainda gera controvérsias sobre sua ação como mediador, ocorrendo, também, variações entre as espécies e órgãos pesquisados. Outras proteínas cinases, como a G e A, também estão relacionadas ao processo de PC. Tirosina-cinases também fazem contribuições ao PC de duas maneiras: como receptor de membrana com ação de “gatilho” ativador de proteínas cinases C, ou como receptor no citosol, atuando como mediador paralelo à PKC. Estes receptores de tirosina parecem estimular proteínas cinases ativadas por mitogênese (“mitogen-activated protein kinase” – MPAK), que possuem diversas funções celulares, dentre elas a de sinalização intracelular (Erk1/2, p38, JNK, BMK1, são exemplos de MPAK). Também a cinase-fosfadil-inositol-3 (PI_3K), estimulada por hormônio do crescimento e outros fatores, pode ativar vias sinalizadoras do PC, principalmente a proteína serina-treonina cinase, denominada Akt, associada ao crescimento e sobrevivência celular. Tong *et al.* (2000) demonstraram a ativação da cascata de PI_3K -Akt em protocolo de PC, entretanto Tsang *et al.* (2005) estudaram corações de ratos diabéticos e observaram que este mecanismo encontra-se deprimido. Outros mecanismos podem estar envolvidos, como o STAT-3 (“signal transducer and activator of transcription-3”), relacionado principalmente com SWOP e estímulo por $\text{TNF-}\alpha$ (Lecour *et al.*, 2005). Esta via pode ser ativada pela janus-cinase (JAK) em uma cascata que conduz o sinal pré-condicionante até o núcleo celular e a expressão genética é então modulada. É interessante que, no SWOP, esse

sistema promove a estimulação do tipo “gatilho” (“upstream”) de óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e cicloxigenase-2 (COX-2), conhecidos mediadores e efetores de proteção (Xuan *et al.*, 2001; Xuan *et al.*, 2003).

2.6 Pré-condicionamento anestésico (PCA)

Diversos mecanismos puderam ser delineados a partir da pesquisa em cardiomiócitos, como, por exemplo, a ação do halotano em receptores rianodina do retículo sarcoplasmático, regulando o Ca^{++} intracelular, e nas proteínas contráteis (Lochner *et al.*, 1994; Siegmund *et al.*, 1997). Kowalski *et al.* (1997) utilizaram preparações de coração isolado de cobaias (“Langendorff”) submetidos à isquemia global e verificaram os efeitos da exposição ao halotano, isoflurano e sevoflurano, na adesão de neutrófilos à circulação coronariana. Constataram que houve redução na adesão dos neutrófilos durante a isquemia.

Zaugg *et al* (2002) utilizaram, também em cardiomiócitos, técnica de microscopia e autofluorescência em modelo simulado de isquemia celular. Foram adicionados à preparação diversos agentes bloqueadores, e estimuladores, de receptores de membrana sarcoplasmática e mitocondrial, além de moduladores de vias sinalizadoras. Concluíram que os anestésicos voláteis poderiam agir seletivamente em canais mitocondriais de K_{ATP} após estimulação de proteína cinase C por diversas vias sinalizadoras (Esquema 1). Esta conclusão, entretanto, ainda pode ser questionada quando se analisa o estudo de Notsu *et al.* (1992), realizado em cardiomiócitos submetidos à

redução de ATP intracelular, e verifica-se ação bloqueadora de ambos os canais K^+_{ATP} (Quadro 1).

Quadro 1 - Agonistas e antagonistas dos receptores sK^+_{ATP} e mK^+_{ATP} (Hanley *et al.*, 2005) *5-HD (somente durante a isquemia - Notsu *et al.* (1992)

Canais	Agonistas	Antagonistas
sK^+_{ATP} e mK^+_{ATP}	Pinacidil, cromakalim, P1060, P1075, BMS-191095, minoxidil, KRN239, sildenafil, desflurano, isoflurano, sevoflurano, aprikalim e levosimendan	5-hidroxicanoato* glibenclamida glipizide repaglinida
mK^+_{ATP}	diazóxido e nicorandil	5-hidroxicanoato
sK^+_{ATP}	P-1075 MCC-134	HMR1098 glimepiride

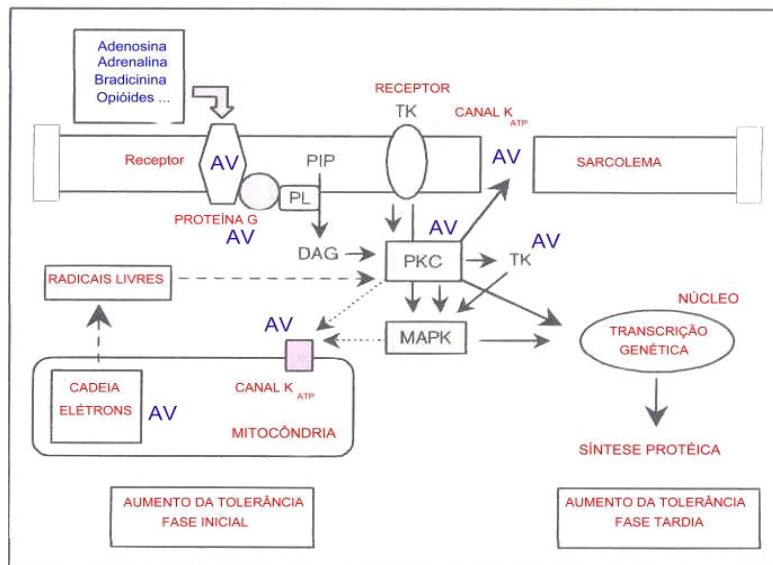
Mecanismo protetor intrínseco dos anestésicos voláteis, possivelmente relacionado à geração de radicais livres de oxigênio (RLO), também foi observado por Kevin *et al.* (2003) e Nakamura *et al.* (1999). Novalija *et al.* (2003) evidenciaram que a produção de RLO na cadeia de elétrons durante a reperfusão pós-isquêmica foi atenuada, entretanto ainda não é possível afirmar se tal fenômeno ocorreu tão-somente por PCA, ou por uma ação antioxidante própria dos anestésicos voláteis no tecido. Essa ação antioxidante, entretanto, não parece provável, pois, em preparações isoladas de corações, houve geração de RLO (Tanaka *et al.*, 2002). Stowe *et al.* (2004) sugerem que os RLO seriam o “gatilho” da cascata de sinalização para a cardioproteção, por isso, então, a importância de sua geração. A relação entre anestésicos voláteis e RLO parece possuir duplo mecanismo, os mecanismos

sendo antagônicos entre si, que merecem ser mais estudados.

Sergeev *et al.* (2004) realizaram estudo comparativo entre PCI e PCA e observaram a transcrição genética em preparações “Langendorff” de corações de ratos Wistar expostos ao isoflurano. Esta alta tecnologia permitiu o delineamento da expressão genética em ambos os processos de PC e demonstrou que há muita similitude entre eles, principalmente em genes ligados às defesas celulares. Entretanto, a expressão de muitos outros genes (protetores, ou não) era regulada diferentemente.

Experimentos realizados em coelhos e apresentados por Müllenhein *et al.* (2003) demonstraram que benefícios de PCA podem ser aditivos aos benefícios obtidos com o pré-condicionamento isquêmico. Toller *et al.* (1999) demonstraram que o sevoflurano, quando administrado continuamente antes de isquemia coronariana, em cães, determinava redução da área de infarto. Além do sevoflurano, tem sido atribuída à administração de isoflurano (Cason *et al.*, 1997), enflurano (Freedman *et al.*, 1985) e halotano (Cope *et al.*, 1997), prévia aos eventos isquêmicos, redução de lesão miocárdica subsequente. A utilização prévia de isoflurano, em cães, demonstrou proteção semelhante ao pré-condicionamento isquêmico, via ativação dos canais de K_{ATP} (Kersten *et al.*, 1996). Toma *et al.* (2004), em experimentos em coração de ratos vivos anestesiados com desflurano, observaram sinalização extracelular e ativação de proteína cinase C epsilon, sugerindo pré-condicionamento com este anestésico. Weber *et al.* (2005a), em experimento que utilizou ratos anestesiados com Xenônio, tiveram, em seus resultados, atributos sugestivos de PC cardíaco, entretanto, em outro estudo, Weber *et al.* (2005b) realizaram

oclusão coronariana em ratos anestesiados com óxido nitroso e avaliaram a área de infarto. Neste experimento não constataram efeito pré-condicionante com o uso de óxido nitroso isolado, contudo não foi observada a inativação do PC obtido com o isoflurano em uso concomitante.



Esquema 1 - Possíveis locais de ação dos anestésicos voláteis.

AV - anestésicos voláteis; TK - tirosina cinase; PKC - proteína cinase C; MAPK - "mitogen-activated protein kinase"; PL – fosfolipase (Adaptado de: De Hert SG. *Curr Opin Anaesthesiol* 2004;17:59)

2.7 Glibenclamida

Meinert *et al.* (1970) alertaram sobre possíveis complicações cardiovasculares relacionadas à glibenclamida, inclusive maior mortalidade com seu uso contínuo e prolongado em pacientes diabéticos.

Dentre seus efeitos farmacológicos, a supressão da migração de neutrófilos e a quimiotaxia foram observadas por Krause *et al.*, 1990. Novalija

et al. (1999) estudaram o comportamento da função ventricular e do fluxo coronariano em preparações que utilizaram corações isolados de cobaias e puderam observar que tanto no grupo tratado com sevoflurano a 3,5%, quanto naquele com aplicação exclusiva de isquemia intermitente (dois períodos de 2 min) houve boa recuperação de função (45 e 42%, respectivamente) e fluxo (77 e 76%, respectivamente). No grupo com glibenclamida não houve recuperação satisfatória (apenas 20-24% da função, e 65-64% do fluxo, com sevoflurano e isquemia, respectivamente). Coetzee *et al.* (2000) também observaram boa recuperação funcional em preparações com corações de ratos perfundidos com sevoflurano, antes e depois da administração de solução cardioplégica, quando se comparou ao uso de glibenclamida.

Com o surgimento das técnicas de clonagem molecular foram possíveis estudos do tipo “unicanal”, fato que permitiu maiores avanços na pesquisa da estrutura e função dos canais de superfície da membrana celular. Em relação ao canal K^+_{ATP} no sarcolema (sK^+_{ATP}), foi possível a identificação de duas famílias de subunidades: a Kir6.x (“inward rectifying”), que forma o poro condutor propriamente dito, e a SUR (receptor de sulfoniluréia), com caráter modulatório e utilizado farmacologicamente. A combinação entre os diversos tipos de ambas as subunidades irá determinar a composição molecular dos canais K^+_{ATP} . A identificação das características de cada canal já permite o direcionamento da pesquisa na busca de maior seletividade farmacológica (Stephan *et al.*, 2006) e, por conseguinte, terapêutica mais precisa e direcionada. Já existem bloqueadores mais seletivos, como o HMR 1098 (Quadro 1), também sulfoniluréia, que parece favorecer o bloqueio

seletivo nos cardiomiócitos (Gogelein *et al.*, 2001). A ativação dos canais K^+_{ATP} localizados na bexiga, tubo gastrintestinal e vias aéreas produz relaxamento da musculatura lisa e o possível desenvolvimento de agonistas mais específicos deverá ser importante no controle de doenças desses órgãos e sistemas. Os canais K^+_{ATP} apresentam propriedades peculiares em cada sítio – na musculatura esquelética, por exemplo, estão inseridos no processo de fadiga e recuperação do exercício, principalmente na absorção de glicose e efluxo de K^+ (Rodrigo & Standen, 2005); no metabolismo neuronal também parece que têm papel relevante no metabolismo glicêmico (hipotalâmico). O receptor SUR1 é a subunidade regulatória do complexo transmembrana Kir 6.2 adenosina 5'-trifosfato-sensível (canal K^+_{ATP}) das células beta pancreáticas, sua ativação sendo fundamental para a secreção de insulina (primeira e segunda fase - Krentz & Bailey, 2005). A glibenclamida atua como bloqueador desse receptor e estimula a liberação de insulina em pacientes com diabetes tipo 2. Outras subunidades conhecidas são a SUR2A no miócito e SUR2B na musculatura lisa (Gribble & Reimann, 2003). Beesley *et al.* (1999) estudaram a distribuição das isoformas dos receptores SUR no rim de ratos utilizando imunoenaios com anticorpos anti-SUR e observaram especificidade para receptores SUR2B nos segmentos distais do néfron. Na musculatura lisa vascular, os canais K^+_{ATP} são regulados por vias sinalizadoras e levam à vasodilatação. Lima *et al.* (2006) estudaram a ação da glibenclamida no rim e na aorta de ratas grávidas hipertensas e constataram diminuição na expressão de mRNA da subunidade Kir6.2 do receptor K^+_{ATP} sem vasodilatação.

Do ponto de vista farmacocinético, a glibenclamida é considerada hipoglicemiante oral de ação intermediária, cuja principal via de eliminação é biliar (Krentz & Bailey, 2005). A introdução clínica da glibenclamida deve ser gradativa e a dose inicial diária em adultos é de 2,5 mg, podendo chegar a 20 mg.

2.8 Canais de potássio dependentes de adenosina trifosfatona (K^+_{ATP})

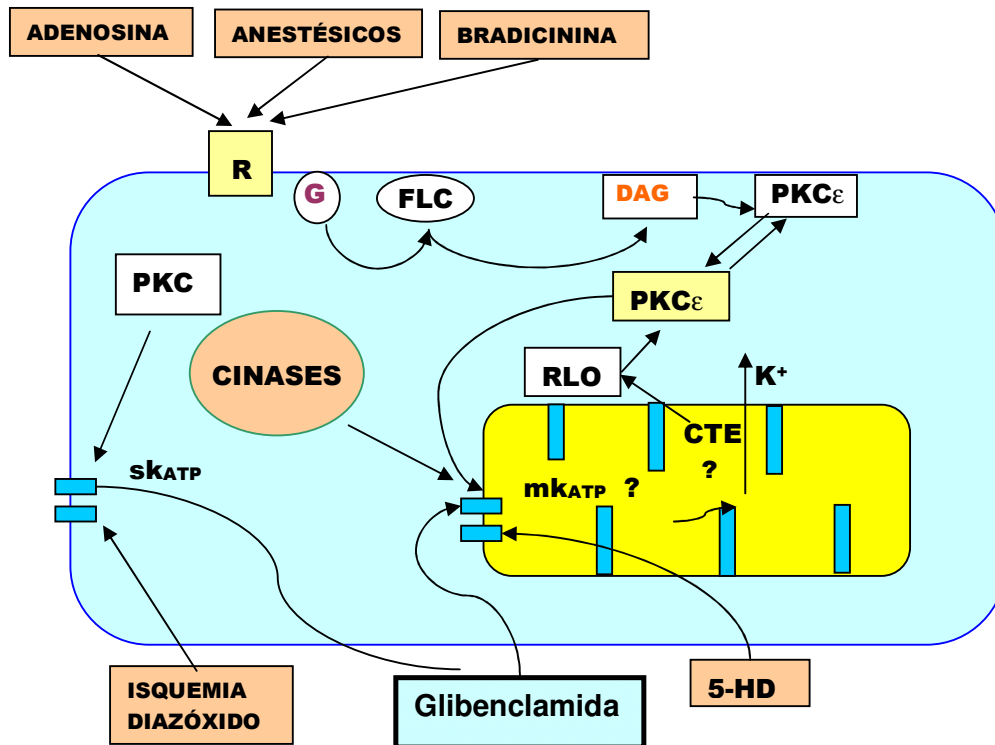
Os canais K^+_{ATP} apresentam, presumivelmente, a atribuição de regular as respostas celulares à isquemia em função da concentração intracelular de ATP (Terzic *et al.*, 1995), ou seja, são intrinsecamente ligados ao metabolismo energético celular. São 2 os tipos encontrados: sK^+_{ATP} , no sarcolema, e mK^+_{ATP} , na membrana mitocondrial, estes últimos, de mais difícil estudo (Esquema 2). Ainda existem controvérsias sobre a maior, ou menor, importância de cada um dos 2 tipos de canais K^+_{ATP} na mediação do PC – quer isquêmico, quer farmacológico (Hanley *et al.*, 2005). Contudo, os sK^+_{ATP} parecem ter maior participação no PCI, enquanto os mK^+_{ATP} estão mais relacionados ao PC farmacológico. Atualmente consideram-se três os tipos de mK^+_{ATP} que podem estar envolvidos no PC e estes atuam na regulação do volume da matriz mitocondrial (Garlid *et al.*, 2003), essencial na manutenção estrutural da organela por controlar o equilíbrio osmótico entre o citosol e a mitocôndria. Qualquer alteração no fluxo do K^+ , o principal íon intracelular, irá provocar o desequilíbrio. Na mitocôndria funcionante, o efluxo de K^+ parece ser maior do que o influxo, de tal modo que a concentração intramitocondrial

permaneça menor que no citosol (Kaasik *et al.*, 2006). A atividade dos canais mK^+_{ATP} funcionaria na manutenção do potencial interno da membrana mitocondrial ($\Delta\psi$), necessário à fosforilação oxidativa, juntamente com um contratransporte de K^+/H^+ (em direção oposta), que estabelece um gradiente de prótons entre a matriz mitocondrial e a membrana interna, compensando, deste modo, o influxo de K^+ (Nelson *et al.*, 1990).

Possível hipótese sobre o mecanismo de ação do PC seria que a ativação dos canais mK^+_{ATP} permitiria maior influxo de K^+ com conseqüente edema mitocondrial e alteração morfológica do espaço da dupla membrana mitocondrial. Em seqüência, haveria menor hidrólise de ATP induzida pela ATP sintase e menor produção de H^+ ; excesso de K^+ seria contrabalançado pelo contratransporte de K^+/H^+ e Ca^{++} permaneceria no citosol (Carreira *et al.*, 2005).

