

*Nilson de Camargos Roso*

**Estudo da proteção renal durante a isquemia e reperfusão em  
ratos com o CAPE (*caffeic acid phenethyl ester*)**

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

Orientador: Prof. Titular Pedro Thadeu Galvão Vianna

Botucatu – SP  
2011

**A MOEDA DA GRATIDÃO CIRCULA POUCO. NOS MEUS 65 ANOS COMPLETOS RARAS VEZES EU A VI CIRCULAR. NESTA OPORTUNIDADE, É MEU DESEJO VÊ-LA CIRCULANDO, PELA GRATIDÃO QUE TENHO A MUITAS PESSOAS.**

*Agradeço ao Prof. Pedro Thadeu Galvão Vianna, pelo seu interesse sempre presente em repassar o conhecimento, assemelhando-se àquele jovem que se inicia na carreira de docente, pela sua alegria e dedicação contagiantes. O mais admirável é a sua capacidade de aglutinar as pessoas em torno desse repasse. É um líder, pois consegue trabalhar com e através dos outros para atingir os objetivos. Estas suas características permitiram-lhe atingir os objetivos maiores: a criação do Departamento de Anestesiologia da FMB/UNESP e o sucesso do ensino da graduação e da pós-graduação “stricto sensu” e “lato sensu”. O saber pode ser alcançado pelo exercício da metodologia científica, bastante farta na atualidade. A sabedoria implica nas administrações adequadas do saber e da relação interpessoal. A História nos informa que a sabedoria nos dá a orientação. A orientação veio do Oriente. Pelo exposto, cabe-me agradecer ao Prof. Pedro Thadeu pela orientação fraterna.*

*Às professoras da UFTM (Universidade Federal do Triângulo Mineiro), Rosana Rosa Miranda Corrêa, da Disciplina de Patologia Geral, pela análise histopatológica, e Lúcia Marina Scatena, da Disciplina de Bioestatística, pela avaliação estatística.*

*Aos professores do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pelo ensino ministrado e, principalmente, pelo exemplo de conduta e de cidadania, tão importantes para o nosso país.*

*Aos funcionários do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela competência, dedicação e alegria demonstradas, colaborando para a realização deste estudo.*

*Aos meus pais, “in memoriam”, lembrados principalmente nos momentos de tomadas de decisões, pelas suas atitudes cristãs, serenas e pacificadoras.*

*À minha família, pela compreensão da minha dedicação a este trabalho, dando-me o suporte necessário.*

*Ao Prof. Bento Mario Villamil Gonçalves pelos conceitos e princípios de Anestesiologia apregoados hoje e por ele defendidos há mais de quarenta anos.*

*Ao Dr. Valdir Cavalcanti Medrado, pela sua vida exemplar, completada pela sua citação no Congresso Brasileiro de Anestesiologia em 2007, Natal, RN, já com 80 anos de idade, onde finalizou sua conferência naquele Congresso dizendo: “Àqueles que exercem a Anestesiologia, deixo aqui um pedido: ao serem chamados ao Hospital às 03:00 horas da manhã, por favor, cheguem sorrindo”.*

*A todos que nos auxiliaram a buscar o ideal, que é a procura da **verdade** dentro da ciência.*

## Epígrafe

# A VERDADE

*“O que faz o valor de um ser humano não é a verdade que ele possui ou crê possuir; é o esforço sincero que ele fez para conquistá-la: porque não é pela posse, mas pela procura da verdade que o homem aumenta as suas forças e se aperfeiçoa. Se Deus tivesse encerrado toda a verdade na Sua mão direita, e na Sua mão esquerda a aspiração eterna em direção à verdade, mesmo com a condição de se enganar sempre e, se Ele me dissesse: escolhe! eu escolheria humildemente a mão esquerda e diria: Dá-ma, meu Pai, porque a verdade pura só a Ti pertence”.*

*(Lessing)*

**Roso NC.** Estudo da proteção renal durante a isquemia e reperfusão em ratos com o CAPE (*caffeic acid phenethyl Ester*). Botucatu, 2011. 120p. Tese (Doutorado em Anestesiologia). Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Univ. Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

## RESUMO

**Justificativa e Objetivo:** o CAPE, ativo componente da própolis, é um potente antioxidante com importantes ações no estudo da isquemia e reperfusão renal. O objetivo deste estudo é avaliar o efeito do CAPE na lesão renal de isquemia-reperfusão em ratos anestesiados com isoflurano. **Método:** utilizou-se 26 ratos Wistar, machos, com peso superior a 250 g, distribuídos de modo aleatório em três grupos de animais, designados: **G1** (controle, isquemia; n = 8); **G2** (CAPE + isquemia; n = 10); **G3** (diluinte do CAPE (etanol) + isquemia; n = 8). Todos os grupos receberam indução da anestesia com isoflurano a 4% e a manutenção com isoflurano de 1,5 a 2,0%. A pressão arterial média (PAM) foi medida para controle da anestesia. A injeção intraperitoneal do CAPE (G2) ou do etanol (G3) foi feita 40 minutos antes da isquemia renal esquerda. Nos três grupos a isquemia durou 25 minutos. Todos os animais foram submetidos à nefrectomia direita. Os valores plasmáticos da creatinina foram determinados no início (M1), no final do experimento (M2) e 24 horas após o final do experimento (M3), quando os animais retornaram ao laboratório e foram anestesiados com isoflurano para coleta de amostra sanguínea e nefrectomia esquerda. Para análise histológica foi utilizada uma escala para avaliação da necrose tubular (0 a 5 = lesão máxima). Houve tratamento estatístico para os valores da temperatura dos animais, peso, PAM, da creatinina plasmática e das lesões histológicas, sendo as diferenças consideradas significantes quando  $p < 0,05$ . **Resultados:** conforme mediana, 1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> quartis, entre colchetes, segundo o grupo, a creatinina foi maior em M2 do G2 (0,8 [0,6;0,8]) do que M2 do G1 (0,5[0,4;0,6]) e M2 do G3 (0,6[0,6;0,7]) com  $p = 0,0012$ . A creatinina também foi maior em M3 do G2 (3,7 [2,6;4,4]) do que M3 do G1 (0,9[0,7;1,4]) e M3 do G3 (1,0[0,9;1,6]) com  $p = 0,0014$ . Os valores da creatinina não diferiram no G1 dos três grupos. A histologia mostrou que a necrose tubular aguda foi mais intensa no G2 do que no G1 e no G3 ( $p < 0,001$ ). **Discussão:** A hipótese mais provável do resultado desta pesquisa foi o bloqueio do ROS pelo CAPE, que impediu o condicionamento anestésico (PCA) pelo isoflurano. O CAPE, assim como N-2-mercaptopropionil glicina (2-MPG) e a N-acetilcisteína (NAC), são varredores do ROS. Para haver PCA é necessário que também ocorra liberação do ROS, que neste experimento foi bloqueado pelo CAPE. **Conclusões:** o CAPE, nos ratos que receberam anestesia com isoflurano, promoveu lesões funcionais (creatinina) e anatômicas (histológicas) mais intensas do que nos grupos controle e diluinte.

**Palavras-chave:** Antioxidantes; Rim Isoflurano; Insuficiência renal.

**Roso NC.** A study of kidney protection during ischemia and reperfusion in rats with the CAPE (*caffeic acid phenethyl ester*). Botucatu, 2011. 120p. Thesis (Doctorate in Anesthesiology). Botucatu Medical School – UNESP – Univ. Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

## ABSTRACT

**Background** - CAPE, an active component of propolis, exhibits antioxidant properties with important actions on ischemia and reperfusion renal study. The purpose of this investigation was to examine the effect of CAPE in renal ischemia/reperfusion in rats anesthetized with isoflurane. **Methods** - twenty six rats were randomly assigned in three groups: **G1** (control, ischemia; n = 8); **G2** (CAPE + ischemia; n = 10); **G3** (dilute of CAPE (ethanol) + ischemia; n = 8). All groups were anesthetized with isoflurane. Mean arterial pressure (MAP) was monitored for anesthesia control. Intraperitoneal CAPE (G2) or ethanol (G3) injections were realized 40 minutes before left renal ischemia. All animals underwent to right nephrectomy and left kidney was submitted to ischemia for 25 minutes. Serum creatinine values were determined in the beginning (M1) and at the end of experiment (M2) and 24 hours after the experiment (M3) rats were anesthetized with isoflurane and intracardiac blood sample was collected and the left kidney removed for histological analysis, using a scale for tubular necrosis (0-5= injury maximum). Statistical analysis was applied to the values of temperature, weight, MAP, serum creatinine and histological score injury and statistical differences were considered when  $p < 0,05$ . **Results** - There were no difference among the temperature of different groups. The weight of G2 were higher than others groups. The PAM of group G3 was higher in M2 than other groups. Creatinine values in M2 of group G2 were higher than M2 of group G1 and M2 of group G3 ( $p=0.0012$ ) and were higher than M3 of group G1 and M3 of group G3 ( $p=0.0014$ ). There was no difference of creatinine values in M1 of the three groups ( $p=0.054$ ). Histological examination showed that group G2 had more acute tubular necrosis (2.0[2.0;3.0]) than group G1 (2.0[1.0;2.0]) and group G3 (1.0[0.0;2.0]), ( $p < 0.001$ ). **Discussion** - It has been shown that CAPE has a kidney protective effect in rats anesthetized with ketamine but this effect has never been studied in the rats underwent isoflurane anesthesia. CAPE is a ROS scavenger and blocked anesthetic APC by isoflurane. CAPE, as N2-mercaptopropiyl glycine (2-MPG) and N-acetylcysteine (NAC), are ROS scavengers. PCA didn't happen because it is necessary ROS release and probably in this study CAPE blocked ROS release. **Conclusions** - CAPE promoted more functional and anatomical renal injury when rats were anesthetized with isoflurane than control and dilute groups.

Keywords- Caffeic acid phenethyl ester; Reperfusion injury; Kidney; Rats.

## SUMÁRIO

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Lista de Abreviaturas e Siglas

Resumo

Abstract

### 1 INTRODUÇÃO E LITERATURA

1.1 A ISQUEMIA E A REPERFUSÃO.....	15
1.2 O PRÉ-CONDICIONAMENTO.....	16
1.2.1 O PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO.....	17
1.2.2 O PRÉ-CONDICIONAMENTO FARMACOLÓGICO.....	21
1.3 O PÓS-CONDICIONAMENTO FARMACOLÓGICO.....	23
1.4 O ANTICONDICIONAMENTO.....	24
1.5 OS OXIDANTES E OS ANTIOXIDANTES.....	27
1.6 O CAPE ( <i>caffei acid phenethyl ester</i> ).....	28

### 2 OBJETIVO 35

### 3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	37
3.2 SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL.....	37
3.3 ATRIBUTOS ESTUDADOS.....	42
3.4 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	42
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45

### 4 RESULTADOS

4.1 TEMPERATURA RETAL.....	47
4.2 PESO DO RATO.....	47
4.3 PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM).....	48
4.4 CREATININA PLASMÁTICA.....	49
4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO RIM.....	50

### 5 DISCUSSÃO

5.1 MODELO ANIMAL.....	56
5.2 ALTERAÇÕES DA CREATININA PLASMÁTICA.....	58
5.3 ALTERAÇÕES DA HISTOLOGIA RENAL.....	59
5.4 AÇÕES DO CAPE, DO ROS E DO ISOFLURANO.....	60

### 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS 71

### 7. CONCLUSÕES 73

### 8 REFERÊNCIAS 75

### 9 ANEXOS

9.1 TABELAS.....	95
9.2 FOTOS DA SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL.....	111

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Defesas antioxidantes renais na I/R.....	25
<b>Tabela 2</b>	Radicais componentes do ROS.....	27
<b>Tabela 3</b>	Classificação das lesões renais segundo os graus de Park.....	43
<b>Tabela 4</b>	Valores da média e desvio-padrão da temperatura segundo momento e grupo.....	47
<b>Tabela 5</b>	Valores dos pesos dos ratos. Mediana, 1º e 3º quartis, entre colchetes, segundo grupo.....	47
<b>Tabela 6</b>	PAM (mmHg) dos ratos. Média e desvio-padrão segundo momento e grupo.....	48
<b>Tabela 7</b>	Creatinina plasmática dos ratos. Mediana, 1º e 3º quartis, entre colchetes, segundo grupo	49
<b>Tabela 8</b>	Análises histológicas renais dos ratos. Mediana, 1º e 3º quartis, entre colchetes, referentes às variáveis de medidas gerais segundo o grupo.....	50
<b>Tabela 9</b>	Grupo controle (G1): Laparotomia + nefrectomia direita + isquemia renal esquerda dos ratos 01, 02, 03 e 04.....	93
<b>Tabela 10</b>	Grupo controle (G1): Laparotomia + nefrectomia direita + isquemia renal esquerda dos ratos 05, 06, 07 e 08.....	94
<b>Tabela 11</b>	Grupo CAPE (G2): Laparotomia + nefrectomia direita + isquemia renal esquerda + injeção intraperitoneal da solução do CAPE dos ratos 01, 02, 03, 04 e 05.....	95
<b>Tabela 12</b>	Grupo CAPE (G2): Laparotomia + nefrectomia direita+isquemia renal esquerda + injeção intraperitoneal da solução do CAPE dos ratos 06, 07, 08, 09 e 10.....	96
<b>Tabela 13</b>	Grupo diluente (G3): Laparotomia + nefrectomia direita + isquemia renal esquerda + injeção intraperitoneal da solução do diluente (etanol) do CAPE dos ratos 01, 02, 03 e 04.....	97
<b>Tabela 14</b>	Grupo diluente (G3): Laparotomia + nefrectomia direita + isquemia renal esquerda + injeção intraperitoneal da solução do diluente (etanol) do CAPE dos ratos 05, 06, 07 e 08.....	98
<b>Tabela 15</b>	Temperatura dos ratos (G1, G2 e G3) em M1 e M2.....	99
<b>Tabela 16</b>	Pesos dos ratos (G1, G2 e G3).....	100
<b>Tabela 17</b>	PAM dos ratos (G1, G2 e G3) em M1 e M2.....	101
<b>Tabela 18</b>	Creatinina dos ratos (G1, G2 e G3) em M1, M2 e M3.....	102
<b>Tabela 19</b>	Alterações histológicas dos ratos 1, 2, 3 e 4 do G1.....	103
<b>Tabela 20</b>	Alterações histológicas dos ratos 5, 6, 7 e 8 do G1.....	104