A importância da mitocôndria supera a simples regulação do metabolismo energético, atua sobremodo nos mecanismos da morte celular, seja no desequilíbrio da produção de radicais livres de oxigênio, seja na mutação do DNA nuclear (Orrenius *et al.*, 2007).

Na verdade, ainda não é categórico o papel dos canais mitocondriais de K^+_{ATP} , isto é, não se sabe se atuariam como “gatilhos” na fase inicial do PC estimulando a geração de radicais livres de oxigênio e ativação de $PKC\epsilon$, ou como componentes do efetor final (Wang *et al.*, 2001).



Esquema 2 - Apresentação esquemática e resumida de alguns mecanismos envolvidos na ativação dos canais K^+_{ATP} no sarcolema e mitocôndria.

R - receptor; G - glicoproteína FLC; - fosfolipase C; PKC - proteína cinaseC; CTE - cadeia transportadora de elétrons; DAG - diacilglicerol; RLO - radicais livres de oxigênio; 5-HD - 5hidroxidecanoato (Adaptado de: Hanley P & Daut J. J Mol Cell Cardiol. 2005;39:20)

A pesquisa de mecanismos que assegurem proteção da função renal, contra lesão de isquemia-reperfusão, deve ser direcionada à prevenção do desencadeamento da cascata de eventos celulares decorrentes do estímulo isquêmico-reperfusional e à procura de processos biológicos que possam amplificar os mecanismos endógenos citoprotetores.

3 OBJETIVO

O escopo desta pesquisa foi a avaliação dos efeitos da glibenclamida na função e histologia renais de ratos sob anestesia com sevoflurano e em cenário de franca agressão aguda por hemorragia.

4 MATERIAL E MÉTODO

O presente experimento foi previamente autorizado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Trata-se de estudo no qual foram utilizados 20 ratos Wistar, com peso superior a 250g, provenientes do Biotério Central do Campus de Botucatu. A amostra foi aleatoriamente dividida em dois grupos de 10 ratos cada:

- ◆ **Grupo 1 (G1)** - ratos (1 fêmea, 9 machos) anestesiados com sevoflurano e submetidos à hemorragia de 30% da volemia;
- ◆ **Grupo 2 (G2)** - ratos (5 fêmeas, 5 machos) anestesiados com sevoflurano, tratados com glibenclamida por via venosa e submetidos à hemorragia de 30% da volemia.

Após pesagem, os ratos eram acomodados em campânula de material inerte, transparente e volume adequado (3,4L), apresentando-se satisfatória para anestesia inalatória em animais de pequeno porte. Contava com orifício superior, para entrada da fonte de gases frescos, e orifício inferior para exalação dos gases. Iniciava-se a anestesia com sevoflurano a 4% com fluxo total de $1\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ de oxigênio medicinal e $1\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ de ar comprimido medicinal. O vaporizador utilizado era da marca Ohmeda (USA), previamente calibrado para o referido anestésico. Assim que o animal apresentava sinais de narcose suficiente para sua manipulação, a concentração do anestésico era diminuída para cerca de 2,5% e a campânula retirada, quando, então,

acoplava-se máscara apropriada ao formato do focinho do rato. Os ratos foram mantidos em respiração espontânea com a mistura oxigênio/ar/sevoflurano, variando-se a concentração anestésica conforme monitorização da frequência respiratória. A temperatura retal (T) foi monitorizada a intervalos de 5 min com termômetro digital. O animal era coberto até a região cervical com uma campânula transparente fenestrada em duas posições, uma delas permitindo a passagem do tórax do rato, e a outra, a acomodação da entrada de ar aquecido a 40°C por um compressor-aquecedor que era desligado conforme a necessidade de se manter a temperatura do corporal entre 35,5 e 37,5 °C.

Os procedimentos cirúrgicos iniciavam-se imediatamente após a estabilização da anestesia e constaram de incisão transversal no pescoço com dissecação suficiente para exposição e canulação, com venocath 24 GA, de:

- 1) veia jugular interna, para manutenção da infusão de solução de Ringer com lactato (RL) 5 mL.kg⁻¹.h⁻¹, para reposição de perdas de fluidos (Cheng *et al.*, 2003), e para a administração de glibenclamida, para-aminohipurato de sódio (PAH) e iotalamato de sódio (IOT);
- 2) artéria carótida, para monitorização da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC), utilizando-se transdutor do aparelho de registro Datex Engstron (*Finland*).

A dificuldade na obtenção de urina, especialmente em ratos após períodos de hemorragia, ensejou utilizar-se o método para modelos experimentais com ratos relatado por Rönnhedh *et al.* (1996).

Ambos os grupos recebiam, imediatamente após a canulação da veia jugular interna, solução *prime* de 1 mg de PAH (20%, Sigma, USA) e 0,5

mg de IOT (70%, Mallickrodt, USA) em 0,5 mL de solução de NaCl a 0,9% infundida em 1 minuto. Em seguida iniciava-se a infusão contínua de ambos os agentes nas seguintes doses: 1 mg. h⁻¹ de PAH e 0,25 mg.h⁻¹ de IOT em solução de NaCl a 0,9%. A infusão de ambos os agentes permanecia até o final do experimento à velocidade de 0,7 mL.h⁻¹, fazendo-se uso, para tal, de bomba de infusão Anne[®] (Abbott, USA). Em G2, logo após a injeção da solução *prime* de PAH e IOT, administrava-se, por via venosa, a glibenclamida (Glyburide[®] - Sygma, 0,1%) na dose de 1 mcg.g⁻¹ de peso corporal.

A partir da injeção do *prime* e início da infusão de IOT e PAH aguardavam-se 60 min para equilíbrio plasmático de ambos os agentes (Rönnhedh *et al.*, 1996) e estabilização do animal. Nesse momento (M1), através da artéria carótida, iniciava-se a sangria do animal em 3 etapas com intervalos de 10 min, sendo que o total de sangue retirado correspondia a 30% da volemia. Procedimento idêntico foi realizado também em G2. Estimava-se a volemia de cada animal como correspondente a 6% do peso corporal (Erni *et al.*, 1995). Em cada momento de hemorragia, a PAM e a temperatura retal eram registradas. A frequência cardíaca era monitorada pela curva da PAM, mas seu registro não foi possível devido às propriedades do monitor em limitar-se a valores inferiores a 250 bpm, o que nem sempre ocorre em ratos. O sangue arterial coletado foi utilizado como amostra para análise laboratorial do hematócrito (Ht), da concentração do PAH e IOT, pela cromatografia líquida de alta performance (*high performance liquid chromatography - HPLC*).

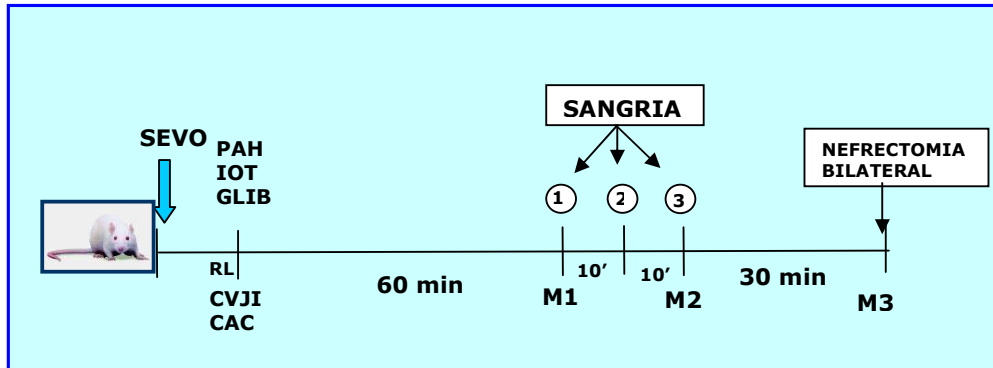
Após cada momento de hemorragia havia reposição com solução de RL, 1,6 mL. kg⁻¹ caso a PAM alcançasse valores abaixo de 80 mmHg. Após a

última hemorragia, os ratos permaneceram anestesiados por mais 30 min, quando, então, era realizada a nefrectomia bilateral e o sacrifício do animal com dose pentobarbital sódico suficiente para tal. Ambos os rins, retirados, eram imediatamente seccionados longitudinalmente em seu maior eixo e armazenados em frascos separados, para análise histológica, em solução de Dubosque Brasil (formol 120 ml, ácido acético 30 ml e ácido pícrico 2g), na qual permaneceram por um período mínimo de 12 h e máximo de 36 h. Em seguida os rins eram identificados por número codificado, de modo que o patologista responsável pela análise histológica e aplicação da escala de valores para os critérios estudados não teria como relacionar a peça examinada ao animal do experimento.

Os atributos estudados foram: hematócrito, temperatura retal, pressão arterial média, *clearance* de PAH, *clearance* de IOT, fração de filtração, fluxo sanguíneo renal e resistência vascular renal e análise histológica de ambos os rins.

Os momentos em que se estudaram os atributos das funções foram:

- M1** - controle e coincidente com a 1^a hemorragia;
- M2** - obtido após 20 min da 1.^a hemorragia e 10 min da 2.^a, sendo coincidente com a 3.^a hemorragia;
- M3** - obtido imediatamente antes da nefrectomia e sacrifício do animal



Seqüência do experimento

SEVO - Início do experimento com sevoflurano 4%

CVJI/CAC - Dissecção/Canulização veia jugular interna/artéria carótida

RL - Solução de Ringer com lactato

PAH/IOT - Bolus inicial/Infusão contínua

GLIB - Glibenclamida nos ratos de G2

4.1 Análise histológica

O preparo das lâminas contendo fragmentos de ambos os rins constou, inicialmente, de fixação em parafina e posterior coloração com hematoxilina/eosina. A avaliação histológica, toda ela realizada pela mesma patologista, baseou-se na observação e análise de evidências dos seguintes critérios: dilatação tubular, dilatação vascular, congestão vascular, vacuolização tubular, necrose e evidências de regeneração tubular. Para o diagnóstico de necrose tubular era necessária a identificação de necrose nuclear e *debris* citoplasmático.

Aos achados, foram atribuídos valores correspondentes ao grau de importância de cada uma das possíveis lesões, sendo zero (0) ausência de lesão, valor um (1) para lesões leves, dois (2) para lesões moderadas e três (3) para lesões intensas.

4.2 Equipamento Laboratorial

O equipamento utilizado para a dosagem sangüínea de IOT e PAH foi o Sistema HPLC Shimadzu® (Japan), que consiste de

- ◆ Auto-injetor SIL-10AF;
- ◆ Detector UV SPD-10 AV operado a comprimento de onda de 254nm;
- ◆ Sistema de controle SCL-10 A;
- ◆ Bombas (2) LC-10 AD - isocráticas com fluxo de $0,8\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para liberação de solvente;
- ◆ Comunicador entre módulos CBM 10^A;
- ◆ Desgaseificador modelo DGU2^A.

A coluna utilizada foi a *OmniSpher* C18 de 25cm (Varian®) com respectiva pré-coluna.

Amostras de 20 μL foram injetadas a cada 30 minutos.

A fase móvel foi metanol-tampão (18:82, v/v), sendo o tampão preparado com 50 mM de fosfato monobásico de sódio com 0,5 mM de Pic A, ajustado o pH para 4,11.

Para a extração, 250 μL de soro e 500 μL de acetonitrila, com padrão interno (PABA) 20 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, foram colocados em tubo Eppendorff, então agitados e centrifugados a 12.000 rotações por 4 minutos. O sobrenadante foi injetado no cromatógrafo.

As determinações de iotalamato e para-aminohipurato de sódio foram realizadas de maneira relativa – a curva de PAH, PABA e IOT versus

amostra. Os tempos de retenção foram para PAH, 5,2 minutos, para PABA, 8,7 minutos, e para IOT, 11,2 minutos. A recuperação foi de 96,4%.

Obtidos os resultados das concentrações sanguíneas de IOT e PAH em mg.mL^{-1} , foram calculados os *clearances* (C) de iotalamato e para-aminohipurato de sódio (C_{IOT} e C_{PAH}) de acordo com o princípio de Fick (Mather & Runciman, 1985; Rönnhedh *et al.*, 1996):

$$C \text{ (mL.min}^{-1}\text{)} = \frac{\text{valor constante de infusão (mg.min}^{-1}\text{)}}{\text{concentração arterial média (mg.mL}^{-1}\text{)}}$$

O C_{PAH} foi utilizado para estimar o fluxo plasmático renal efetivo (FPR_{efetivo}) e o C_{IOT} foi utilizado para estimar o ritmo de filtração glomerular (RFG). A fração de filtração (FF) foi definida como a razão RFG/FPR_{efetivo} ($C_{\text{IOT}}/C_{\text{PAH}}$).

Na determinação do hematócrito, foi utilizado o método do microhematócrito (Wintrobe, 1967), utilizando-se o aparelho Fanem modelo 240 (Brasil), sendo o resultado expresso em porcentagem.

4.3 Fórmulas utilizadas

4.3.1 Fluxo sanguíneo renal

$$\text{FSR} = \frac{C_{\text{PAH}}}{1 - \text{Ht}}$$

Sendo:

FSR = fluxo sanguíneo renal (mL.min⁻¹)

C_{PAH} = *clearance* de PAH (mL.min⁻¹)

Ht = hematócrito

4.3.2 Fração de filtração

$$\text{FF} = \frac{C_{\text{IOT}}}{C_{\text{PAH}}}$$

Sendo:

FF = fração de filtração

C_{IOT} = *clearance* de iotalamato de sódio (mL.min⁻¹)

C_{PAH} = *clearance* de PAH (mL.min⁻¹)

4.3.3 Resistência vascular renal

$$\text{RVR} = \frac{\text{PAM}}{\text{FSR}}$$

Sendo:

RVR= resistência vascular renal (mmHg.min.mL⁻¹)

PAM= pressão arterial média (mmHg)

FSR= fluxo sanguíneo renal (mL.min⁻¹)

4.4 Métodos estatísticos

O peso foi analisado pelo teste “t” de Student com o objetivo de comparar ambos os grupos quanto à sua homogeneidade.

Para os atributos avaliados ao longo do tempo nos animais (M1, M2 e M3), foi efetuada Análise de Perfil (Morrison, 1967) com os testes de

1. Interação entre grupos e momentos, visando verificar se os perfis médios dos 2 grupos podem ser considerados similares ao longo do tempo;
2. verificação da igualdade dos 2 grupos no conjunto dos momentos (diferença entre os dois perfis), no caso de aceitação da similaridade;
3. verificação da diferença entre momentos no conjunto dos grupos, no caso de aceitação da similaridade;
4. verificação da diferença entre grupos em cada momento;
5. verificação da diferença entre momentos dentro de cada grupo.

Em cada hipótese testada, foram calculadas as estatísticas F e p.

Para as variáveis histológicas anotadas como graus (0 a 3), em cada rim, durante a análise histológica realizada, a comparação entre os dois grupos foi efetuada pela prova não-paramétrica de Mann-Whitney para grupos independentes (Siegel, 1975), com o cálculo das estatísticas U e p. Os graus atribuídos aos dois rins de cada animal variaram, para cada possível alteração histológica, de 0 a 3 em grau crescente de comprometimento.

Em todas as análises efetuadas, as estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$, sendo p a probabilidade de erroneamente se concluir pela significância (Curi, 1997). Quando $0,05 < p < 0,10$ foi referida tendência à significância.

5 RESULTADOS

5.1 Peso

Tabela 1 - Média e desvio padrão do peso (g) dos animais utilizados nos experimentos de ambos os grupos

Grupo	Peso (g)/dp
G1	346 ± 81
G2	338 ± 62
<i>Estatística</i>	t= 0,25; p>0,50
<i>Comentário</i>	G1=G2

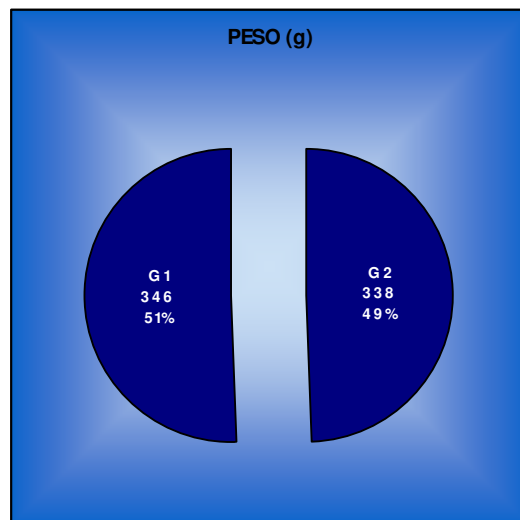


Figura 1 - Média do peso (g) dos animais em cada grupo.

5.2 Temperatura retal (Tr)

Tabela 2 - Temperatura retal ($^{\circ}\text{C}$). Média e desvio padrão dos valores observados em cada momento nos dois grupos experimentais

Grupos	Momentos		
	M1	M2	M3
G1	35,9 \pm 1,9	35,6 \pm 1,7	36,0 \pm 1,8
G2	37,0 \pm 1,4	36,2 \pm 1,3	36,7 \pm 0,7

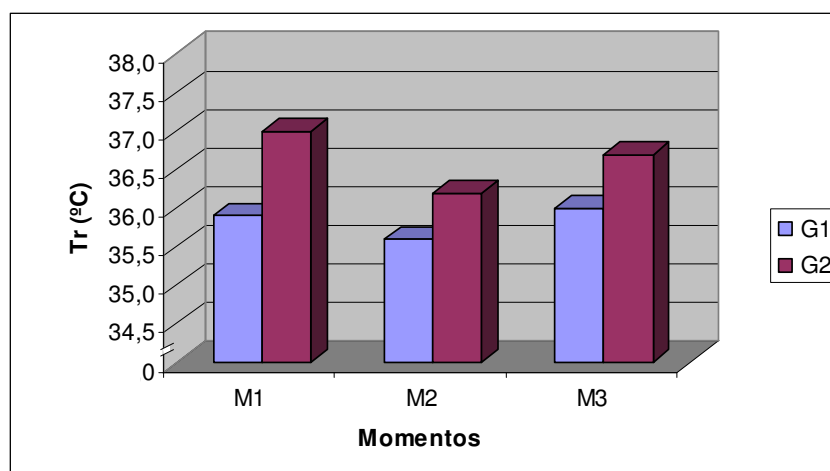


Figura 2 - Médias dos valores da temperatura retal ($^{\circ}\text{C}$) em cada momento nos dois grupos experimentais.

Quadro 2 - Temperatura retal. Hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários

Hipótese	Estatística	Comentário
1. Interação entre grupos e momentos	F=0,28; p>0,50	Perfis similares
2. Efeito de grupo	F=1,87; p>0,10	Perfis iguais
3. Efeito de momento	F=2,00; p>0,10	Momentos não diferem
4. Efeito de grupo em cada momento	M1: F=1,90; p>0,10	G1=G2
	M2: F=0,81; p>0,10	G1=G2
	M3: F=1,40; p>0,10	G1=G2
5. Efeito de momento em cada grupo	G1: F=2,33; p>0,10	M1=M2=M3
	G2: F=3,28; p>0,05	M1=M2=M3

5.3 Pressão arterial média (PAM)

Tabela 3 - Pressão arterial média (mmHg). Média e desvio padrão dos valores observados em cada momento nos dois grupos experimentais

Grupos	Momentos		
	M1	M2	M3
G1	96 ± 25	89 ± 20	75 ± 20
G2	89 ± 20	79 ± 21	73 ± 15

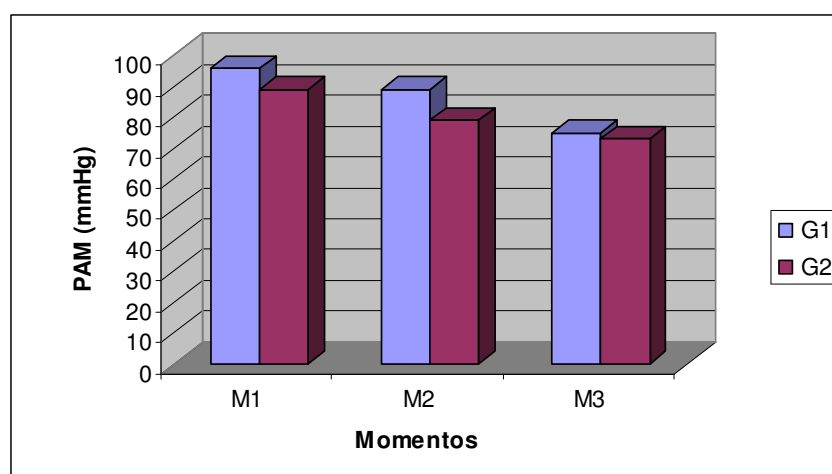


Figura 3 - Média dos valores da pressão arterial média (mmHg) observados em cada momento nos dois grupos experimentais.

Quadro 3 - Pressão arterial média. Hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários

Hipótese	Estatística	Comentário
1. Interação entre grupos e momentos	F=0,28; p=0,50	Perfis similares
2. Efeito de grupo	F=0,68; p>0,10	Perfis iguais
3. Efeito de momento	F=7,06; p<0,05	Existe efeito de momento (M1=M2)>M3
4. Efeito de grupo em cada momento	M1: F=0,41; p>0,50 M2: F=1,02; p>0,10 M3: F=0,06; p>0,50	G1=G2 G1=G2 G1=G2
5. Efeito de momento em cada grupo	G1: F=9,57; p<0,05 G2: F=5,79; p<0,05	(M1=M2)>M3 M1>M3; M2 intermediário

5.4 Hematócrito (Ht)

Tabela 4 - Hematócrito (%). Média e desvio padrão dos valores observados em cada momento nos dois grupos experimentais

Grupos	Momentos		
	M1	M2	M3
G1	41 ± 2	36 ± 3	33 ± 3
G2	37 ± 5	34 ± 4	31 ± 3

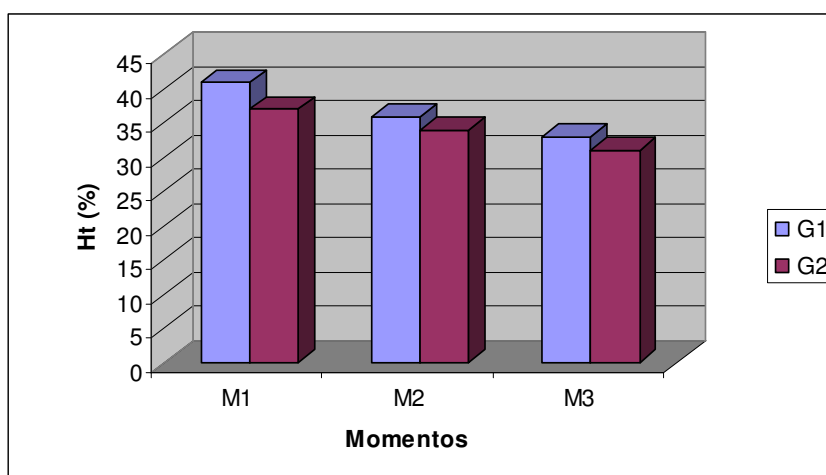


Figura 4 - Médias dos valores de hematócrito (%) em cada momento em ambos os grupos.

Quadro 4 - Hematócrito. Hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários

Hipótese	Estatística	Comentário
1. Interação entre grupos e momentos	F=2,48; p>0,10	Perfis similares
2. Efeito de grupo	F=2,70; p>0,10	Perfis iguais
3. Efeito de momento	F=105,72; p<0,05	M1>M2>M3
4. Efeito de grupo em cada momento	M1: F=4,70; p<0,05	G1>G2
	M2: F=1,65; p>0,10	G1=G2
	M3: F=1,10; p>0,10	G1=G2
5. Efeito de momento em cada grupo	G1: F=81,87; p<0,05	M1>M2>M3
	G2: F=45,27; p<0,05	M1>M2>M3

5.5 Clearance de para-aminohipurato de sódio (C_{PAH})

Tabela 5 - Clearance de para-aminohipurato de sódio ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Média e desvio padrão dos valores observados em cada momento nos dois grupos experimentais

Grupos	Momentos		
	M1	M2	M3
G1	0,068 ± 0,024	0,067 ± 0,026	0,054 ± 0,023
G2	0,083 ± 0,024	0,096 ± 0,016	0,096 ± 0,016

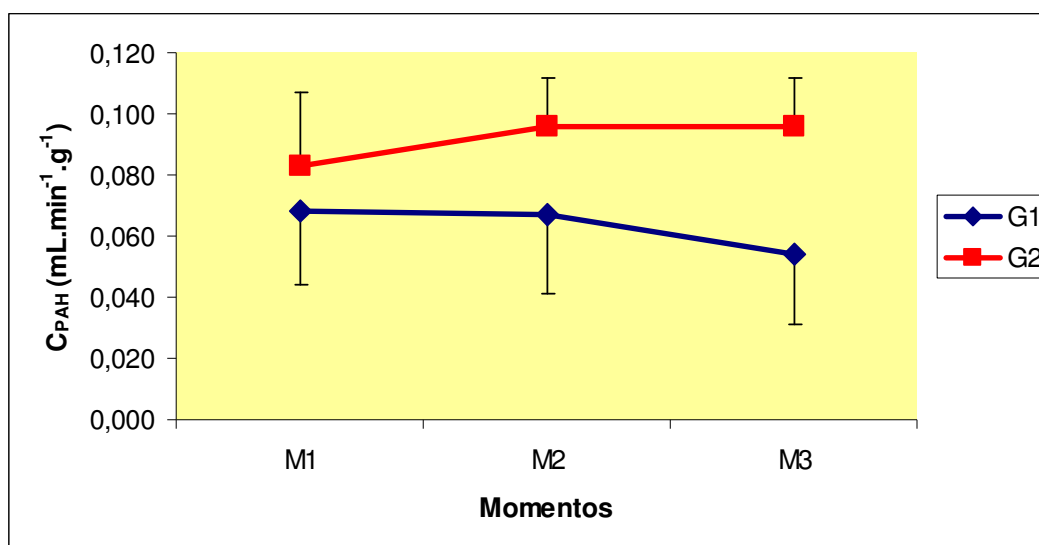


Figura 5 - Médias dos valores do clearance de para-aminohipurato de sódio ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot 10^3$).

Quadro 5 - Clearance de para-aminohipurato de sódio. Hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários

Hipótese	Estatística	Comentário
1. Interação entre grupos e momentos	F=4,35; p<0,05	Existe interação Perfis não similares
2. Efeito de grupo	F=; p	
3. Efeito de momento	F=; p	
4. Efeito de grupo em cada momento	M1: F=2,09; p>0,05 M2: F=9,25; p<0,05 M3: F=22,79; p<0,05	G1=G2 G1<G2 G1<G2
5. Efeito de momento em cada grupo	G1: F=8,03; p<0,05 G2: F=3,43; 0,05<p<0,10	M2 > M3; M1 intermed. M1≤(M2=M3)

5.6 Clearance de iotalamato de sódio (C_{IOT})

Tabela 6 - Clearance de iotalamato de sódio ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$). Média e desvio padrão dos valores observados em cada momento nos dois grupos experimentais

Grupos	Momentos		
	M1	M2	M3
G1	$0,992 \pm 0,050$	$1,002 \pm 0,042$	$0,924 \pm 0,169$
G2	$1,020 \pm 0,008$	$1,020 \pm 0,050$	$1,000 \pm 0,050$

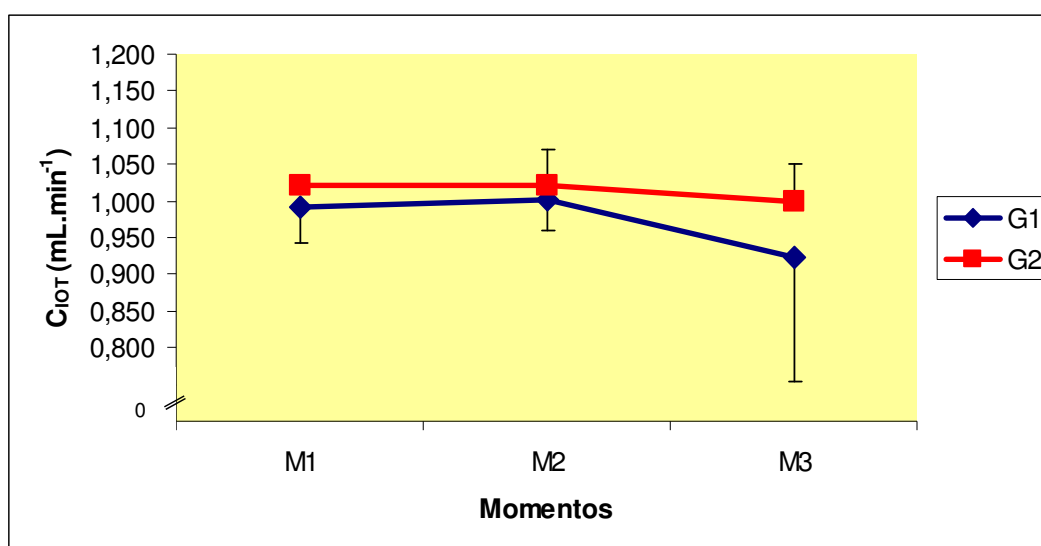


Figura 6 - Médias dos valores de clearance de iotalamato de sódio ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$) em cada momento nos dois grupos.

Quadro 6 - Clearance de iotalamato de sódio. Hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários

Hipótese	Estatística	Comentário
1. Interação entre grupos e momentos	$F=0,93$; $p>0,10$	Perfis similares
2. Efeito de grupo	$F=4,16$; $0,05<p<0,10$	Tendência $G1 \leq G2$
3. Efeito de momento	$F=2,42$; $p>0,10$	$M1=M2=M3$
4. Efeito de grupo em cada momento	M1: $F=3,78$; $0,05<p<0,10$ M2: $F=1,83$; $p>0,10$ M3: $F=2,01$; $p>0,10$	Tendência $G1 \leq G2$ $G1=G2$ $G1=G2$
5. Efeito de momento em cada grupo	G1: $F=6,09$; $p<0,05$ G2: $F=0,20$; $p>0,50$	$M3<M2$; M1 intermediário $M1=M2=M3$

5.7 Fração de filtração (FF)

Tabela 7 - Fração de filtração. Média e desvio padrão dos valores observados em cada momento nos dois grupos experimentais

Grupos	Momentos		
	M1	M2	M3
G1	0,052 ± 0,030	0,053 ± 0,029	0,060 ± 0,030
G2	0,042 ± 0,021	0,032 ± 0,003	0,032 ± 0,001

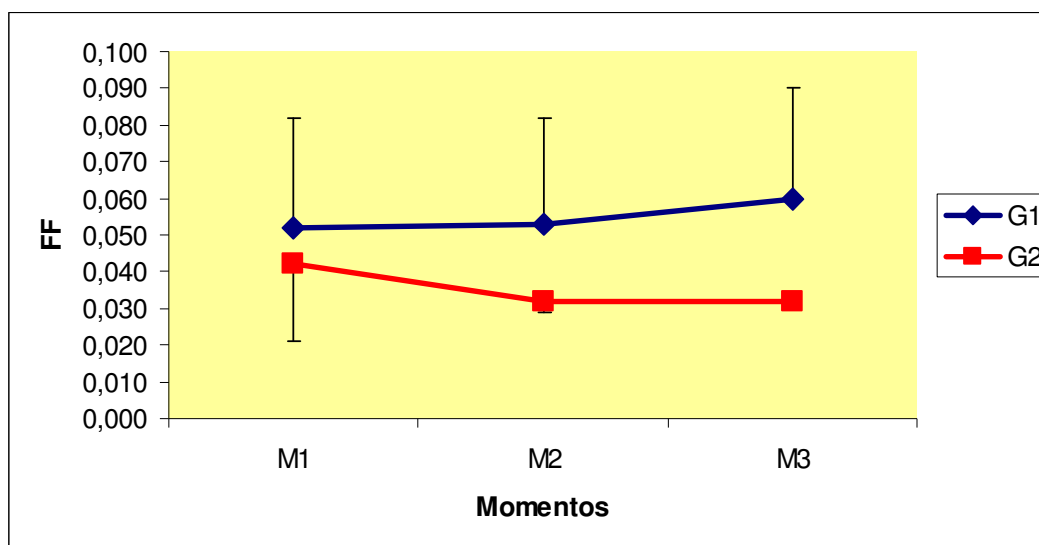


Figura 7 - Médias dos valores da fração de filtração em cada momento nos dois grupos experimentais x 100.

Quadro 7 - Fração de filtração. Hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários

Hipótese	Estatística	Comentário
1. Interação entre grupos e momentos	F=3,71; p<0,05	Perfis não similares
2. Efeito de grupo	F=; p	
3. Efeito de momento	F=; p	
4. Efeito de grupo em cada momento	M1: F=0,74; p>0,10 M2: F=5,30; p<0,05 M3: F=9,15; p<0,05	G1=G2 G1>G2 G1>G2
5. Efeito de momento em cada grupo	G1: F=8,63; p<0,05 G2: F=3,08; p>0,10	(M1=M2)< M3 M1=M2=M3

5.8 Fluxo sanguíneo renal (FSR)

Tabela 8 - Fluxo sanguíneo renal ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Média e desvio padrão dos valores observados em cada momento nos dois grupos experimentais

Grupos	Momentos		
	M1	M2	M3
G1	$0,114 \pm 0,040$	$0,106 \pm 0,042$	$0,080 \pm 0,035$
G2	$0,132 \pm 0,039$	$0,146 \pm 0,024$	$0,140 \pm 0,023$

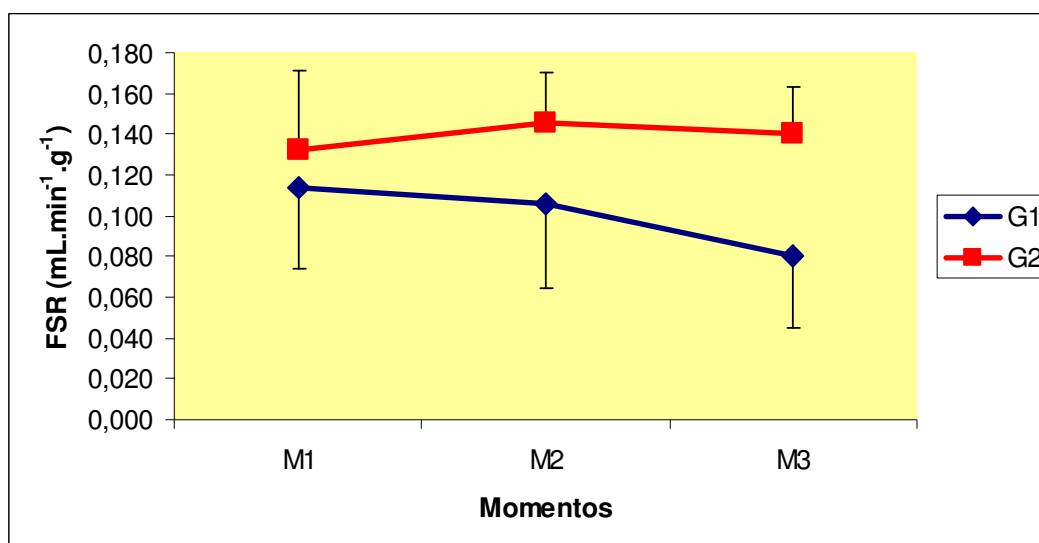


Figura 8 - Médias dos valores do fluxo sanguíneo renal ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) observados em cada momento em ambos os grupos.