<b>Tabela 21</b>	Alterações histológicas dos ratos 1, 2, 3, 4 e 5 do G2.....	105
<b>Tabela 22</b>	Alterações histológicas dos ratos 6, 7, 8, 9 e 10 do G2.....	106
<b>Tabela 23</b>	Alterações histológicas dos ratos 1, 2, 3 e 4 do G3.....	107
<b>Tabela 24</b>	Alterações histológicas dos ratos 5, 6, 7 e 8 do G3.....	108
<b>Tabela 25</b>	Alterações histológicas pericapsulares dos ratos do G1, G2 e G3 em % transformadas em graus de Park.....	109
<b>Tabela 26</b>	Alterações histológicas medulares dos ratos do G1, G2 e G3 em % transformadas em graus de Park.....	110

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Representação esquemática do pré-condicionamento isquêmico precoce.....	18
<b>Figura 2</b>	Representação esquemática do pré-condicionamento isquêmico tardio.....	20
<b>Figura 3</b>	Aderência celular leucócito-endotelial e transmigração após a I/R.....	21
<b>Figura 4A</b>	Mecanismo celular do pré-condicionamento isquêmico.....	22
<b>Figura 4B</b>	Mecanismo celular do pré-condicionamento isquêmico pelos anestésicos voláteis halogenados.....	22
<b>Figura 5</b>	Representação esquemática dos mecanismos oxidantes e antioxidantes.....	26
<b>Figura 6</b>	Representação da estrutura química do CAPE.....	29
<b>Figura 7</b>	Exemplo da análise morfométrica dos focos de morte celular através da ocular integradora de campos.....	44
<b>Figura 8</b>	Área de túbulos renais utilizada para a determinação da quantidade de focos de necrose tubular aguda.....	44
<b>Figura 9</b>	Creatinina plasmática. Mediana, 1º e 3º quartis, entre colchetes, segundo momento e grupo.....	49
<b>Figura 10</b>	Análise das alterações pericapsulares renais em % por 25 campos.....	51
<b>Figura 11</b>	Análise das alterações pericapsulares renais segundo os graus de Park.....	52
<b>Figura 12</b>	Análise das alterações medulares renais em % por 25 campos..	53
<b>Figura 13</b>	Análise das alterações medulares renais segundo os graus de Park.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
DAG	Diacilglicerol ( <i>Diacylglycerol</i> )
DMOS	Disfunção de múltiplos órgãos e sistemas
Enos	Óxido nítrico sintase endotelial ( <i>endotelial Nitric Oxide Synthase</i> )
HSP	Proteína de choque térmico ( <i>Heat Shock Protein</i> )
ICAM-1	(intercellular adhesion molecule 1)
I/R	Isquemia e reperfusão
K <sub>ATP</sub> ou mitoK <sub>ATP</sub>	Canais de K <sup>+</sup> sensíveis à ATP ou canais de K <sup>+</sup> mitocondrial sensíveis à ATP
LRA	Lesão renal aguda
MAPKs	Proteínas cinases ativadas por mitógenos ( <i>Mitogen-Activated-Protein-Kinases</i> )
MPTP	Poros mitocondrial de transição permeável ( <i>Mitochondrial permeability transition pore</i> )
NF-kappaβ	Fator nuclear kappa-beta ( <i>Nuclear Factor-kappabeta</i> )
PCI	Pré-condicionamento isquêmico
PCIP	Pré-condicionamento isquêmico precoce
PCIT	Pré-condicionamento isquêmico tardio
PI3K	Enzima fosfatidilinositol-3-cinase ( <i>Phosphatidyl-inositol-3-kinase</i> )
PKC(-E)	Proteína Cinase C (-E=Épsilon) ( <i>Protein-kinase C (-E)</i> )
PTKs	Proteínas tirosina cinases ( <i>Protein Tyrosine Kinases</i> )
SRIS	Síndrome de resposta inflamatória sistêmica
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa ( <i>Tumoral Necrosis Factor-alfa</i> )
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível ( <i>inducible Nitric Oxide Synthase</i> )
ITP	Tri-fosfato de inositol ( <i>Inositol triphosphate</i> )
MnSOD	Superóxido dismutase manganês ( <i>Mn Superoxide Dismuthase</i> )

nNOS	Óxido nítrico sintase neural ( <i>neural Nitric Oxide Synthase</i> )
NOS	Óxido nítrico sintase ( <i>Nitric Oxide Synthase</i> )
PECAM-1	( <i>platelet-endothelial cell adhesion molecule 1</i> )
PIP2	Bifosfato de fosfatidil inositol ( <i>Phosphatidyl</i> )
PGSL-1	( <i>P-selectin glycoprotein 1</i> )
PLC	Fosfolipase C ( <i>Phospholipase C</i> )
Proteína Gi	Proteína G inibitória ligada ao nucleotídeo guanina ( <i>Guanine nucleotide-binding regulatory proteins</i> )

## SIGLAS DO MECANISMO OXIDANTE/ANTIOXIDANTE

$O_2^-$	ânion radical superóxido
$O_2$	oxigênio molecular
$H^+$	ion ou próton hidrogênio
$H_2O$	água
SOD	superóxido dismutase
CAT	catalase
$H_2O_2$	peróxido de hidrogênio
GSH-Px	glutathiona peroxidase
GSH	glutathiona reduzida
GSSG	glutathiona oxidada
GSH-R	glutathiona redutase
$NADPH+H^+$	nicotinamida adenina dinucleotide fosfatase reduzida
$NADP^+$	nicotinamida adenina dinucleotide fosfatase oxidada
$Fe^{2+}$	ion ferroso
$OH^-$	ion hidroxila
OH	radical hidroxila (o mais potente radical de oxigênio livre)
tNOS	óxido nítrico sintetase total
NO	radical óxido nítrico
ONOO $^-$	peroxinitrito
MDA	malondialdeido ( o último produto da peroxidação lipídica da membrana fosfolipídica)
$NO_2^-$	nitrito
PUFA	ácido gorduroso poli-insaturado (Polyunsaturated Fatty Acid)
XO	xantino oxidase
ROS	espécies reativas de oxigênio (Reactive Oxygen Species)

# **1 INTRODUÇÃO E LITERATURA**

---

Os rins são particularmente sensíveis à isquemia. Cirurgias de transplante renal, cirurgias da aorta acima das artérias renais, cirurgias cardíacas e estados de hipotensão arterial prolongada ocasionam isquemia renal e implicam em posterior reperfusão renal e têm importância clínica no estudo da morbimortalidade operatória, podendo ocorrer lesão renal aguda (LRA), desencadeada inicialmente pela vasoconstrição renal, hipoperfusão e diminuição da oferta de oxigênio aos tecidos (Star, 1998; Abernethy & Lieberthal, 2002). O tema isquemia e reperfusão (I/R) renal, com importante interesse na prática clínica, necessita ser objeto de estudos a fim de restabelecer a homeostasia deste órgão.