Quadro 8 - Fluxo sanguíneo renal. Hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários

Hipótese	Estatística	Comentário
1. Interação entre grupos e momentos	$F=0,42$; $p>0,50$	Perfis similares
2. Efeito de grupo	$F=0,14$; $p>0,50$	Perfis iguais
3. Efeito de momento	$F=0,39$; $p>0,50$	Momentos não diferem
4. Efeito de grupo em cada momento	M1: $F=1,10$; $p>0,10$	G1=G2
	M2: $F=2,84$; $p>0,10$	G1=G2
	M3: $F=0,08$; $p>0,50$	G1=G2
5. Efeito de momento em cada grupo	G1: $F=0,93$; $p>0,10$	M1=M2=M3
	G2: $F=1,51$; $p>0,10$	M1=M2=M3

5.9 Resistência vascular renal (RVR)

Tabela 9 - Resistência vascular renal ($\text{mmHg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}$). Média e desvio padrão dos valores observados em cada momento nos dois grupos experimentais

Grupos	Momentos		
	M1	M2	M3
G1	$3,22 \pm 2,57$	$3,10 \pm 2,06$	$3,44 \pm 2,25$
G2	$2,27 \pm 1,30$	$1,64 \pm 0,40$	$1,58 \pm 0,35$

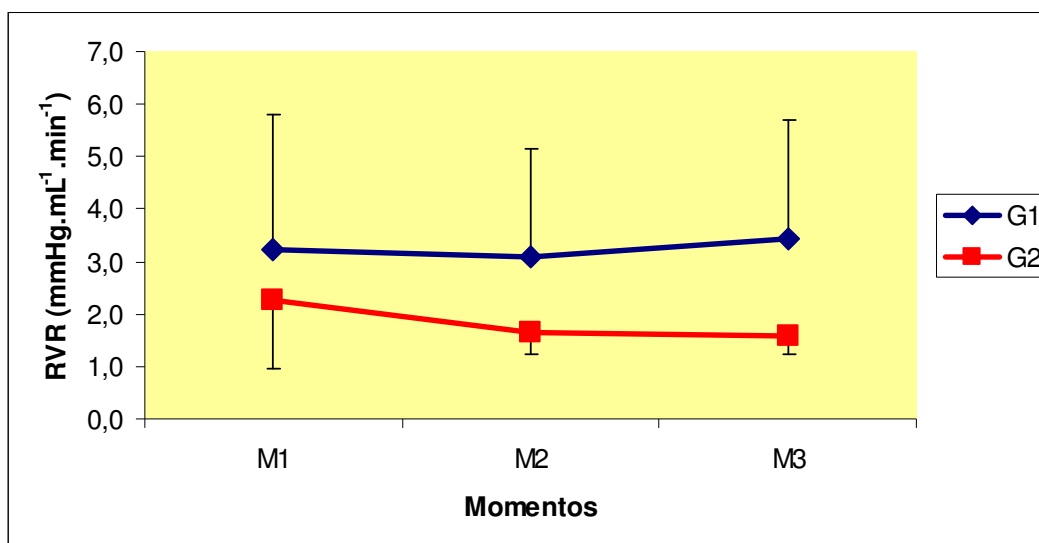


Figura 9 - Médias dos valores da resistência vascular renal ($\text{mmHg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}$) observados em cada momento em ambos os grupos.

Quadro 9 - Resistência vascular renal. Hipóteses testadas, estatísticas calculadas e comentários

Hipótese	Estatística	Comentário
1. Interação entre grupos e momentos	$F=1,86; p>0,10$	Perfis similares
2. Efeito de grupo	$F=9,86; p<0,05$	$G1>G2$
3. Efeito de momento	$F=1,32; p>0,10$	$M1=M2=M3$
4. Efeito de grupo em cada momento	M1: $F=1,08; p>0,10$	$G1=G2$
	M2: $F=4,80; p<0,05$	$G1>G2$
	M3: $F=6,65; p<0,05$	$G1>G2$
5. Efeito de momento em cada grupo	G1: $F=2,79; p>0,10$	$M1=M2=M3$
	G2: $F=2,90; p>0,10$	$M1=M2=M3$

Análise histológica

5.10 Dilatação tubular

Tabela 10 - Grau de dilatação tubular. Escores dos rins direito (D) e esquerdo (E) de cada rato em ambos os grupos

Ratos		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
G1	D	1	1	1	2	2	2	2	1	2	3
	E	3	3	1	3	1	1	1	1	1	1
G2	D	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
	E	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0

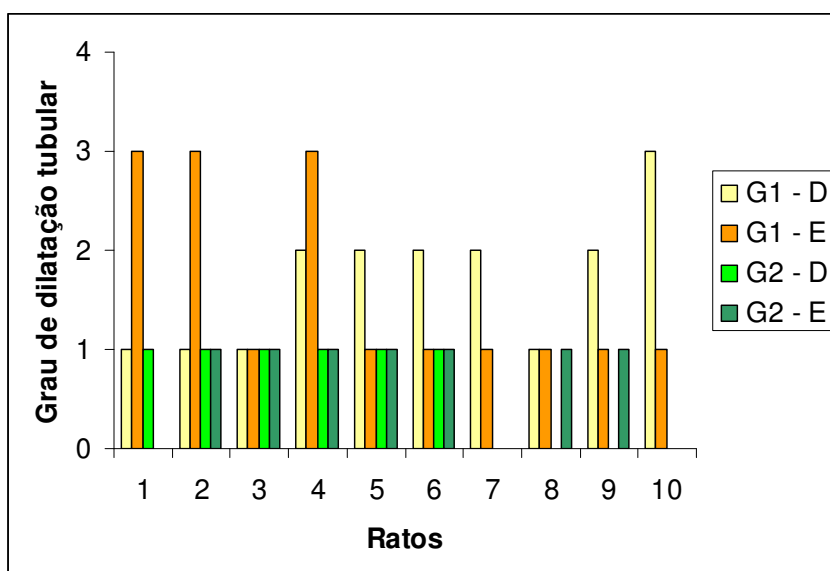


Figura 10 - Grau de dilatação tubular. Escores de dilatação tubular dos rins direito e esquerdo de cada rato em ambos os grupos.

Quadro 10 - Dilatação tubular dos rins direito e esquerdo de cada rato em ambos os grupos. Estatística e comentário

Variável	Estatística	Comentário
Dilatação tubular	$p < 0,05$	G1 > G2

5.11 Dilatação vascular

Tabela 11 - Grau de dilatação vascular. Escores dos rins direito (D) e esquerdo (E) de cada rato em ambos os grupos

Ratos		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
G1	D	1	1	1	1	1	2	1	1	1	3
	E	1	1	1	2	1	1	1	1	0	1
G2	D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

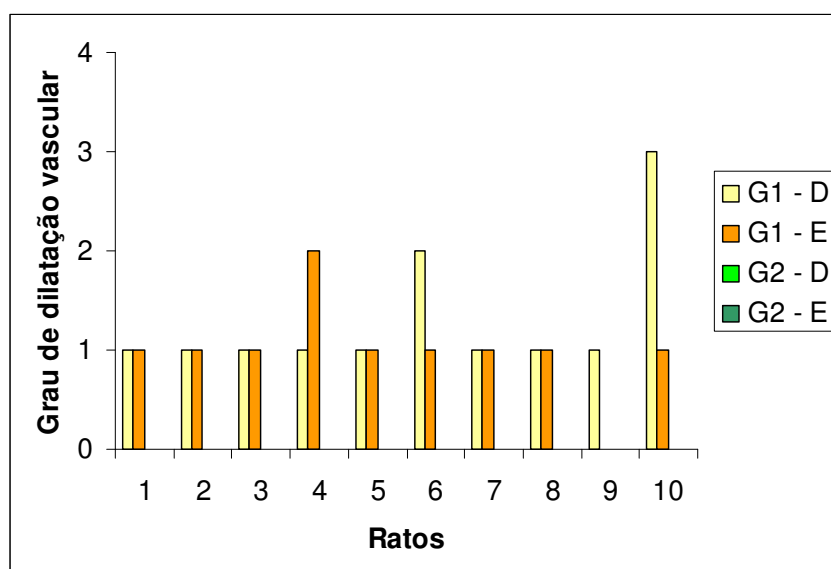


Figura 11 - Grau de dilatação vascular. Escores de dilatação vascular dos rins direito e esquerdo de cada rato em ambos os grupos.

Quadro 11 - Dilatação vascular dos rins direito e esquerdo de cada rato em ambos os grupos. Estatística e comentário

Variável	Estatística	Comentário
Dilatação vascular	$p < 0,05$	G1 > G2

5.12 Congestão vascular

Tabela 12 - Grau de congestão vascular. Escores dos rins direito (D) e esquerdo (E) de cada rato em ambos os grupos

Ratos		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
G1	D	1	1	1	0	0	2	2	0	0	0
	E	1	0	2	2	0	0	0	0	0	0
G2	D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

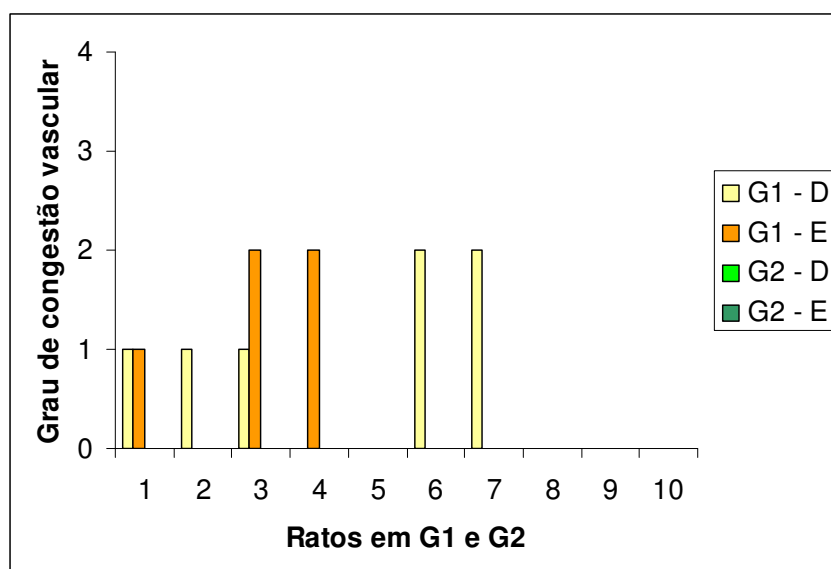


Figura 12 - Grau de congestão vascular. Escores de congestão vascular dos rins direito e esquerdo de cada rato em ambos os grupos.

Quadro 12 - Congestão vascular dos rins direito e esquerdo de cada rato em ambos os grupos. Estatística e comentário

Variável	Estatística	Comentário
Congestão vascular	$p < 0,05$	G1 > G2

5.13 Vacuolização tubular

Tabela 13 - Grau de vacuolização tubular. Escores dos rins direito (D) e esquerdo (E) de cada rato em ambos os grupos

Ratos		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
G1	D	0	1	0	1	0	0	1	1	1	2
	E	2	1	0	1	0	1	1	1	0	0
G2	D	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
	E	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0

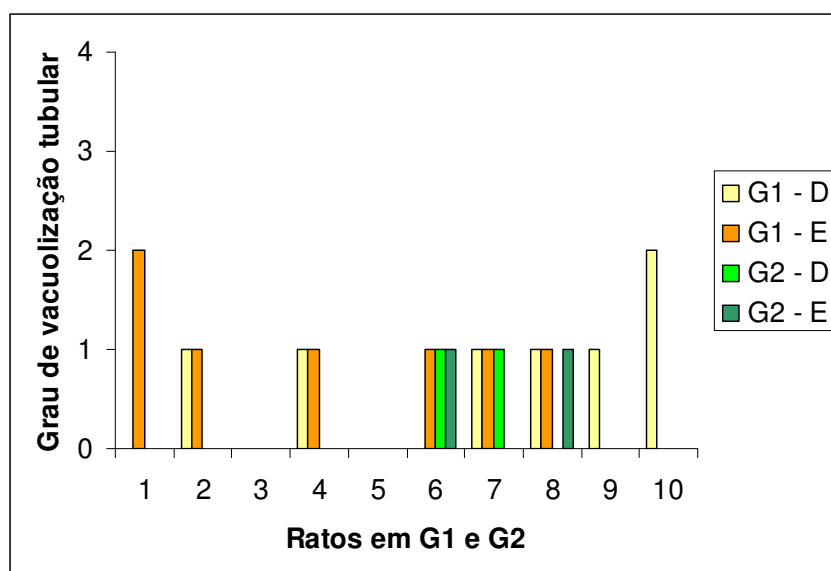


Figura 13 - Grau de vacuolização tubular. Escores de vacuolização tubular dos rins direito e esquerdo de cada rato em ambos os grupos.

Quadro 13 - Vacuolização tubular dos rins direito e esquerdo de cada rato em ambos os grupos. Estatística e comentário

Variável	Estatística	Comentário
Vacuolização tubular	$p < 0,05$	G1 > G2

5.14 Necrose

Tabela 14 - Grau de necrose. Escores dos rins direito (D) e esquerdo (E) de cada rato em ambos os grupos

Ratos		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
G1	D	1	3	1	0	0	0	2	2	2	3
	E	0	3	1	0	0	1	1	2	1	2
G2	D	2	1	0	0	0	3	0	1	0	0
	E	1	1	0	0	0	2	0	2	0	0

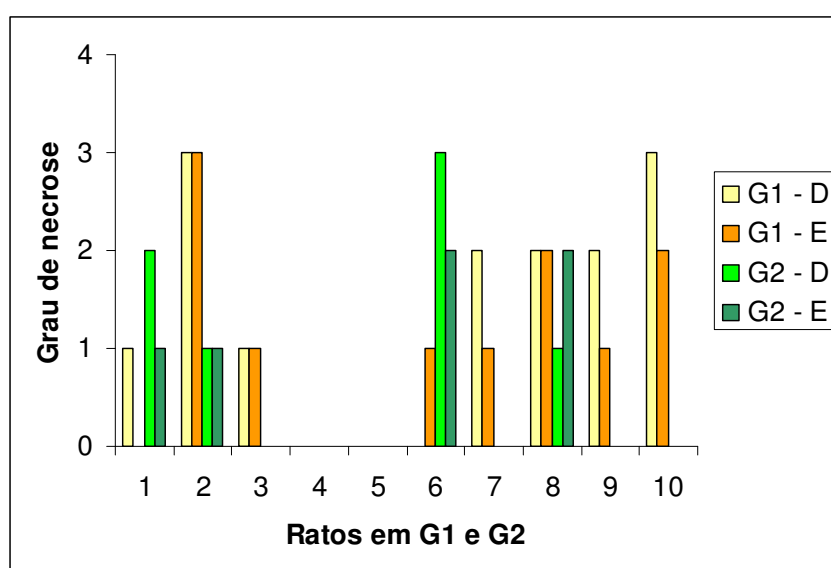


Figura 14 - Grau de necrose. Escores dos rins direito (D) e esquerdo (E) de cada rato em ambos os grupos.

Quadro 14 - Necrose dos rins direito e esquerdo de cada rato em ambos os grupos. Estatística e comentário

Variável	Estatística	Comentário
Necrose	$p > 0,10$	G1=G2

5.15 Regeneração tubular

Tabela 15 - Grau de regeneração tubular. Escores dos rins direito (D) e esquerdo (E) de cada rato em ambos os grupos

Ratos		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
G1	D	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	E	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
G2	D	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

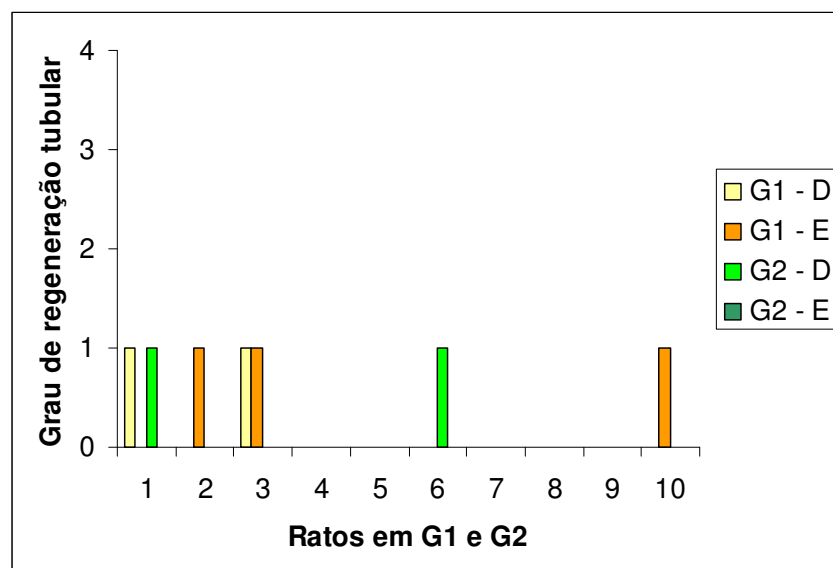


Figura 15 - Grau de regeneração tubular. Escores de regeneração tubular dos rins direito e esquerdo de cada rato em ambos os grupos.