Há mortalidade de 50% a 80% associada à LRA, com limitadas opções de tratamento (Lin, 2006). A regeneração celular tem um promissor futuro através da medicina reparadora (Semedo et al., 2007).

É importante que dentro do arsenal terapêutico possam existir fármacos que permitam técnicas anestésicas protetoras da I/R renais, que têm sido motivo de estudos desde Spiekermann et al., 1969.

## **1.1 A ISQUEMIA E A REPERFUSÃO**

A isquemia, experimental ou clínica, é um estado em que há diminuição do fluxo sanguíneo para um órgão, ocasionando hipóxia tecidual. Após o estado isquêmico há presença de eventos químicos, os quais podem levar à disfunção celular ou necrose do órgão. Parece que o dano causado pela reperfusão é proporcional ao dano causado pela isquemia (Pasqualin & Auler, 2008).

Cessada a isquemia, ocorrendo o retorno do fluxo sanguíneo, haverá a reperfusão do órgão, podendo ocorrer eventos químicos que podem produzir uma lesão adicional: a lesão da reperfusão. Este fato desperta curiosidades, pois a reperfusão deveria, dentro de um raciocínio superficial e imediatista, promover o processo da reversão das lesões ocasionadas pela isquemia. Porém, a reperfusão pode agravar a lesão tecidual isquêmica (Collard & Gelman, 2001). Ocorrendo hipoperfusão ou interrupção do fluxo sanguíneo, a inferência é a lesão tecidual ser oriunda de dois componentes: o componente direto da isquemia e o componente indireto da reperfusão (Weber & Schlack, 2008).

A complexidade é a principal característica da I/R, cuja sequência cronológica obedece três estágios. No primeiro estágio ocorre uma resposta inflamatória endotelial à lesão, cuja finalidade é promover reparação celular local através das células recrutadoras dos sistemas retículoendotelial e imunológico. O segundo estágio ocorre na circulação sistêmica, com liberação de pequenas quantidades de citocinas e antagonistas pró-inflamatórios endógenos, para aumentar a resposta local. Ocorre a presença de mediadores imunológicos, que procuram fazer o antagonismo. Se o foco incitatório é debelado, o segundo estágio termina, dando fim ao processo. Caso o processo inflamatório persista, surge o terceiro estágio, que é o mais grave dos três estágios, com reação sistêmica maciça, que mais destrói do que protege, pois há desequilíbrio das citocinas pró e anti-inflamatórias, formação de radicais livres de oxigênio e ativação de leucócitos. Este quadro, complexo e de difícil reversão, acontece na falência múltipla dos órgãos, frequentemente terminando em óbito (Haukoos et al., 2007). A reperfusão, embora essencial para as células sobreviverem ao período de isquemia e reassumirem sua função normal, pode acelerar a morte celular pela ocorrência da lesão de reperfusão, que promove lesões morfológicas e funcionais. Parte das células potencialmente viáveis, não se recuperando integralmente, evolui para lesão irreversível (Heyndrickx, 2006).

O termo lesão de reperfusão foi definido pela primeira vez por Ames et al., 1968, e se referia à lesão celular que ocorria quando havia insuficiente suprimento de sangue para uma determinada região, seguido do retorno de fluxo sanguíneo suficiente.

A I/R renal mostrou alterações histológicas mais intensas quando a oclusão ocorreu na veia renal. Foram menores as lesões histológicas renais quando a isquemia ocorreu por oclusão da artéria renal (Park et al., 2008).

## **1.2 O PRÉ-CONDICIONAMENTO**

Pré-condicionamento é a técnica ou mecanismo, clínica ou experimental, que visa preparar o órgão ou tecido para reagir positivamente aos efeitos nocivos da I/R. A maioria dos estudos sobre pré-condicionamento foi realizada em corações “*in vivo*” ou isolados de animais (Weber & Schlack, 2008).

### 1.2.1 O PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO (PCI)

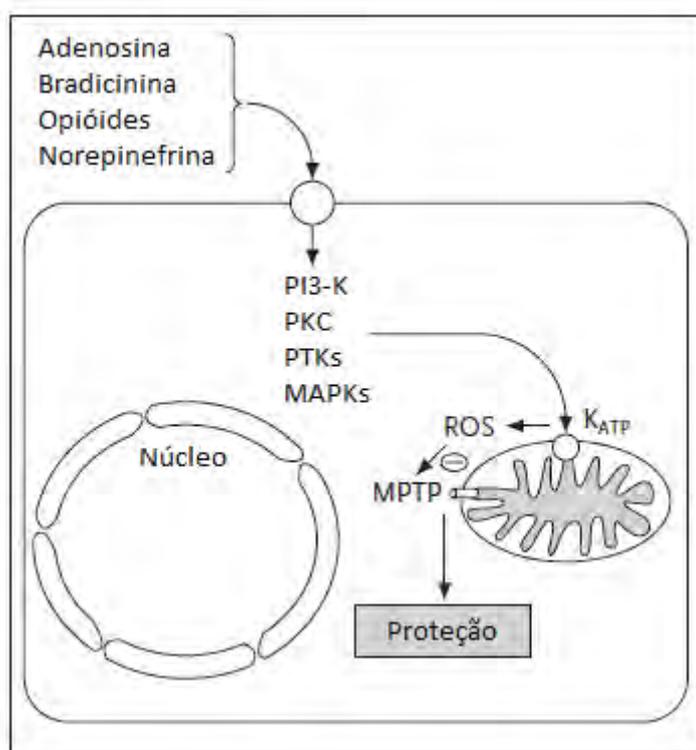
O PCI é um fenômeno paradoxal no qual o pré-tratamento com um estímulo potencialmente nocivo pode aumentar a tolerância celular a estímulo nocivo subsequente. O PCI é um mecanismo de defesa natural que permite ao órgão tolerar mais a isquemia, mas ficou definido como aumento da tolerância à I/R induzido por breves períodos subletais de isquemia. Inúmeros estudos têm investigado o PCI com o objetivo de explorar este poderoso mecanismo protetor na prática clínica.