Quadro 15 - Regeneração tubular dos rins direito e esquerdo de cada rato em ambos os grupos. Estatística e comentário

Variável	Estatística	Comentário
Regeneração tubular	$p > 0,10$	G1=G2

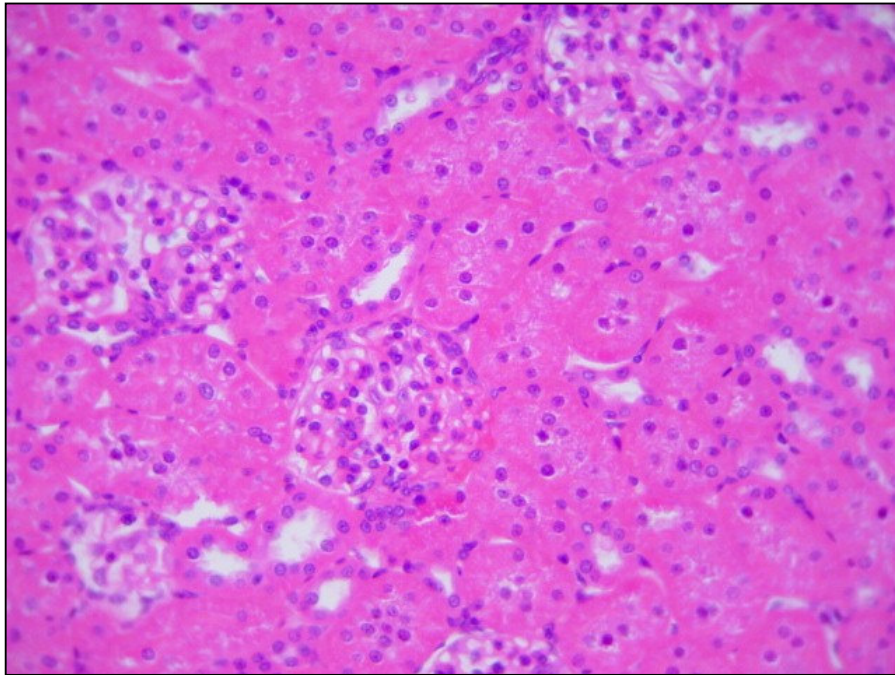


Figura 16 - Análise histológica de rim de rato de G2. Área preservada. HE-40x.

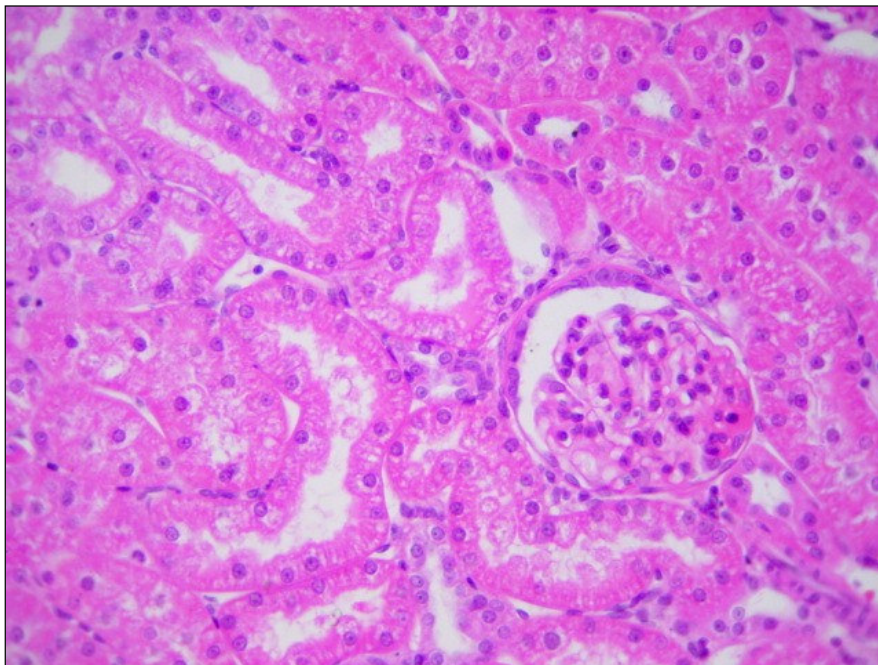


Figura 17 - Análise histológica de rim de rato de G1. Túbulos com vacuolização citoplasmática. HE-40x.

6.1 Modelo experimental

O presente estudo avalia a função e integridade morfológica renais de ratos submetidos a estímulo potencialmente pré-condicionante, anestesia com sevoflurano, e também submetidos a dois estímulos potencialmente agressores renais, sevoflurano e hipovolemia. A diferenciar os dois grupos da população estudada, tão-somente o pré-tratamento com glibenclamida, um bloqueador dos canais K^+_{ATP} .

O modelo experimental aplicado neste estudo para avaliar a função renal obedeceu à metodologia descrita por Rönnhedh *et al.* (1996), adequada ao animal do experimento. A obtenção de urina para a realização da medida do *clearance* renal é problemática em pequenos roedores devido ao reduzido volume, principalmente após hemorragia. As estimativas do fluxo plasmático renal, a partir do *clearance* de PAH, e do ritmo de filtração glomerular, com a utilização do *clearance* de IOT, já foram validadas anteriormente em ratos Fisher 344 e Wistar (Jaquenod *et al.*, 1998; Marangoni, 2005; De Souza Silva *et al.*, 2006). O método descrito satisfaz critérios de reprodutibilidade e garante boa medida do *clearance*. Estes critérios são importantes quando é necessária a comparação das medidas de *clearance* renal no mesmo animal em momentos diversos, antes e após tratamento. O *clearance* de creatinina requer coleta de amostras de sangue e urina, enquanto os de PAH e IOT podem ser facilmente realizados pela cromatografia líquida de alta performance.

6.2 População da amostra

Os animais utilizados no experimento foram aleatoriamente selecionados do Biotério Central da UNESP - Botucatu. Gerados e criados em cativeiro, foram submetidos às mesmas condições ambientais e alimentares, assim como a controles internos de idade e zoonoses. A captação e seleção apropriadas dos animais refletiram-se na homogeneidade da amostra, em ambos os grupos estudados, em relação ao atributo peso corporal (Tabela, Figura e Quadro 1). Em relação ao gênero dos animais, entretanto, não houve distribuição normal entre os grupos. Em G1 havia apenas um animal fêmea, enquanto que em G2 houve uniformidade na distribuição (50% fêmeas, 50% machos).

6.3 Ventilação espontânea

Annat *et al.* (1983), estudando os efeitos da ventilação com pressão positiva (VPPI) em pacientes internados em unidades intensivas, concluíram que este modo ventilatório resulta no aumento significativo da renina plasmática, aldosterona e vasopressina. Entretanto, Payen *et al.* (1987), também em estudo realizado em seres humanos, observaram que o mecanismo antidiurético da VPPI não estava associado ao aumento da vasopressina circulante. A opção por ventilação espontânea nos ratos de ambos os grupos mostrou-se interessante, neste experimento, por duas razões: menor alteração na concentração plasmática de substâncias que

comprometem a função renal e auxílio, com a observação da amplitude dos movimentos do tórax e da frequência respiratória, para a monitorização da adequação da anestesia.

6.4 Glibenclamida e hipoglicemia

A indicação clínica da glibenclamida é o tratamento da diabetes mellitus, em pacientes ainda sem indicação de insulino-terapia contínua. Atua nas células tipo β do pâncreas bloqueando os canais de K^+_{ATP} . Pompermayer *et al.* (2005), ao utilizarem glibenclamida em ratos, puderam medir os níveis glicêmicos após 4 h e 24 h e não observaram hipoglicemia na população da amostra, mas sim hiperglicemia; acreditaram que os níveis glicêmicos encontravam-se aumentados em decorrência do estresse cirúrgico, no caso, nefrectomia. No presente estudo, não se verificou a glicemia durante o experimento por tratar-se de intervenção aguda (< 4 h), fugindo do perfil farmacocinético da glibenclamida em relação à capacidade secretagoga. Evgenov *et al.* (2003) também não observaram alterações glicêmicas, em experimento de choque hemorrágico em ratos, com outra sulfoniluréia (glipizide), em contraste com o observado no grupo não submetido ao quadro de choque.

6.5 Temperatura

Os dados coletados (Tabela, Figura e Quadro 2) representam os valores da temperatura retal nos três momentos da pesquisa. Os valores medidos não variaram significativamente entre os grupos, nem entre os momentos, refletindo, possivelmente, o controle da temperatura durante todo o experimento com a utilização da manta térmica. Hipotermia, em situações de hipoperfusão, poderia ser fator de proteção renal, enquanto a hipertermia, em condições de isquemia, favoreceria o agravamento da lesão renal possivelmente por alterar a disponibilidade de ATP e promover aumento de radicais livres de oxigênio (Zager & Altschuld, 1986).

6.6 Hematócrito

A realização de sangrias, ao longo do experimento, determinou diminuição progressiva dos valores do hematócrito (Tabela, Figura e Quadro 4), muito embora, em episódios de hemorragia aguda, quedas abruptas de seus valores não sejam habitualmente observadas, pois o deslocamento de líquido do espaço intersticial para o intravascular requer certo intervalo de tempo. Contudo, pode-se atribuir a redução do hematócrito à reposição hídrica de manutenção, ao acréscimo do volume diluente das soluções com os agentes administrados (PAH, IOT) e à realização eventual de *bolus* de solução de Ringer com lactato que se fizeram necessários após cada sangria, para estabilização hemodinâmica. A população do grupo controle (G1) apresentou

valores iniciais maiores em M1, mas no decorrer do experimento os grupos mostraram decremento similar, tornando irrelevante a diferença inicialmente observada.

6.7 Pressão arterial média

Débito cardíaco (DC), pressão arterial média e pressão de perfusão renal são parâmetros que, prioritariamente, devem ser mantidos em seus valores fisiológicos a fim de se evitar disfunção renal. Anestésicos inalatórios com radical éter em suas composições químicas, como o sevoflurano, comportam-se como potentes vasodilatadores, podendo favorecer, inclusive, a manutenção do DC. Também, o sevoflurano não aumenta a pressão venosa central, em contraste com outros anestésicos inalatórios. Cahalan (1996) sugere, como hipótese possível, menor pós-carga no ventrículo direito com o sevoflurano.

Embora não haja definição quanto aos limites ideais do DC para a boa função renal, existe correlação entre este parâmetro e perfusão renal (Kellum *et al.*, 2005), de modo que a diminuição do DC irá reduzir também o ritmo de filtração glomerular. O córtex renal recebe 90% da fração do DC (20-25%) que chega ao rim e possui pressão parcial glomerular de oxigênio (PO_2) em torno de 95 mmHg, valores muito maiores do que aqueles encontrados na medula renal (10 mmHg) (Vianna & Castiglia, 2004). O impacto da pressão arterial média no ritmo de filtração glomerular é absorvido pela auto-regulação renal e, em princípio, não chega, – ainda que concomitantemente à administração da

maioria dos anestésicos (Stoelting & Hillier, 2006), a abolir a filtração glomerular.

O leito capilar glomerular situa-se entre dois sistemas de elevada resistência (arteríolas aferente e eferente), o que permite a manutenção da pressão hidrostática elevada ao longo de todo o leito. Considerando-se a pressão oncótica do fluido capsular quase nula, pois em condições normais não contém proteínas, além de constantes a permeabilidade hidráulica da membrana e a área da superfície filtrante, tem-se que a pressão de ultrafiltração, ou seja, a diferença entre a pressão hidráulica e oncótica (π_c) ao longo da circulação glomerular irá determinar o ritmo de filtração glomerular. A pressão média de ultrafiltração normal ao longo do glomérulo é estimada em 17 mmHg (Vander, 1995) e tem na pressão oncótica do capilar glomerular importante componente regulador, capaz de influenciar sobremaneira o ritmo de filtração glomerular.

No presente estudo, observando-se o comportamento da pressão arterial média (Tabela, Figura e Quadro 3), verificou-se que não houve, na análise dos momentos, variação significativa entre os grupos. Ocorreu, entretanto, queda gradativa de seus valores em M2 e M3, provavelmente conseqüente às sangrias, que embora progressivas e seguidas de eventual reposição volêmica, sucederam-se, ainda, em curto espaço de tempo.

A hipotensão validou a hemorragia como estímulo suficiente para ativação dos sistemas nervoso simpático e renina-angiotensina. Ambos os sistemas atuam na tentativa de manter o volume intravascular e interagindo em diversos sítios de ação. O sistema simpático renal induz à liberação de renina

por estimulação de receptores β_1 , já a angiotensina II, ao estimular receptores AT_1 , aumenta o tônus simpático renal, por mecanismo central e periférico (DiBona, 2001). Jackson *et al.* (2005) sugerem, ainda, que a estimulação de receptores α_2 adrenérgicos por noradrenalina também pode determinar ativação da angiotensina II.

A ativação dos canais K^+_{ATP} tem sido apontada como mecanismo importante na regulação da pressão arterial em estados de choque por vasodilatação (Landry *et al.*, 2001). Salzman *et al.* (1997) observaram, em porcos, melhora da pressão arterial sistêmica após injeção intravenosa em *bolus* de glibenclamida ($10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), além de terem obtido melhor fluxo sanguíneo renal e maior concentração cortical renal de ATP.

De Nicola *et al.* (1992) demonstraram, em ratos, antagonismo fisiológico entre óxido nítrico e angiotensina II. Estudo de choque hemorrágico, em porcos, mostrou associação entre canais K^+_{ATP} ativados e óxido nítrico (Musser *et al.*, 2004), confirmando pesquisas anteriormente realizadas em ratos, que evidenciaram a recuperação da pressão arterial média em choque hemorrágico tratado com inibidores de canais K^+_{ATP} (Md *et al.*, 2003). Lange *et al.* (2006), em estudo que utilizou protocolo de choque séptico em ovelhas, observaram efeito benéfico de glipizide (sulfoniluréia) sobre a pressão arterial. Também Evgenov *et al.* (2003) utilizaram glipizide, tanto por via venosa quanto intramuscular, em ratos, em experimento de choque hemorrágico, e observaram que houve melhora no desfecho (menor disfunção orgânica e maior sobrevivência imediata pós-choque).

6.8 Clearance de para-aminohipurato de sódio

O *clearance* de PAH permite a estimativa do fluxo plasmático renal efetivo (FPR_{efetivo}), isto porque os túbulos proximais possuem um eficiente mecanismo secretor, capaz de extrair integralmente o PAH do sangue peritubular. O PAH é ativamente transportado para o interior das células do túbulo contornado proximal através da membrana basolateral, e assim resulta o gradiente intracelular que irá facilitar sua difusão para o lúmen tubular. Este processo, entretanto, restringe-se ao córtex renal, mas permite que o *clearance* de PAH possa estimar cerca de 90% do fluxo plasmático renal.

Ao analisar-se o *clearance* de PAH em ambos os grupos, (Tabela, Figura e Quadro 5) pôde-se constatar significativa diminuição dos valores obtidos, neste atributo, no grupo controle em M3. Os valores das médias em M2 e M3 foram menores que os calculados em G2. Assim, esta diminuição do FPR_{efetivo} em G1 sugere aumento da resistência na arteríola aferente.

Considerando-se os resultados do *clearance* de PAH em G2, verifica-se que o FPR_{efetivo} foi maior que em G1 a partir de M2. Como não se observaram alterações significantes no fluxo sanguíneo renal, isto espelha possível vasodilatação da arteríola aferente e discreto aumento da resistência da arteríola eferente. Estas respostas fisiológicas favoreceram a manutenção do ritmo de filtração glomerular e também a elevação do FPR_{efetivo}, deixando a resistência vascular renal estável até o final do procedimento como consequência do refinado equilíbrio entre as resistências das arteríolas aferentes a eferentes. A fração de filtração manteve-se igualmente estável

durante o experimento, entretanto verificou-se que as frações calculadas para G2 foram menores do que aquelas deduzidas para o grupo controle. Estes resultados foram consistentes com aumento, em G2, do FPR efetivo proporcionalmente maior que o RFG, quando comparados com os mesmos valores absolutos do grupo controle – definitivamente um viés –, pertinente às frações.

6.9 Clearance de iotalamato de sódio

A estimativa do ritmo de filtração glomerular informa sobre a função renal com boa acurácia e pode ser obtida após a verificação do *clearance* de diversos agentes. A creatinina sérica seria um marcador muito útil para este fim caso não sofresse influências outras (idade, fármacos, dieta, tempo, massa muscular, etc.). Existem outros marcadores da filtração glomerular, como a inulina e radionuclídeos, ambos mais dispendiosos e de execução pouco prática tecnicamente (Adrogué & Madiás, 1998).

Neste estudo, o *clearance* de IOT não apresentou diferenças significantes ao analisar-se o comportamento deste atributo em ambos os grupos. Houve, apenas, tendência de $G2 \geq G1$ no momento controle, M1 (Tabela, Figura e Quadro 6). Entretanto, em G1 pôde-se observar efeito significativo em M3, indicativo de diminuição do ritmo de filtração glomerular.

6.10 Fração de filtração

A elevação da pressão oncótica ao longo do capilar glomerular é diretamente proporcional à fração do fluxo plasmático filtrado (fração de filtração - FF). Quando a pressão oncótica iguala-se à pressão hidrostática, a filtração deixa de ocorrer (ponto de equilíbrio).

Calcula-se a fração de filtração a partir dos *clearances* de IOT e PAH, portanto, a observância dos valores absolutos de ambas as variáveis deve ser considerada ao se compararem os resultados de uma fração. Neste estudo, o grupo controle apresenta FF maior que em G2, todavia, houve, naquele grupo, diminuição dos valores absolutos dos *clearances* de IOT e PAH.

6.11 Fluxo sangüíneo renal

Não houve diferença significativa entre os grupos e momentos. Entretanto, o fluxo plasmático renal efetivo apresentou-se maior em G2, conforme indicado pelo *clearance* de PAH. Valores menores de hematócrito em G2, comparativamente a G1, principalmente em M1, podem ter influenciado na estabilização do fluxo sangüíneo renal de G2 em relação a G1.