Estudos sobre I/R renal são importantes para elucidar a isquemia renal após PCI. PCI pode ocorrer em vários órgãos e foi assim denominado quando observação de que breves episódios de isquemia no coração, ocorrendo antes de interrupção mais longa da corrente sanguínea, conferem proteção contra disfunção e necrose do órgão. Murry et al., 1986, estudaram cães submetidos a quatro períodos de cinco minutos de isquemia por oclusão coronariana seguidos de quatro períodos de cinco minutos de reperfusão, antes de um período de 40 minutos de isquemia por oclusão. Observaram que o grupo do PCI apresentou uma área de infarto 75% menor em relação ao grupo controle, mas o efeito redutor do infarto perdia-se quando três horas de oclusão eram aplicadas, enfatizando que a reperfusão oportuna é indispensável para limitar o dano miocárdico no PCI. PCI é um tratamento anterior ao evento isquêmico, enquanto a lesão de I/R ocorre durante e após a isquemia.

A maioria dos estudos sobre PCI foi realizada em modelos animais e as diferenças relacionadas ao mecanismo de proteção entre as espécies podem existir. Estudos *in vitro* e *in vivo* no homem foram desenvolvidos, utilizando alguns marcadores para estudar o efeito do PCI sobre o miocárdio (Kloner et al., 2002).

A proteção do PCI foi observada em outras espécies animais, como ratos (Barbosa et al., 1996), coelhos (Cohen et al., 2000) e em órgãos diversos, como o rim (Pell et al., 1998; Lee & Emala, 2000), o fígado (Koti et al., 2003), o intestino (Gho et al., 1996) e o cérebro (Bernaudin et al., 2002). Além disso, o PCI foi capaz de proteger células e órgãos distantes que não foram pré-condicionados (PCI distante), onde tecido não cardíaco sofrendo isquemia levou à proteção do miocárdio (Gho et al., 1996). A I/R com posteriores lesões podem ocorrer no próprio órgão onde ocorreu a isquemia (Vianna et al., 2009) ou ocorrer a I/R em um órgão mas com repercussão em outro órgão distante (Çalikoglu et al., 2003, Ozer et al., 2005).

O PCI oferece duas janelas de proteção no tempo, conhecidas como pré-condicionamento “precoce” (PCIP) ou “clássico”, e pré-condicionamento “tardio” (PCIT) ou “retardado”, que é a segunda janela de proteção. O PCIP inicia-se em minutos após a agressão isquêmica e perdura por uma a duas horas. Nesta fase, os eventos desencadeados pela isquemia resultam na abertura dos canais de potássio sensíveis à adenosina trifosfato ( $K_{ATP}$ ) e preservam os níveis intracelulares de adenosina trifosfato (ATP). Já o PCIT inicia-se entre 12 e 24 horas após a isquemia e tem duração de aproximadamente 72 horas. Nesta fase, além dos eventos da fase inicial, ocorre síntese de proteínas citoprotetoras (Riksen et al., 2004).



**Figura 1** - Representação simplificada do mecanismo de pré-condicionamento precoce:  $K_{ATP}$ =canal de potássio sensível à adenosina tri-fosfato; MAPKs=proteínas cinases ativadas por mitógenos; MPTP= poro de transição de permeabilidade mitocondrial; PI3K=enzima fosfatidilinositol-3-cinase; PKC=proteína cinase C; PTKs=proteínas tirosina cinases; ROS=espécies reativas de oxigênio (Adaptado de Riksen et al., 2004).

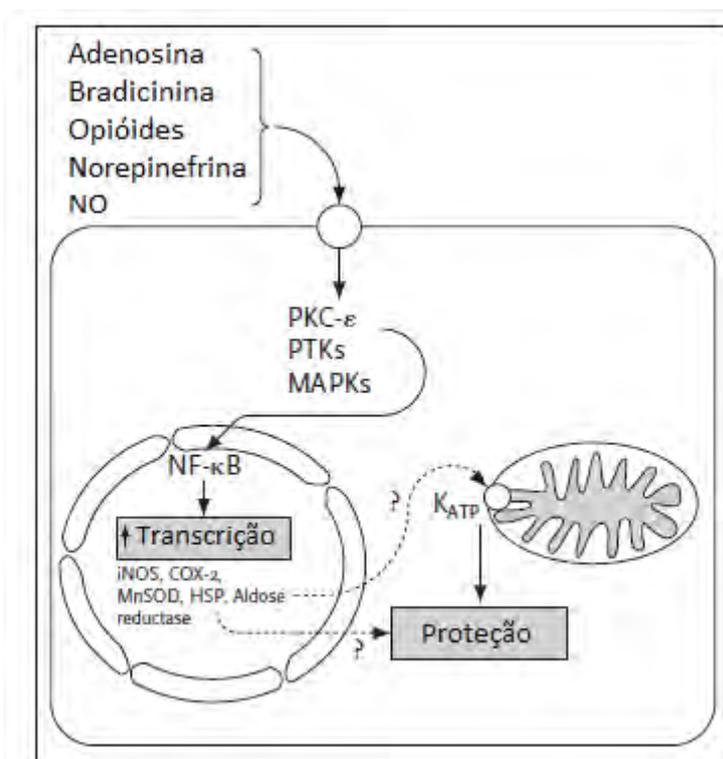
O desencadeamento dos eventos da isquemia é inicialmente figurado pela abertura dos  $K_{ATP}$  e preserva os níveis intracelulares de ATP. No PCIP, conforme figura 1, ativadores (gatilhos) como adenosina, bradicinina, opióides, norepinefrina e também os anestésicos voláteis, são liberados e promovem a ativação de uma complexa cascata

de sinalização, incluindo a enzima fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), a proteína cinase (PKC), a proteína tirosina cinase (PTK) e as proteínas ativadas por mitógenos (MAPK). Esta cascata de sinalização promove a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e inibe a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP) por meio da abertura do canal de K<sup>+</sup> mitocondrial (mitoKATP) sensível à ATP (Riksen et al., 2004).

As proteínas cinases são fosfotransferases e têm importância na transmissão de sinais e controle de processos celulares complexos (Manning et al., 2002). O MPTP é formado por complexas proteínas capazes de transformar poros grandes e não-seletivos em membrana impermeável. Este poro permanece fechado durante a isquemia, abrindo-se durante a reperfusão (Griffiths & Halestrap, 1995). A elevação na concentração mitocondrial de Ca<sup>2+</sup>, o estresse oxidativo (formação de ROS), a depleção de ATP e a despolarização mitocondrial, presentes durante a reperfusão, promovem abertura do MPTP (Halestrap et al., 2004). Foi demonstrado que sua abertura durante a reperfusão é inibida pela ciclosporina A.

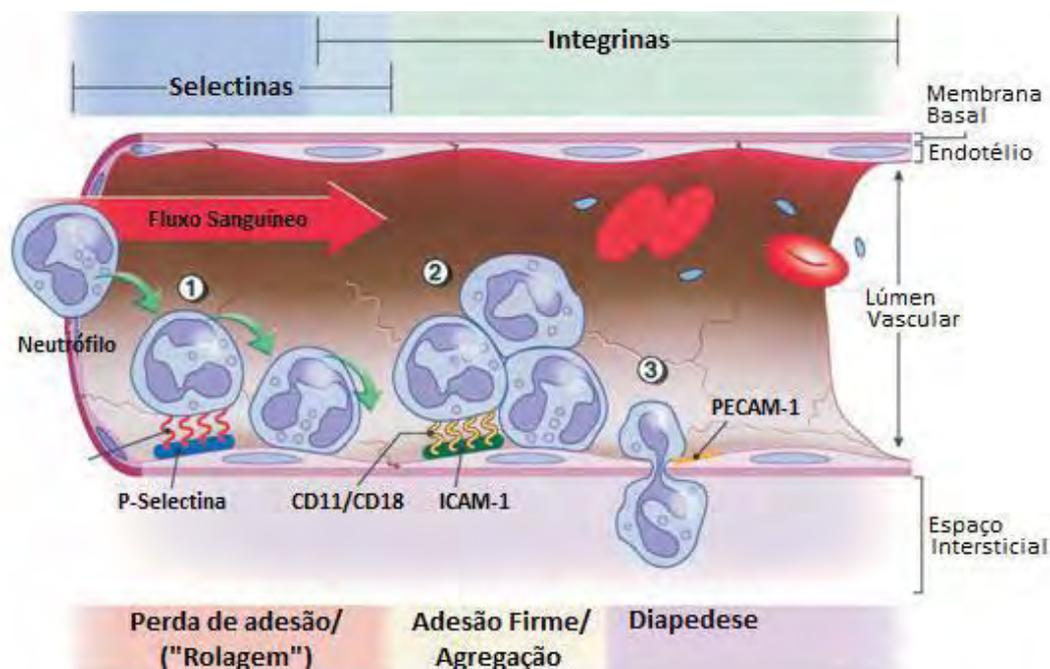
No PCIT (Figura 2), encontram-se entre os “gatilhos” protetores os mesmos do PCIP e mais o óxido nítrico (NO) que atuam sobre as cinases de transferência PTK, MAPK e a proteína cinase C épsilon (PKC<sub>E</sub>). Estas cinases ativam o regulador de transcrição fator nuclear kappa-Beta (NF-kappa $\beta$ ) que aumenta a transcrição de várias proteínas. A abertura do canal mitoK<sub>ATP</sub> é necessária para limitação do infarto (Riksen et al., 2004).

O NO é um importante gatilho na proteção celular tardia. Durante o PCIT ocorre síntese de novas proteínas e aumento na transcrição de genes (no núcleo celular), necessários para a obtenção de proteção. Várias intervenções farmacológicas são hábeis para disparar a proteção tardia, simulando o PCI. A exposição breve aos agonistas seletivos dos receptores adenosina A1 e A3, os doadores de NO exógeno, as substâncias geradoras de ROS, a bradicinina, os agonistas  $\delta$ -opiídeos e a norepinefrina fornecem proteção tardia ao infarto (Yellon & Downey, 2003).



**Figura 2** - Representação simplificada do mecanismo de pré-condicionamento tardio: COX-2= ciclo-oxigenase 2; HSP= proteína de choque térmico; iNOS= óxido nítrico sintase induzível; KATP= canal de potássio sensível à adenosina trifosfato; MAPKs= proteínas cinases ativadas por NO= óxido nítrico; PI3K= enzima fosfatidilinositol-3-cinase; PKC-E= proteína mitógenos; MnSOD= superóxido dismutase manganês; NF-KB= fator de necrose tumoral kappa-Beta; cinase C épsilon; PTKs= proteínas tirosina cinases (Adaptado de Riksen et al., 2004).

Os eventos da I/R ocorrem com dois principais figurantes: o endotélio e os leucócitos. Há ativação dos leucócitos, quimiotaxia, adesão celular e transmigração, com interação do endotélio vascular em três diferentes etapas: 1) “rolamento leucocitário” no endotélio; 2) aderência leucocitária ao endotélio; 3) transmigração endotelial (Figura 3). Existe uma interação subsequente dos leucócitos b2 integrinas, como CD11A/CD18, com moléculas de adesão acarretando aderência leucocitária e parada de movimentação. A transmigração leucocitária para o compartimento intersticial é facilitada pela molécula 1 de adesão celular plaqueta-endotelial (PECAM-1). Ao chegar no compartimento extravascular, os leucócitos ativados liberam ROS, proteases e elastases, resultando em um aumento da permeabilidade microvascular, edema, trombose e morte celular parenquimatosa (Collard & Gelman, 2001).



**Figura 3** - Aderência celular leucócito-endotelial e transmigração após a I/R.

Os leucócitos ativados interagem com o endotélio vascular em fases distintas. A fase 1, a de “rolamento”, é iniciada pela indução do aumento endotelial da expressão de P-selectina que interage, no leucócito, com o seu contra-receptor – a P-selectina glicoproteína-1 (PGSL-1). Na fase 2, a interação leucócito-integrina b2 (CD11a/CD18 e CD11b/CD18) com a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) leva a uma firme aderência e agregação leucocitária. A fase 3 é caracterizada por transmigração leucocitária para o interstício, facilitada pela molécula 1 de adesão celular plaqueto-endotelial (PECAM-1), dentro das junções das células endoteliais (Collard & Gelman, 2001).

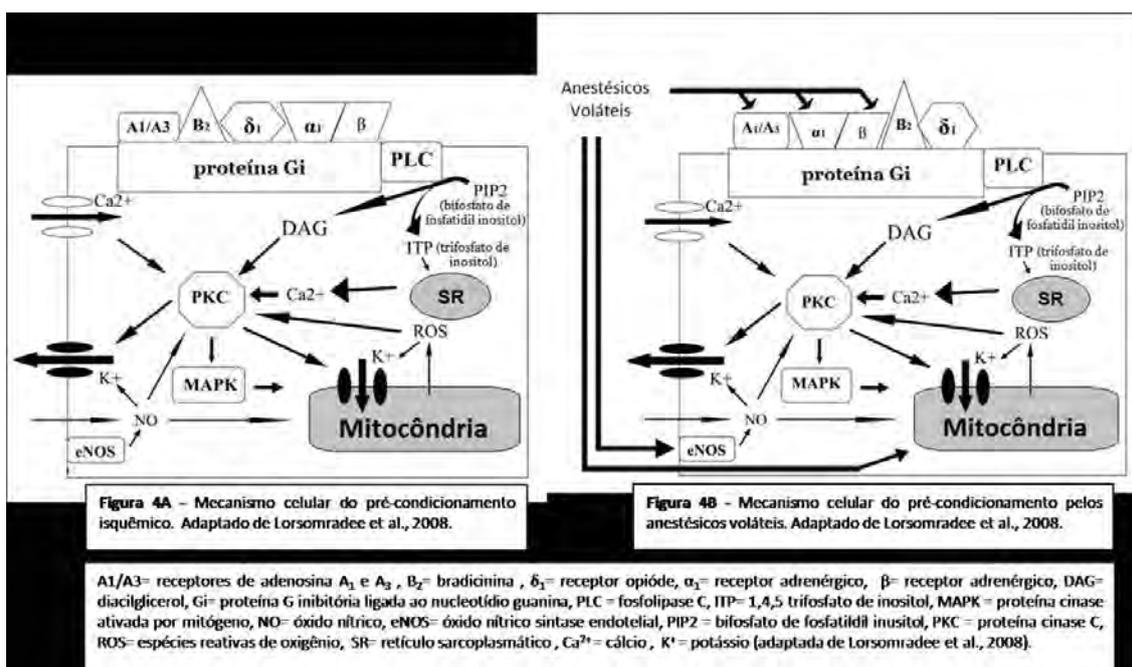
### 1.2.2 O PRÉ-CONDICIONAMENTO FARMACOLÓGICO