Fluxo sangüíneo elevado determina aumento do ritmo de filtração glomerular, tanto por aumento da pressão capilar, quanto por valores menos elevados da pressão oncótica (π_c) nas porções mais distais do capilar. Quando há vasoconstrição da arteríola aferente, observa-se redução da filtração

glomerular por redução do fluxo sangüíneo renal no glomérulo. De outro modo, o aumento da resistência na arteríola eferente (Re) retarda a saída do fluxo sangüíneo do glomérulo e, quando não muito intenso, também aumenta a filtração glomerular. A L-arginina, precursor do óxido nítrico, determina aumento do fluxo sangüíneo renal e ritmo de filtração glomerular e, quando administrada em infusão contínua em coelhos, houve melhor preservação da função renal do que no grupo controle, durante experimento de pré-condicionamento isquêmico, em ambos os rins. A hipótese plausível seria a ocorrência de vasodilatação da arteríola glomerular eferente subjacente à ação direta de óxido nítrico (Dagher *et al.*, 1995).

O aumento da produção de angiotensina II (sistema renina-angiotensina) resulta em vasoconstrição, preferencialmente de arteríola eferente (aumento da resistência), e redução do fluxo sangüíneo renal, sem comprometimento da filtração glomerular (Wilson & Aronson, 2001; Vianna & Castiglia, 2004). Maiores elevações da Re, entretanto, irão determinar maior fluxo plasmático renal efetivo com conseqüente aumento gradativo da pressão oncótica (π_c) e diminuição do ritmo de filtração glomerular.

6.12 Resistência vascular renal

Ao comparar-se a resistência vascular renal (RVR) calculada para ambos os grupos, verificou-se que em G2 houve significativa diminuição em relação a G1, em M2 e M3, acompanhando a redução da pressão arterial média, paralelamente, de modo que não se observou diminuição consistente

do fluxo sanguíneo renal. Rahgozar *et al.* (2003), em preparações de isquemia em rim isolado de ratos, adicionaram glibenclamida e diazóxido (separadamente e simultaneamente) ao perfusato e avaliaram a função renal (*clearance* de inulina e excreção fracionária de sódio). Após análise, observaram que a glibenclamida diminuiu a resistência vascular renal de modo significativo, embora não tenha alterado o ritmo de filtração glomerular em relação ao controle. O diazóxido não provocou alterações significantes. Preparações de rim isolado (*ex-vivo*) detêm viéses importantes quando não são utilizados neutrófilos e outros leucócitos no perfusato, já que um dos possíveis mecanismos da glibenclamida seria em canais de K^+ _{ATP} dos neutrófilos.

Segundo Cahalan (1996), o sevoflurano deprime o débito cardíaco em concentrações que variam de 1 a 1,5 CAM, recuperando-se após 2 CAM. O volume sistólico sofre diminuição de até 30% dos valores normais, talvez por não haver resposta cronotrópica cardíaca que possa compensar a diminuição da resistência vascular sistêmica observada. O tônus vascular agrega, na anestesia com sevoflurano, mais um fator dentre os muitos que têm propriedades de modulá-lo nos diversos tecidos orgânicos (ativação do sistema nervoso simpático, idade, tônus pré-existente, etc.). Todos os anestésicos inalatórios diminuem a pressão arterial sistêmica em função da dose utilizada. Enquanto halotano e enflurano têm propriedades farmacológicas que originarão efeitos depressores por ação preponderante na força contrátil, o sevoflurano, assim como o isoflurano e desflurano, atua interagindo sistemicamente na resistência vascular, o que aumenta a complexidade da compreensão dos resultados de suas ações. No presente estudo, o sevoflurano foi o único

anestésico utilizado, em ambos os grupos. Entretanto, efeitos endoteliais aditivos dependentes do sevoflurano e glibenclamida não podem ser afastados.

6.13 Análise histológica

A disfunção renal determinada por lesão de isquemia-reperfusão ocorre por dano glomerular e tubular, podendo resultar em insuficiência renal. O glomérulo, a exemplo de outros leitos capilares, quando agudamente agredido, ensaia alterações inflamatórias que, perpetuadas, poderão definitivamente comprometer a função orgânica. A hipoperfusão renal é a causa mais comum de insuficiência renal aguda e, ainda que não ocorra acentuada hipotensão arterial sistêmica, a hipoperfusão cortical pode determinar azotemia pré-renal com redução do ritmo de filtração glomerular. Deste modo, podem-se considerar as lesões isquêmicas renais como participantes de uma única síndrome, cujo grau de reversibilidade estará inversamente subordinado à intensidade do estímulo agressor (Vianna & Castiglia, 2004).

A inflamação aguda determina edema e hiper celularidade devido à infiltração leucocitária (neutrófilos e monócitos) assim como degeneração hidrópica das células mesangiais e endoteliais (Jones, 1977). Este processo resulta na obstrução do fluxo sangüíneo ao glomérulo e, conseqüentemente, diminuição na fração de filtração, apesar de a função tubular ainda permanecer eficaz. A necrose segmentar é irregular nas células tubulares, quase sempre

acompanhada de ruptura da membrana basal tubular. O surgimento de vacúolos claros nos túbulos renais, mais usualmente nos túbulos proximais, é normalmente associado a alterações hidroeletrólíticas (Robins, 1974).

A instalação aguda da isquemia rapidamente pode determinar perda da integridade do citoesqueleto, da polaridade celular e descamação da borda em escova dos túbulos proximais (Mahon & Shorten, 2006).

A *pars recta* do túbulo contorcido proximal é a estrutura inicialmente mais comprometida no córtex renal, enquanto na medula a alça de Henle, na sua porção mais larga, possui o maior risco de lesão hipóxica, possivelmente devido ao seu alto consumo de oxigênio (Wilson & Aronson, 2001).

Oligúria torna-se, na maioria das vezes, o primeiro sinal clínico intra-operatório de hipoperfusão renal, pois trata-se de mecanismo compensatório da hipovolemia aguda. Cerca de 60 minutos após seu início, porém, já se podem observar sinais de necrose tubular aguda (NTA), caso persistam os fenômenos desencadeantes, principalmente em pacientes com doença renal pré-existente ou exposição concomitante a agentes nefrotóxicos exógenos. Em modelos experimentais, entretanto, sinais de lesão em túbulos proximais ocorrem mais precocemente, ou seja, em poucos minutos de isquemia (Wilson & Aronson, 2001).

No presente estudo, como método comparativo das alterações histológicas entre os grupos, atribuíram-se escores a cada um dos achados histológicos (Rusafa Neto *et al.*, 2006). Ambos os grupos apresentaram diferenças estatísticas significantes em quatro dos seis atributos observados (p

< 0,05), de modo que, tão-somente em relação à presença de necrose e regeneração tubular, G1 e G2 não se distinguiram.

O grupo pré-tratado com a glibenclamida, ao exame histológico, apresentou menor repercussão, apesar de estresse similar (Figura 16). Ao exame constatou-se que, apesar da presença de dilatação tubular em G2, suas características foram consideradas discretas em treze dos vinte rins examinados (Tabela 10, Figura 10 e Quadro 10). Ao exame da vasculatura renal à procura de dilatação e congestão vascular, G2 sequer apresentou alterações histológicas, diferenciando-se sobremodo de G1 que mostrou evidências de dilatação (Tabela 11, Figura 11 e Quadro 11) e congestão vascular, discretas e moderadas (Tabela 12, Figura 12 e Quadro 12). Em G1 foram observados sinais de vacuolização tubular significativamente maiores que em G2, grupo que apresentou esta alteração em apenas quatro rins examinados que correspondiam a três animais (Tabela 13, Figuras 13 e 17, Quadro 13).

Os sinais de necrose celular em G2 (Tabela 13, Figura 13 e Quadro 13) foram considerados de discreta intensidade em ambos os rins de apenas um rato, enquanto que, em dois outros animais, um dos rins apresentava necrose moderada, e apenas em um dos animais havia sinais de intensa necrose. Também no grupo controle, apenas um animal apresentou sinais de necrose intensa, muito embora tivessem sido detectadas lesões necróticas discretas e moderadas em seis dos dez animais examinados neste grupo.

Como já esperado, devido ao curto intervalo de tempo entre a agressão e o exame histológico, os sinais de regeneração tubular foram pífios em ambos os grupos (Tabela 14, Figura 14 e Quadro 14)

Rahgozar *et al.* (2003), em preparações isoladas de rim de ratos, quantificaram parâmetros histológicos, também utilizando escores e adição de glibenclamida no perfusato e compararam com o grupo controle (sem isquemia, sem adição de fármaco). A análise histológica revelou a existência de alterações morfológicas renais nas preparações em que a glibenclamida foi empregada, principalmente em alça ascendente de Henle. Os autores fizeram, entretanto, a ressalva de que apesar da realização completa do exame histológico, os achados de lesão foram modestos.

6.14 Análise global dos resultados do experimento

Pompermayer *et al.* (2005) realizaram estudo com isquemia renal (45 min) em ratos Wistar e observaram que a glibenclamida, quando comparada ao diazóxido, inibiu o aumento da permeabilidade vascular associada à reperfusão (renal e pulmonar), assim como levou ao aparecimento de sinais de inflamação (acúmulo de neutrófilos e TNF- α). Não encontraram, porém, efeito supressor da hipotensão arterial sistêmica habitualmente observada no início da reperfusão. Os resultados mais expressivos que estes autores obtiveram no experimento foram, também, na histologia renal do grupo que utilizou a glibenclamida. Houve preservação da arquitetura e citologia renais, embora com discreta congestão vascular.

No presente estudo, o resultado do exame histológico renal também foi mais consistente que os achados funcionais, muito embora, quando da análise mais refinada dos dados coletados, tenha se constatado que o grupo submetido ao pré-tratamento com a glibenclamida apresentou comportamento dos atributos relativos à função renal mais favorável à proteção, tal qual Pompermayer *et al.* (2005) mostraram. Engbersen *et al.* (2005), em preparações de células epiteliais de túbulos proximais, também concluíram sobre a propriedade da glibenclamida em diminuir lesões renais induzidas por hipóxia. Alertaram, entretanto, para a observância da dose conveniente (10 mM, na preparação isolada).

Obal *et al.* (2006) realizaram estudo de pré-condicionamento isquêmico e farmacológico em ratos comparando grupos controle, *sham*,

isquêmico e com sevoflurano e, ao analisarem função e histologia renais, concluíram que não ocorreu pré-condicionamento, nem isquêmico, nem farmacológico (sevoflurano). Não atribuíram este fato, entretanto, à toxicidade do sevoflurano observada nos túbulos proximais de preparações isoladas (Kharasch *et al.*, 1993; Lochhead *et al.*, 1997). Concluíram que as lesões constatadas em suas preparações de pré-condicionamento não estariam relacionadas à ação nefrotóxica do sevoflurano. Os argumentos que apresentaram para este fato foram não terem utilizado absorvedor de CO₂ e sevoflurano em concentrações elevadas e por tempo prolongado.

Da Silva-Santos *et al.* (2002), em estudo de indução farmacológica da inflamação em ratos, observaram diminuição de exudação e migração de neutrófilos após glibenclamida, caracterizando possível ação antiinflamatória renal. Células dos túbulos renais são capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α e interleucina-6 (Bonventre & Weinberg, 2003).

A diminuição abrupta do ritmo de filtração glomerular pode determinar disfunção renal como resultado de lesões, quer nos túbulos contornados, quer na vasculatura glomerular, ou em ambos, simultaneamente. A alteração vasomotora pré-glomerular na diminuição da filtração glomerular, e conseqüente lesão renal, há muito é conhecida (Oken, 1984). Entretanto, é questionável a real importância deste mecanismo como principal responsável por estados de disfunção renal (Bonventre & Weinberg, 2003), principalmente quando se considera a distribuição e o consumo de oxigênio no tecido renal (menor fluxo medular). Estes mesmos autores ressaltam a importância dos mecanismos endoteliais mais recentemente revelados, tais como a expressão

de substâncias de adesão celular e a ativação leucocitária, de modo que mecanismos locais tubulares podem desencadear e perpetuar obstrução ao fluxo sangüíneo com conseqüências ao metabolismo celular, inclusive na própria auto-regulação do fluxo sangüíneo renal (Kwon *et al.*, 2002).

Na análise global dos resultados do presente estudo, isto é, considerando-se a interação entre os achados dos atributos funcionais e a histologia, pode-se supor a existência de mecanismos outros – além da regulação pré-glomerular do fluxo renal – que dêem suporte à proteção constatada histologicamente. Os mecanismos de proteção são múltiplos e muitas vezes redundantes, interagindo entre si (Jackson *et al.*, 2005). A glibenclamida, como agente de intervenção, também possui múltiplas ações, atuando paralelamente em outros sítios, antagonizando receptores tromboxano A_2 e inibindo a Na^+/K^+ ATPase (Ribalet *et al.*, 1996). Adenosina é importante na regulação do fluxo intra-renal e atua nos receptores A_{1a} e A_{2a} , estimulando o fluxo sangüíneo medular e a oferta de oxigênio. Todavia, além destas ações, a adenosina atua como “gatilho” no pré-condicionamento. As endotelinas também têm seu papel regulatório, revertendo, em algumas situações, ações do óxido nítrico (Vianna & Castiglia, 2004). Forbes *et al.* (2001) puderam observar que a ativação de receptores de endotelina B consegue promover a recuperação tecidual pós-isquêmica mais tardiamente (seis meses pós-isquemia), interferindo em mecanismos de apoptose celular.

Óxido nítrico, prostaglandinas (PGE_2), acetilcolina e bradicinina apresentam propriedades vasodilatadoras e contribuiriam para a proteção

renal, mitigando a resposta vasoconstritora, entretanto ainda faltam evidências científicas que justifiquem sua utilização.

Solez *et al.* (1974) foram precursores em determinar a presença leucocitária, conseqüente à congestão vascular na medula renal, revelando sua importância no desencadeamento da insuficiência renal aguda. Considerando-se a ausência completa de congestão vascular nos achados histológicos em G2 deste estudo, e a significativa diferença com o grupo controle, fica evidente a colaboração da glibenclamida no processo, o que torna mais robusta a hipótese de sua ação protetora renal preponderante como bloqueadora da migração de polimorfonucleares.

Não se deve esquecer, porém, que a ativação leucocitária ocorre localmente por diversos fatores, incluindo-se as citocinas e os radicais livres de oxigênio. Kelly *et al.* (1996a) utilizaram camundongos normais e geneticamente manipulados como não produtores de ICAM-1, importante molécula de adesão endotelial, e observaram que a ausência de ICAM-1 promovia proteção renal. Concluíram que ICAM-1 era um dos mediadores da insuficiência renal aguda e potencializava vias de interação entre neutrófilos e o endotélio.

Kelly *et al.* (1996b) apresentaram evidências que relacionam a ativação da cascata da coagulação à fisiopatologia da lesão renal isquêmica. Utilizaram inibidor de ativação plaquetária (Ro-24-4736) antes de isquemia em ratos e observaram proteção renal, por eles atribuída à diminuição da ação de mieloperoxidases.

O surgimento dos conceitos de pré- e pós-condicionamento motivou grande interesse científico sobre estes temas, principalmente a partir do

momento em que vários experimentos laboratoriais confirmaram a eficácia de diversos agentes farmacológicos, além do clássico pré-condicionamento isquêmico. Evidências que selem a importância destes agentes no desfecho clínico encontram-se em variados estágios de pesquisa, mas já ensejam um futuro promissor.

Julier *et al.* (2003) foram pioneiros nos estudos de pré-condicionamento renal em seres humanos. Após estabilização da circulação extracorpórea, verificaram alterações nos valores das dosagens plasmáticas de cistatina C e creatinina, utilizadas como marcadores da função renal. Concluíram que a preservação da filtração glomerular no período após circulação extracorpórea no grupo que utilizou sevoflurano, quando se comparou com o grupo placebo, estaria relacionada ao fenômeno pré-condicionante, embora não tenha sido possível, com este estudo, determinar que o melhor desempenho da função renal não tenha ocorrido devido apenas à melhora da condição cardiovascular. Outra hipótese a ser considerada como determinante do pré-condicionamento seria a ação do sevoflurano como agente bloqueador da resposta inflamatória, mecanismo diverso daquele observado no miócito.

A natureza interativa dos mecanismos de proteção tecidual (intrinsecamente, celulares, inflamatórios, endoteliais, tubulares, etc.), muitos dos quais mostram-se redundantes, apresenta entendimento e necessidade fisiológica ainda imprecisos (Jackson *et al.*, 2005), o que torna difícil sua distinção.

O desenho da maioria dos experimentos biomoleculares realizados laboratorialmente – na tentativa de detectar um mecanismo específico que relacione causa e efeito de agente-fenômeno biológico – promove o isolamento de muitas variáveis, na maioria das vezes muito afastadas da prática clínica. Experimentos que apresentem desenhos mais holísticos talvez possam trazer mais rapidamente à anestesiologia hospitalar evidências da pesquisa básica biomolecular.

Ao final deste estudo, pode-se inferir que a glibenclamida age em processos de proteção renal por mecanismo pré-condicionante ainda não bem estabelecido, havendo necessidade, portanto, de outros estudos que possam vir corroborar estes achados.

Nas condições metodológicas agudas deste experimento, a glibenclamida apresentou, no rato, indícios de proteção renal mais ao exame histológico do que na análise funcional.

8 REFERÊNCIAS

- Adroguè H, Madias N. Monitoring of renal function. In:Tobin MJ (editor). Principles and practice of intensive care monitoring. New York:McGraw-Hill; 1998. p.1060-2
- Allen DG, Xiao XH. Role of the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger during ischemia and reperfusion. Cardiovasc Res. 2003;57:934-41.
- Annat G, Viale JP, Bui Xuan B, Hadj Aissa O, Benzoni D, et al. Effect of PEEP ventilation on renal function, plasma renin, aldosterone, neurophysins and urinary ADH, and prostaglandins. Anesthesiology. 1983;58:136-41
- Baines CP, Song CX, Zheng YT, Wang GW, Zhang J, Wang OL et al. Protein kinase C epsilon interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria. Circ Res. 2003; 92:873-80.
- Beesley AH, Qureshi IZ, Giesberts AN, Parker AJ, White SJ. Expression of sulphonylurea receptor protein in mouse kidney. Pflugers Arch. 1999; 438:1-7.
- Beltowski J, Marciniak A, Wójcicka D, Górny D. Nitric oxide decrease renal medullary Na⁺, K⁺-ATPase activity through cyclic GMP-protein kinase G dependent mechanism. J Physiol Pharmacol. 2003;54:191-210.
- Bland JH, Lowenstein E. Halothane-induced decrease in experimental myocardial ischemia in the non-failing canine heart. Anesthesiology. 1976; 45:287-93.
- Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. J Am Soc Nephrol. 2003;14:2199-210.
- Bonventre JV. Kidney ischemic preconditioning. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2002;11:43-8.
- Buljubasic N, Marijic J, Stowe DF, Kampine JP, Bosnjak ZJ. Halothane reduces dysrhythmias and improves contractile function after global hypoperfusion in isolated hearts. Anesth Analg. 1992;74:384-94.

Cahalan MK. Hemodynamic effects of inhaled anesthetics. Review course lecture;1996 Mar 8-12; Washington: USA. *Anesth Analg*.1996.

Carreira RS, Facundo HTF, Kowaltowski AJ. Mitochondrial K⁺ transport and cardiac protection during ischemia/reperfusion. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38:345-52.

Cason BA, Gamperl AK, Slocum RE, Hickey RF. Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits. *Aneststhesiology*. 1997; 87:1182-90.

Cheng YJ, Chien CT, Wang YP, Fu TC, Chen TL, et al. Fluid administration prevents renal dysfunction during hypotension under spinal anesthesia in a rat model. *Acta Anaesthesiol Sin*. 2003;41:7-12.

Chertow GM, Levy EM, Hammermeister KE, Grover F, Daley J. Independent association between acute renal failure and mortality following cardiac surgery. *Am J Med*. 1998;104:343-8.

Cleveland Jr JC, Meldrum DR, Cain BS, Barejee A, Harken AH. Oral sulfonylurea hypoglycemic agents prevent ischemic preconditioning in human myocardium. Two paradoxes revisited. *Circulation*. 1997;96:29-32

Coetzee JF, le Roux PJ, Genade S, Lochner A. Reduction of postischemic contractile dysfunction of the isolated rat heart by sevoflurane: comparison with halothane. *Anesth Analg*. 2000;90:1089-97.

Colleti AE, Vogl HW, Rahe T, Zambraski EJ. Effects of acetaminophen and ibuprofen on renal function in anesthetized normal and sodium-depleted dogs. *J Appl Physiol*. 1999;86:592-7.

Cope DK, Impastato WK, Cohen MV, Downey JM. Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. *Anesthesiology*. 1997;86:699-709.

Curi PR. Metodologia e análise de pesquisa em Ciências Biológicas. Botucatu: Editora Topomic; 1997.

Da Silva-Santos JE, Santos-Silva MA, Cunha FQ, Assreuy J. The role of ATP-sensitive potassium channels in neutrophil migration and plasma exudation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;300:946-51.

Dagher F, Pollina RM, Dwain M, Rogers DM, 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*. 1995;21:453-8.

De Hert SG, Van der Linden PJ, Cromheecke S, Meeus R, Nelis A, Van Reeth V, et al. Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration. *Anesthesiology*. 2004;101:299-310.

De Hert SG. Cardioprotection with volatile anesthetics: clinical relevance. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2004;17:57-62

De Nicola L, Blantz RC, Gabbai FB. Nitric oxide and angiotensin II. Glomerular and tubular interaction in the rat. *J Clin Invest*. 1992;89:1248-56.

De Souza Silva M, Castiglia, YMM, Vianna PTG, Viero RM, Braz, JRC, Cassetari ML. Rat model of depending prostaglandin renal state: effect of ketoprofen. *Ren Fail*. 2006; 28:77-84.

DiBona GF. Peripheral and central interactions between the renin-angiotensin system and the renal sympathetic nerves in control of renal function. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;940:395-406.

Dragun D, Lukitsch I, Tullius SG, Qun Y, Park JK, Schneider W et al. Inhibition of intercellular adhesion molecule-I with antisense deoxynucleotides prolongs renal isograft survival in the rat. *Kidney Int*. 1998;54:2113-22.

Du ZY, Hicks M, Winlaw D, Spratt P, Macdonald P. Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rat. *J Heart Lung Transplant.* 1996;15:1258-67.

Dunn MJ, Zambraski EJ. Renal effects of drugs that inhibit prostaglandin synthesis. *Kidney Int.* 1980; 18:609-22.

Engbersen R, Masereeuw R, van Gestel MA, van der Logt EM, Smits P, Russel FGMI. Glibenclamide depletes ATP in renal proximal tubular cells by interfering with mitochondrial metabolism. *Br J Pharmacol.* 2005;145:1069-75.

Erni D, Banic A, Wheatley AM, Sigurdsson GH. Haemorrhage during anaesthesia and surgery: continuous measurement of microcirculatory blood flow in the kidney, liver, skin and skeletal muscle. *Eur J Anaesthesiol.* 1995;12:423-9.

Evgenov OV, Pacher P, Williams W, Evgenov NV, Mabley JG, Cicila J et al. Parenteral administration of glipizide sodium salt, an inhibitor of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels, prolongs short-term survival after severe controlled hemorrhage in rats. *Crit Care Med.* 2003;31:2429-36.

Forbes JM, Hewitson TD, Becker GJ, Jones CL. Simultaneous blockade of endothelin A and B receptors in ischemic acute renal failure is detrimental to long-term kidney function. *Kidney Int.* 2001;59:1333-41.

Freedman BM, Hamm DP, Everson CT, Wechsler AS, Christian CM. Enflurane enhances postischemic functional recovery in the isolated rat heart. *Anesthesiology.* 1985;62:29-33.

Fröhlich D, Rothe G, Wittmann S, Schmitz G, Schmid P, et al. Nitrous oxide impairs the neutrophil oxidative response. *Anesthesiology.* 1998;88:1281-90

Garcia-Dorado D, Théroux P, Munoz R, Alonso J, Elizaga J, Fernandez-Avilés F, et al. Favorable effects of hyperosmotic reperfusion on myocardial edema and infarct size. *Am J Physiol.* 1992;.262:H17-H22.

Garlid KD, Paucek P. Mitochondrial potassium transport: the K(+) cycle. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1606:23-41.

Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA et al. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation*. 1996;94:2193-200.

Gogelein H, Ruetten H, Albus U, Englert HC, Busch AE. Effects of the cardioselective KATP channel blocker HMR 1098 on cardiac function in isolated perfused working rat hearts and in anesthetized rats during ischemia and reperfusion. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2001;364:33-41.

Gres P, Schulz R, Jansen J, Umschlag C, Heusch G. Involvement of endogenous prostaglandins in ischemic preconditioning in pigs. *Cardiovasc Res*. 2002;55:626-32.

Gribble FM, Reimann F. Differential selectivity of insulin secretagogues: mechanisms, clinical implications, and drug interactions. *J Diabetes Complications*. 2003;17:11-5

Guarnieri C, Flamigni F, Caldarera CM. Role of oxygen in the cellular damage induced by re-oxygenation of hypoxic heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1980;12:797-808.

Gunther GR, Herring MB. Inhibition of neutrophil superoxide production by adenosine released from vascular endothelial cells. *Ann Vasc Surg*. 1991;5:25-30.

Haessler R, Kuzume K, Chien GL, Wolff RA, Davis RF, Van Winkle DM. Anaesthetics alter the magnitude of infarct limitation by ischaemic preconditioning. *Cardiovasc Res*. 1994;28:1574-80.

Hanley PJ, Daut J. K⁺ ATP channels and preconditioning: A re-examination of the role of mitochondrial K⁺ ATP channels and an overview of alternative mechanisms. *J Mol Cell Cardiol*. 2005; 39:17-50.

- Haq M, Norman J, Saba SR, Ramirez G, Rabb H. Role of IL-1 in renal ischemic reperfusion injury. *J Am Soc Nephro.* 1998; 9:614-9.
- Hashiguchi H, Morooka H, Miyoshi H, Matsumoto M, Koji T, Sumikawa K. In response to:[letter]. *Anesth Analg.* 2006;103:1054.
- Hausenloy DJ, Yellon DM. Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res.* 2006;70:240-53.
- Herrera-Gutierrez ME, Sellar-Perez G, Maynar-Moliner J, Sanchez,Izquierdo-Riera JA. Epidemiology of acute kidney failure in Spanish ICU. Multicenter prospective study FRAMI. *Med Intensiva.* 2006;30:260-7.
- Hess ML, Okabe E, Ash P, Kontos HA. Free radical mediation of effects of acidosis on calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum in whole heart homogenates. *Cardiovasc Res.* 1984; 18:149-57.
- Hotter G, Closa D, Prados M, Fernandez-Cruz L, Prats N, Gelpi E et al. Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;222:27-32.
- Jackson EK, Gao L, Zhu C. Mechanism of the vascular angiotensin II/alpha2-adrenoceptor interaction. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;314:1109-16.
- Jaquenod M, Ronnhedh C, Cousins MJ, Eckstein RP, Jordan V, et al. Factors influencing ketorolac-associated perioperative renal dysfunction. *Anesth Analg.* 1998;86:1090-7.
- Jones DB. Kidneys. In: Anderson, WAD, Kissane JM. (editores). *Pathology.* St. Louis: The C.V. Mosby Company; 1977. p. 930-2.
- Julier K, Da Silva R, Garcia C, Bestmann L, Frascarolo P, et al. Preconditioning by Sevoflurane Decreases Biochemical Markers for Myocardial and Renal Dysfunction in Coronary Artery Bypass Graft Surgery: A Double-blinded, Placebo-controlled, Multicenter Study. *Anesthesiology.* 2003;98:1315-27.

Kaasik A, Safiulina D, Zharkovsky A, Veksler V. Regulation of Mitochondrial Matrix Volume. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006; 26. Epub ahead of print.

Kellum JÁ, Leblanc W, Gibney NRT, Lieberthal W, Ronco C, Tumlin J. Primary prevention of acute renal failure in the critical il. *Curr Opin Crit Care*. 2005;11:537-41.

Kelly KJ, Tolhoff-Rubin NE, Rubin RH, Williams Jr WW, Meehan SM, Meschter CL, et al. An oral platelet-activating factor antagonist, Ro-24-4736, protects the rat kidney from ischemic injury. *Am J Physiol*. 1996b;271:F1061-7.

Kelly KJ, Williams Jr WW, Colvin RB, Meehan SM, Springer TA, et al. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest*. 1996a;97:1056-63.

Kerrigan CL, Stotland MA. Ischemia perfusion injury: a review. *Microsurgery*. 1993;14:165-75.

Kersten JR, Schmeling TJ, Hettrick DA, Pagel PS, Gross GJ, Wartier DC. Mechanism of myocardial protection by isoflurane. Role of adenosine triphosphate-regulated potassium (KATP) channels. *Anesthesiology*. 1996;85:794-807

Kevin LG, Novalija E, Riess ML, Camara AK, Rhodes SS, Stowe DF. Sevoflurane exposure generates superoxide but leads to decreased superoxide during ischemia and reperfusion in isolated hearts. *Anesth Analg*. 2003;96:949-55.

Kharasch ED, Schroeder JL, Bammler T, Beyer R, Srinouanprachanh S. Gene expression profiling of nephrotoxicity from the sevoflurane degradation product fluoromethyl-2,2-difluoro-1-(trifluoromethyl)vinyl ether ("compound A") in rats. *Toxicol Sci*. 2006;90:419-31.

Kharasch ED, Thummel KE. Identification of cytochrome P450 2E1 as the predominant enzyme catalyzing human liver microsomal defluorination of sevoflurane, isoflurane, and methoxyflurane. *Anesthesiology*. 1993;79:795-807

Kowalski C, Zahler S, Becker Bf, Flaucher A, Conzen PF, Gerlach E, Peter K. Halothane, isoflurane and sevoflurane reduce postischemic adhesion of neutrophils in the coronary system. *Anesthesiology*. 1997;86:188-95.

Krause KH, Welsh MJ. Voltage-dependent and Ca²⁺(+)-activated ion channels in human neutrophils. *J Clin Invest*. 1990;85:491-8.

Krentz A, Bailey C. Oral antidiabetic agents. *Drugs*. 2005;65:385-411.

Kume M, Yamamoto Y, Saad S, Gomi T, Kimoto S et al. Ischemic preconditioning of the liver in rats: implications of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury. *J Lab Clin Med*. 1996;128:251-8.

Kwon O, Phillips CL, Molitoris BA. Ischemia induces alterations in actin filaments in renal vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;282:F1012-9.

Landry DW, Oliver JA. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med*. 2001;345:588-95.

Lange M, Szabo C, Van Aken H, Williams W, Traber DL, Daudel F, et al. Short-term effects of glipizide (an adenosine triphosphate-sensitive potassium channel inhibitor) on cardiopulmonary hemodynamics and global oxygen transport in healthy and endotoxemic sheep. *Shock*. 2006;26:516-21.

Lecour S, Suleman N, Deuchar GA, Somers S, Lacerda L, Huisamen B, et al. Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor-alpha activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase). *Circulation*. 2005;112:3911-8.

Lee HT, Ota-Setlik A, Fu Y, Nasr SH, Emala CW. Differential protective effects of volatile anesthetics against renal ischemia-reperfusion injury in vivo. *Anesthesiology*. 2004;101:1313-24.

Lee HT. Renal protection with isoflurane. [letter]. *Anesth Analg*. 2006;103:1053-4.

Lima R, Tardim JCBM, Barros ME, Boim MA. Role of ATP-sensitive potassium channels in normal and hypertension-associated pregnancy in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006;33:780-6.

Liu GS, Thornton J, Winkle DM van, Stanley AWH, Osson RA, Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptor in rabbit heart. *Circulation*. 1991;84:350-6

Lochhead KM, Kharasch ED, Zager RA. Spectrum and subcellular determinants of fluorinated anesthetic-mediated proximal tubular injury. *Am J Pathol*. 1997;150:2209-21.

Lochner A, Harper IS, Salie R, Genade S, Coetzee AR. Halothane protects the isolated rat myocardium against excessive total intracellular calcium and structural damage during ischemia and reperfusion. *Anesth Analg*. 1994;79:226-33.

Mahon P, Shorten G. Perioperative acute renal failure. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2006;19:332-8.

Marangoni MA. Função e histologia renais após hemorragia aguda em ratos sob a ação da dexmedetomidina. [Tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2005.

Mather LE, Runciman WB. The physiological basis of pharmacokinetics: concepts and tools. In: Stoeckel H, ed. *Quantitation, Modelling and Control in Anaesthesia*. Stuttgart, George Thieme Verlag. 1985,12-40.

- Matsuyama K, Chiba Y, Ihaya A, Kimura T, Tanigawa N, Muraoka R. Effect of spinal cord preconditioning on paraplegia during cross-clamping of the thoracic aorta. *Ann Thorac Surg.* 1997;63:1315-20.
- McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Eng J Med.* 1985; 17:312:159-63.
- Md S, Moochhala SM, Siew-Yang KL. The role of inducible nitric oxide synthase inhibitor on the arteriolar hyporesponsiveness in hemorrhagic-shocked rats. *Life Sci.* 2003;73:1825-34.
- Meinert CL, Knatterud GL, Prout TE, Klimt CR. A study of the effects of hypoglycemic agents on vascular complications in patients with adult-onset diabetes. II Mortality results. *Diabetes.* 1970;19:789-830.
- Meldrum DR, Donnahoo KK. Role of TNF in mediating renal insufficiency following cardiac surgery: evidence of a postbypass cardiorenal syndrome. *J Surg Res.* 1999;85:185-99.
- Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am J Physiol.* 1992; 263:H1901-6.
- Morrison DF, editor. *Multivariate statistical methods.* New York: McGrawHil; 1967.
- Müllenheim J, Ebel D, Bauer M, Otto F, Heinen A, Frassdorf J, et al. Sevoflurane confers additional cardioprotection after ischemic late preconditioning in rabbits. *Anesthesiology.* 2003; 99:624-31.
- Murphy E, Glasgow W, Fralix T, Steenbergen C. Role of lipoxygenase metabolites in ischemic preconditioning. *Circ Res.* 1995;76:457-67.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia. A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;74:1124-36.

Musser JB, Bentley TB, Griffith S, et al. Hemorrhagic shock in swine: nitric oxide and potassium sensitive adenosine triphosphate channel activation. *Anesthesiology*. 2004;101:399-408.

Nakagawara M, Takeshige K, Takamatsu J, Takahashi S, Yoshitake J, Minakami S. Inhibition of superoxide production and Ca²⁺ mobilization in human neutrophils by halothane, enflurane, and isoflurane. *Anesthesiology*. 1986;64:4-12.

Nakamura T, Kashimoto S, Oguchi T, Kumazawa T. Hydroxyl radical formation during inhalation anesthesia in the reperfused working rat heart. *Can J Anaesth*. 1999;46:470-5.

Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol*. 1990;259:C3-18.

Notsu T, Ohhashi K, Tanaka I, Ishikawa H, Niho T, et al. Related Articles, Links 5-Hydroxydecanoate inhibits ATP-sensitive K⁺ channel currents in guinea-pig single ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol*. 1992;220:35-41.

Novalija E, Fujita S, Kampine JP, Stowe DF. Sevoflurane mimics ischemic preconditioning effects on coronary flow and nitric oxide release in isolated hearts. *Anesthesiology*. 1999;91:701-12.