Anestésicos voláteis halogenados pré-condicionam diretamente (Kersten et al., 1996; Cason et al., 1997), ou aumentam o PCI, indiretamente, resultando em proteção cardíaca contra infarto do miocárdio, sendo que o  $K_{ATP}$  tem papel importante (Kersten et al., 1997). Assim, o pré-condicionamento farmacológico (PCF) produzido por anestésicos voláteis halogenados, incluindo isoflurano, desflurano e sevoflurano, é

muito similar ao PCI (Julier et al., 2003; Tanaka et al., 2004) e compartilha com o PCI muitos dos elementos transdutores de sinais. O isoflurano é capaz de preconditionar o miocárdio contra infarto pela liberação de radicais livres (Müllenheim et al., 2002).

Em estudos experimentais, enquanto o tiopental em dose clínicas parece não bloquear o pré-condicionamento (Müllenheim et al., 2001a), outros estudos mostraram que a cetamina, mas não a S(+)-cetamina, bloqueou completamente a cardioproteção do PCI *in vitro* e *in vivo* (Müllenheim et al., 2001b; Molojavyi et al., 2001). Este efeito foi estéreo-específico para o isômero R (cetamina). Por estes resultados é recomendável evitar-se o uso da cetamina racêmica em ocasiões que ocorram a I/R.

Existem algumas diferenças entre o PCI e o pré-condicionamento farmacológico pelos anestésicos halogenados propostas por Lorsomradee et al., 2008 (Figuras 4A e 4B).



Os receptores de adenosina A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub> (A1/A3), bradicinina (B<sub>2</sub>), δ<sub>1</sub>-opióide, α<sub>1</sub>-adrenérgico e β-adrenérgico são ativados e estimulam a fosfolipase C (PLC) por meio da inibição da proteína Gi (proteína Gi= nucleotídeo de guanina ligado a proteínas). A PLC produz diacilglicerol (DAG) e 1,4,5 trifosfato de inositol (ITF). O DAG e o ITF ativam a proteína cinase C (PCK). A PCK atua abrindo canais de potássio sensíveis a ATP (canais K<sub>ATP</sub>) e provavelmente via proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) (Lorsomradee et al., 2008).

As proteínas G são uma família de proteínas ligadas ao nucleotídeo guanina que apresentam homologia estrutural e estão acopladas aos receptores de superfície celular, com uma grande variedade de efetores intracelulares e segundos mensageiros. Elas participam da transdução de sinais inibitórios (Gi) ou estimulantes (Gs) entre as superfícies da membrana.

A abertura dos canais mitocondriais de  $K_{ATP}$ , o aumento de ROS, a ativação ou a translocação da proteína cinase C, da proteína tirosina cinase e proteína cinase p38 ativada por mitógeno, diminuem a entrada mitocondrial do cálcio (Figuras 4A e 4B) (Lorsomradee et al., 2008).

Os anestésicos voláteis halogenados aumentam a abertura dos canais de  $K_{ATP}$  pela ativação da fosfolipase C (PLC), por meio da adenosina A1 e A3 (A1/A3), pela estimulação do receptor adrenérgico e pela ativação da sintase do NO endotelial (eNOS) (Lorsomradee et al., 2008).

Os anestésicos voláteis halogenados também podem proteger o miocárdio mediando à liberação do NO (Novalija et al., 1999).

Anestésicos voláteis halogenados pré-condicionam diretamente (Kersten et al., 1996; Cason et al., 1997), ou aumentam o PCI, indiretamente, resultando em proteção cardíaca contra infarto do miocárdio, sendo que o  $K_{ATP}$  tem papel importante (Kersten et al., 1997). Assim, o pré-condicionamento farmacológico produzido por anestésicos voláteis halogenados, incluindo isoflurano, desflurano e sevoflurano, é muito similar ao PCI (Julier et al., 2003; Tanaka et al., 2004) e compartilha com o PCI muitos dos elementos transdutores de sinais. O isoflurano é capaz de preconditionar o miocárdio contra infarto pela liberação de radicais livres (Müllenhein et al., 2002).

### **1.3 O PÓS-CONDICIONAMENTO FARMACOLÓGICO**

A administração de anestésicos voláteis halogenados no período pós-ischêmico também pode proporcionar a cardioproteção, como evidenciado pela melhoria da função endotelial, redução do tamanho do infarto e menor grau de apoptose (Feng et al., 2005, 2006). Este mecanismo de proteção aplicado após o evento isquêmico é denominado de pós-condicionamento e tem aplicações clínicas na anestesia, principalmente nas situações de emergência, quando o paciente já sofreu ou está em isquemia.

Poscondicionamento (PosC) é uma efetiva e relevante estratégia terapêutica clínica para proteção cardíaca. O primeiro relato de PosC foi de Zhao et al., 2003, onde ciclos breves de reperfusão e isquemia de reperfusão reduziram a extensão do infarto semelhante ao pré-condicionamento. Importante lembrar que PosC pode ser farmacologicamente induzido por anestésicos inalatórios (Chiari et al., 2005; Weihrauch et al., 2005) e opióides (Gross & Gross, 2006; Weihrauch et al., 2005), que mostram a produção de potentes efeitos preconditionantes. O conhecimento prévio da isquemia (como preconditionante) é fator importante para terapêutica significativa do PosC. Marcantes trajetos envolvidos no PosC incluem várias cinases sinalizadoras pro-sobrevivência anti-apoptóticas (Tsang et al., 2004; Weihrauch et al., 2004), e o MPTP, (Argaud et al., 2005; Krolikowisk et al., 2005).