Novalija E, Kevin LG, Eells JT, Henry MM, Stowe DF. Anesthetic preconditioning improves adenosine triphosphate synthesis and reduces reactive oxygen species formation in mitochondria after ischemia by a redox dependent mechanism. *Anesthesiology*. 2003;98:101.

O'Rourke B. Myocardial KATP channels in preconditioning. *Circ Res*. 2000;87:845-55.

Obal D, Dettwiler S, Favoccia C, Rascher K, Preckel B, et al. Effect of sevoflurane preconditioning on ischaemia/reperfusion injury in rat kidney in vivo. *Eur J Anaesthesiol.* 2006;23:319-26.

Oken DE. Hemodynamic basis for human acute renal failure (vasomotor nephropathy). *Am J Med.* 1984;76:702-10.

Opie LH. Cardiologists are living through exciting times. The example of postconditioning to protect the human heart during revascularization. *Ann Cardiol Angiol.* 2006;55:64-5.

Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:

Pang CY, Neligan P, Zhong A, He W, Xu H, Forrest CR. Effector mechanism of adenosine in acute ischemic preconditioning of skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol.* 1997;273:R887-95.

Payen DM, Brun-Buisson CJ, Carli PA, Huet Y, Leviel F, et al. Hemodynamic, gas exchange, and hormonal consequences of LBPP during PEEP ventilation. *J Appl Physiol.* 1987;62:61-70.

Pompermayer K, Souza DG, Lara GG, Silveira KD, Cassali GD, et al. The ATP-sensitive potassium channel blocker glibenclamide prevents renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Kidney Int.* 2005;67:1785-96.

Preckel B, Thamer V, Schlack W. Beneficial effects of sevoflurane and desflurane against myocardial reperfusion injury after cardioplegic arrest. *Can J Anaesth.* 1999;40:1076-81.

Rahgozar M, Willgoss DA, Gobé GC, Endre ZH. ATP-dependent K⁺ channels in renal ischemia -reperfusion injury. *Ren Fail.* 2003;25:885-96.

Rehring TF, Shapiro JI, Cain BS, Meldrum DR, Cleveland JC, Harken AH et al. Mechanisms of pH preservation during global ischemia in preconditioned rat heart: roles for PKC and NHE. *Am J Physiol.* 1998;275:H805-13.

Ribalet B, Mirell CJ, Johnson DG, Levin SR. Sulfonylurea binding to a low-affinity site inhibits the Na/K-ATPase and the KATP channel in insulin-secreting cells. *J Gen Physiol.* 1996;107:231-41.

Riddle MC. Sulfonylureas differ in effects on ischemic preconditioning - Is it time to retire glyburide? *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:528-30.

Robins SL. *Patologia estrutural e funcional.* Rio de Janeiro: Interamericana; 1974.

Rodrigo GC, Standen NB. ATP-sensitive potassium channels. *Curr Pharm Des.* 2005;11:1915-40.

Rönnhedh C, Jaquenod M, Mather LE. Urineless estimation of glomerular filtration rate and renal plasma flow in the rat. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1996;36:123-9.

Rusafa Neto E, Vianna PT, Viero RM, Módolo NS, Braz RC, Castiglia YMM. Influence of S(+)-ketamine analgesia in renal intraoperative ischemia: histological study in rats. *Acta Cir Bras.* 2006;21:242-6.

Salzman AL, Vromen A, Denenberg A, Szabo C. K(ATP)-channel inhibition improves hemodynamics and cellular energetics in hemorrhagic shock. *Am J Physiol.* 1997;272:H688-94.

Schlack W, Hollmann M, Stunneck J, Thamer V. Effect of halothane on myocardial reoxygenation injury in the isolated rat heart. *Br J Anaesth.* 1996;76:860-7.

Scognamiglio R, Avogaro A, Kreutzenberg SV, Negut C, Palisi M, et al. Effects of treatment with sulfonylurea drugs or insulin on ischemia-induced myocardial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51:808-12.

Sergeev P, da Silva R, Lucchinetti E, Zaugg K, Pasch T, Schaub MC et al. Trigger-dependent gene expression profiles in cardiac preconditioning: evidence for distinct genetic programs in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology*. 2004;100:474-88.

Siegel S. *Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento*. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil; 1975.

Siegmund B, Schlack W, Ladilov YV, Balsler C, Piper HM. Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture. *Circulation*. 1997;96:4372-9.

Solez K, Kramer EC, Fox JA, Heptinstall RH. Medullary plasma flow and intravascular leukocyte accumulation in acute renal failure. *Kidney Int*. 1974;6:24-37.

Stephan D, Winkler M, Kühner P, Russ U, Quast U. Selectivity of repaglinide and glibenclamide for pancreatic over the cardiovascular K(ATP) channels. *Diabetologia*. 2006;49:2039-48.

Stoelting RK, Hillier SC. *Pharmacology & physiology in anesthetic practice*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.

Stowe DF, Kevin LG. Cardiac preconditioning by volatile anesthetic agents: a defining role for altered mitochondrial bioenergetics. *Antioxid Redox Signal*. 2004;6:439-48.

Tanaka K, Weihrauch D, Kehl F, Ludwig LM, LaDisa Jr JF, et al. Mechanism of preconditioning by isoflurane in rabbits: a direct role for reactive oxygen species. *Anesthesiology*. 2002;97:1485-90.

- Terzic A, Jehangir A, Kurachi Y. Cardiac ATP-sensitive K channels: regulation by intracellular nucleotides and K channel opening drugs. *Am J Physiol.* 1995; 269:C525-45.
- Toller WG, Kersten JR, Pagel PS, Hettrick DA, Warltier DC. Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Anesthesiology.* 1999;91:1437-46.
- Toma O, Weber NC, Wolter JI, Obal D, Preckel B, Schlack W. Desflurane preconditioning induces time-dependent activation of protein kinase C epsilon and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 in the rat heart in vivo. *Anesthesiology.* 2004;101:1372-80.
- Tong H, Chen W, Steenbergen C, Murphy E. Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C. *Circ Res.* 2000;87:309-15.
- Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Carr RD, Yellon DM. Preconditioning the diabetic heart: the importance of akt phosphorylation. *Diabetes.* 2005;54:2360-4.
- Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimastu H, Morgera S, et al. Acute Renal Failure in Critically Ill Patients. A Multinational, Multicenter Study. *JAMA.* 2005;294:813-8.
- Vander A J. *Renal Physiology.* New York: McGraw-Hill Inc. Health Professions Division; 1995.
- Vianna PTG, Castiglia YMM. Fisiologia e fisiopatologia renal. In: Manica J e colaboradores. *Anestesiologia princípios e técnicas.* Porto Alegre: ArtMed; 2004. p.291-2.
- Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Zatta AJ, Kin H, Halkos ME, Kerendi F. Postconditioning - A new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol.* 2005; 100:295-310.

- Wang S, Cone J, Liu Y. Dual roles of mitochondrial K(ATP) channels in diazoxide-mediated protection in isolated rabbit hearts. *Am J Physiol Heart Physiol.* 2001;280:H246-55.
- Watanabe K, Yaoita H, Ogawa K, Oikawa M, Maehara K, Maruyama Y, et al. Attenuated cardioprotection by ischemic preconditioning in coronary stenosed heart and its restoration by carvedilol. *Cardiovasc Res.* 2006;71:537-47.
- Weber NC, Toma O, Wolter JI, Obal D, Mullenheim J, et al. The noble gas Xenon induces pharmacological preconditioning in the rat heart in vivo via induction of PKC-epsilon and p38MAPK. *Br J Pharmacol.* 2005a; 144:123-32.
- Weber NC, Toma O, Awan S, Frassdorf J, Preckel B, Schlack W. Effects of nitrous oxide on the rat heart in vivo: another inhalational anesthetic that preconditions the heart? *Anesthesiology.* 2005b;103:1174-82.
- Wilson WC, Aronson S. Oliguria. A sign of renal success or impending renal failure? *Anesthesiol Clin North Am.* 2001;19:841-83.
- Wintrobe MW. A hematological odyssey, 1936-1966. *Johns Hopkins Med J.* 1967;120:287-309.
- Xuan YT, Guo Y, Han H, Zhu Y, Bolli R. An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:9050-5.
- Xuan YT, Guo Y, Zhu Y, Han H, Langenbach R, Dawn B, et al. Mechanism of cyclooxygenase-2 upregulation in late preconditioning. *J Mol Cell Cardiol.* 2003;35:525-37.
- Zager RA, Altschuld R. Body temperature an important determinant of severity of ischemic renal injury. *Am J Physiol.* 1986;251:87-93.
- Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn DR, Pasch T, Schaub MC. Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial KATP channels via multiple signaling pathways. *Anesthesiology.* 2002;97:4-14.

Tabela 16 - Resultados do exame histopatológico dos rins dos ratos de G1

	G1 - Controle					
	Dilatação tubular	Dilatação vascular	Congestão vascular	Vacuolização tubular	Necrose	Regeneração tubular
Rat 1-D	1+	1+	1+	0	1+	1+
Rat 1-E	3+	1+	1+	2+	0	0
Rat 2-D	1+	1+	1+	1+	3+	0
Rat 2-E	3+	1+	0	1+	3+	1+
Rat 3-D	1+	1+	1+	0	1+	1+
Rat 3-E	1+	1+	2+	0	1+	1+
Rat 4-D	2+	1+	0	1+	0	0
Rat 4-E	3+	2+	2+	1+	0	0
Rat 5-D	2+	1+	0	0	0	0
Rat 5-E	1+	1+	0	0	0	0
Rat 6-D	2+	2+	2+	0	0	0
Rat 6-E	1+	1+	0	1+	1+	0
Rat 7-D	2+	1+	2+	1+	2+	0
Rat 7-E	1+	1+	0	1+	1+	0
Rat 8-D	1+	1+	0	1+	2+	0
Rat 8-E	1+	1+	0	1+	2+	0
Rat 9-D	2+	1+	0	1+	2+	0
Rat 9-E	1+	0	0	0	1+	0
Rat 10-D	3+	3+	0	2+	3+	0
Rat 10-E	1+	1+	0	0	2+	1+

Score: 1+ = leve; 2+ = moderado; 3+ = intenso.

Tabela 17 - Resultados do exame histopatológico dos rins dos ratos de G2

G2 - Glibenclamida						
	Dilatação tubular	Dilatação vascular	Congestão vascular	Vacuolização tubular	Necrose	Regeneração tubular
Rat 1-D	1+	0	0	0	2+	1+
Rat 1-E	0	0	0	0	1+	0
Rat 2-D	1+	0	0	0	1+	0
Rat 2-E	1+	0	0	0	1+	0
Rat 3-D	1+	0	0	0	0	0
Rat 3-E	1+	0	0	0	0	0
Rat 4-D	1+	0	0	0	0	0
Rat 4-E	1+	0	0	0	0	0
Rat 5-D	1+	0	0	0	0	0
Rat 5-E	1+	0	0	0	0	0
Rat 6-D	1+	0	0	1+	3+	1+
Rat 6-E	1+	0	0	1+	2+	0
Rat 7-D	0	0	0	1+	0	0
Rat 7-E	0	0	0	0	0	0
Rat 8-D	0	0	0	0	1+	0
Rat 8-E	1+	0	0	1+	2+	0
Rat 9-D	0	0	0	0	0	0
Rat 9-E	1+	0	0	0	0	0
Rat 10-D	0	0	0	0	0	0
Rat 10-E	0	0	0	0	0	0

Escore: 1+ = leve; 2+ = moderado; 3+ = intenso.

Tabela 18 - Peso (g) dos ratos do grupo controle (G1). Pressão arterial média (mmHg) (PAM) e temperatura retal (°C) (T) dos ratos do grupo controle nos três momentos estudados

Rato	Peso	PAM			T		
		M1	M2	M3	M1	M2	M3
1	300	55	70	59	37,1	37,0	37,2
2	330	111	106	57	36,6	37,0	35,4
3	300	120	100	108	37,8	36,9	38
4	310	118	61	55	37,4	37,1	38,5
5	280	95	85	87	37,8	36,3	33,5
6	280	114	94	87	36,6	35,0	34,0
7	340	76	112	53	33,1	33,7	34,5
8	330	116	114	96	34,4	33,0	36,0
9	500	55	59	59	36,1	36,5	36,8
10	490	95	85	87	32,5	33,0	36,0

Tabela 19 - Peso (g) dos ratos do grupo glibenclamida (G2). Pressão arterial média (mmHg) (PAM) e temperatura retal (°C) (T) dos ratos do grupo glibenclamida (G2) nos três momentos estudados

Rato	Peso	PAM			T		
		M1	M2	M3	M1	M2	M3
1	480	58	63	60	38,6	37,6	37,9
2	370	84	70	72	35,2	34,5	36,8
3	310	67	58	64	36,1	35,0	36,4
4	300	122	115	83	37,4	36,8	36,2
5	270	96	106	41	34,9	35,0	36,2
6	360	109	88	87	37,3	34,8	36,0
7	340	86	81	69	38,9	38,1	37,8
8	370	101	84	87	35,6	35,5	36,0
9	280	68	47	87	38,0	37,4	37,1
10	300	98	81	78	37,9	37,0	36,3

Tabela 20 – Valores de *clearance* de para-aminohipurato de sódio ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) (C_{PAH}), *clearance* de iotalamato de sódio ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$) (C_{IOT}) e fração de filtração (FF) dos ratos do grupo controle (G1) nos três momentos estudados

Rato	C_{PAH}			C_{IOT}			FF		
	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
1	0,087	0,105	0,083	1,00	1,03	1,03	0,038	0,033	0,042
2	0,082	0,044	0,036	1,03	1,01	1,03	0,038	0,069	0,087
3	0,025	0,026	0,026	0,91	0,94	0,91	0,123	0,122	0,117
4	0,045	0,049	0,032	1,02	1,03	0,89	0,073	0,067	0,089
5	0,045	0,047	0,047	0,89	0,91	0,90	0,071	0,069	0,068
6	0,081	0,078	0,058	1,03	1,02	0,98	0,045	0,047	0,060
7	0,093	0,093	0,032	1,01	1,03	0,47	0,032	0,032	0,043
8	0,094	0,097	0,095	1,02	1,02	1,01	0,033	0,032	0,032
9	0,061	0,065	0,063	0,98	1,01	1,02	0,032	0,031	0,032
10	0,065	0,064	0,064	1,01	1,02	1,00	0,032	0,032	0,032

Tabela 21 – Valores de *clearance* de para-aminohipurato de sódio ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) (C_{PAH}), *clearance* de iotalamato de sódio ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$) (C_{IOT}) e fração de filtração (FF) dos ratos do grupo glibenclamida (G2) nos três momentos estudados

Rato	C_{PAH}			C_{IOT}			FF		
	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
1	0,067	0,065	0,066	1,03	1,01	1,00	0,032	0,033	0,032
2	0,054	0,085	0,085	1,03	1,02	0,86	0,051	0,032	0,027
3	0,079	0,103	0,101	1,02	1,03	1,03	0,042	0,032	0,033
4	0,108	0,105	0,105	1,03	1,02	1,00	0,032	0,032	0,032
5	0,038	0,118	0,121	1,02	1,02	1,03	0,100	0,032	0,032
6	0,089	0,088	0,086	1,01	1,02	1,03	0,032	0,032	0,033
7	0,093	0,093	0,095	1,01	1,02	1,02	0,032	0,032	0,032
8	0,087	0,086	0,086	1,02	1,02	1,02	0,032	0,032	0,032
9	0,112	0,112	0,112	1,02	1,02	1,02	0,032	0,032	0,033
10	0,105	0,105	0,103	1,02	1,02	1,02	0,033	0,032	0,033

Tabela 22– Valores de fluxo sanguíneo renal ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) (FSR), resistência vascular renal ($\text{mmHg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}$) (RVR) e hematócrito (%) (Ht) dos ratos do grupo controle (G1) nos três momentos estudados

Rato	FSR			RVR			Ht		
	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
1	0,142	0,164	0,120	1,29	1,42	1,64	39	36	33
2	0,143	0,070	0,050	2,34	4,57	3,48	43	37	28
3	0,043	0,042	0,040	9,40	8,02	9,05	42	38	35
4	0,072	0,070	0,045	5,29	2,80	3,98	37	30	28
5	0,077	0,072	0,071	4,42	4,24	4,39	42	34	33
6	0,134	0,122	0,086	3,05	2,75	3,62	39	36	32
7	0,152	0,148	0,049	1,47	2,22	3,19	39	37	34
8	0,165	0,162	0,143	2,13	2,13	2,03	43	40	34
9	0,100	0,101	0,94	1,10	1,17	1,26	39	36	33
10	0,112	0,106	0,101	1,73	1,64	1,76	42	39	37

Tabela 23– Valores de fluxo sanguíneo renal ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) (FSR), resistência vascular renal ($\text{mmHg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}$) (RVR) e hematócrito (%) (Ht) dos ratos do grupo glibenclamida (G2) nos três momentos estudados

Rato	FSR			RVR			Ht		
	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
1	0,109	0,101	0,098	1,11	1,30	1,27	38	36	33
2	0,089	0,135	0,128	2,55	1,40	1,50	39	37	34
3	0,125	0,156	0,151	1,73	1,20	1,36	37	34	33
4	0,193	0,175	0,160	2,11	2,19	1,73	44	40	34
5	0,061	0,181	0,180	5,81	2,17	0,84	38	35	33
6	0,150	0,139	0,128	2,02	1,76	1,89	41	37	32
7	0,133	0,128	0,128	1,91	1,86	1,58	30	28	26
8	0,144	0,134	0,128	1,89	1,69	1,83	40	36	33
9	0,168	0,165	0,158	1,45	1,02	1,97	33	32	29
10	0,152	0,148	0,140	2,16	1,82	1,86	31	29	26