Anestésicos voláteis dilatam as coronárias devido a atenuação da entrada de  $Ca^{2+}$  através dos canais voltage portão  $Ca^{2+}$  nos vasos do músculo liso (Buljubasic et al., 1992). Por outro lado, foi recentemente relatado que halotano e desflurano, mas não isoflurano, aumentam a liberação de NO nas coronárias de coelhos (Beaussier et al., 2002).

#### **1.4 O ANTICONDICIONAMENTO**

Foram descritos elementos que são capazes de retardar ou mesmo contrapor o desenvolvimento do pré-condicionamento. O envelhecimento, por exemplo, já foi descrito em algumas espécies animais como um impedimento. No entanto, ainda não há evidências de que o envelhecimento possa ser um fator restritivo ao pré-condicionamento em humanos (Downey & Cohen, 2009).

Existem diversos agentes que são capazes de bloquear o pré-condicionamento isquêmico, como inibidores de cinases e antagonistas de receptores opioides (Downey, 2000). Os receptores do subtipo  $\delta 1$  parecem ser os principais envolvidos no mecanismo de condicionamento (Aitchison et al., 2000).

#### **1.5 OS OXIDANTES E OS ANTIOXIDANTES**

Os radicais livres derivados de oxigênio desempenham um importante papel em muitos modelos de I/R experimentalmente induzida em laboratórios. Em vários modelos

experimentais os tecidos reperfundidos foram protegidos por varredores de radicais superóxidos. A disfunção induzida pelos radicais livres pode ser um componente importante nas doenças isquêmicas do coração, intestinos, fígado, rins e cérebro (McCord, 1985).

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre o nível de radicais livres e antioxidantes a favor dos radicais. Há grande número de estudos que mostram que varredores de oxigênio livre e antioxidantes podem reduzir as lesões teciduais agudas durante a pielonefrite aguda (Halliwell & Gutteridge, 1986; Halliwell et al., 1992; Kaur et al., 1988).

A varredura dos radicais livres de oxigênio, ocorrida pela administração de outros fármacos com atividade antioxidante comprovada “*in vivo*” e “*in vitro*”, reduz as ligações sulfídricas nas proteínas e inibe a peroxidação lipídica induzida pelo estresse oxidativo, durante o período de isquemia e reperfusão do órgão (Murphy et al., 1992).

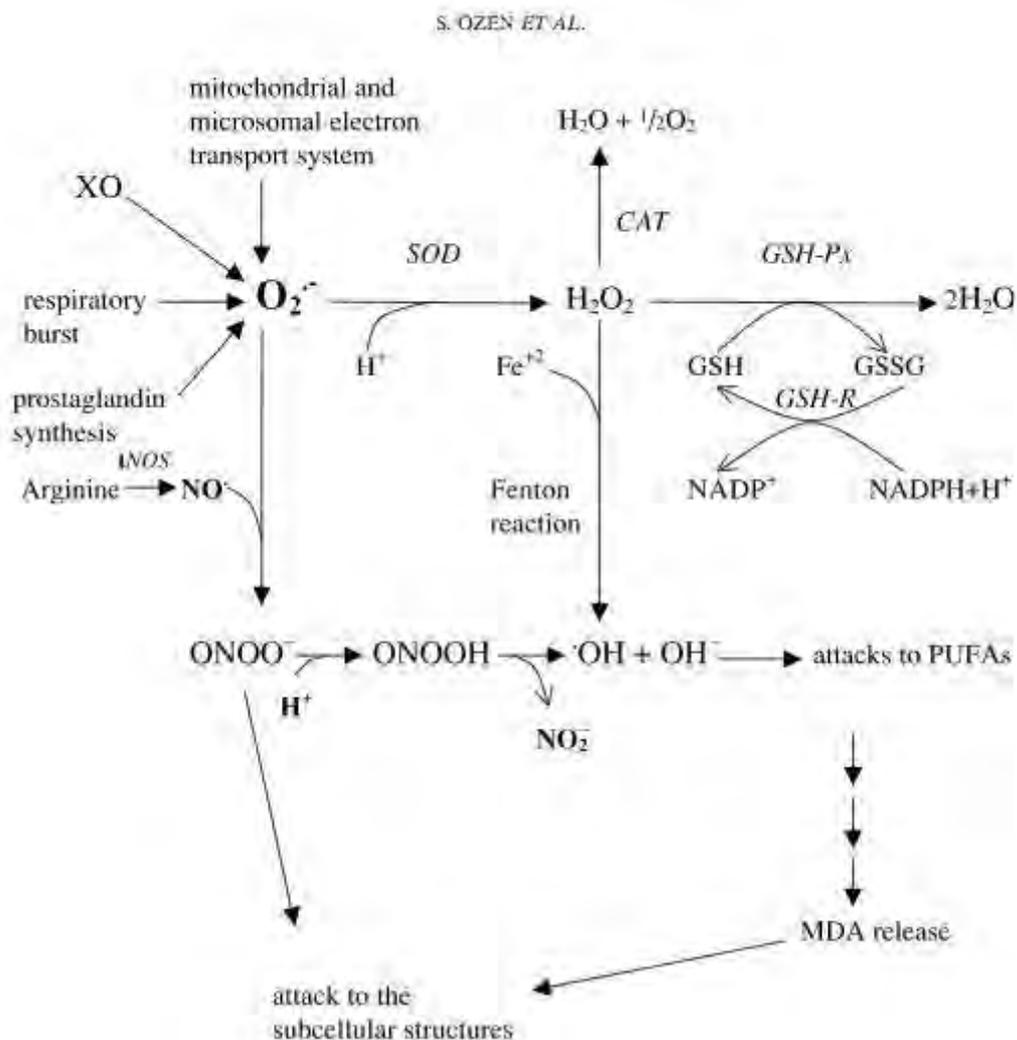
A sequência de eventos da lesão I/R envolve primeiro o endotélio durante a isquemia produzindo tanto radicais livres que com a isquemia sequestra e ativa neutrófilos, ampliando a lesão. Como os demais órgãos, os rins têm enzimas e não enzimas, defesas antioxidantes contra esta lesão potencial (Tabela 1). Apesar dos efeitos da suplementação externa de antioxidantes terem sido estudados em detalhe (Gianello et al., 1996; Kajiwara et al., 1996; Bosco et al., 1988), existem poucos estudos sobre atividades do sistema de defesa antioxidante enzimático endógeno na lesão de I/R (Dobashi et al., 2000; Barnard et al., 1993). Por outro lado, o papel dos neutrófilos, uma importante fonte de ROS na lesão I/R renal é controversa e necessita ser esclarecida.

**Tabela 1** – Defesas antioxidantes renais na I/R

<b>Defesas antioxidantes</b>	
<i>Enzimas</i>	<i>Não enzimas</i>
SOD	Tocoferóis
GSH-Px	Carotenos
CAT	Ubiquinol
	Glutathione
	Ácido ascórbico

Adaptada de Dobashi et al., 2000

As interações moleculares que ocorrem na lesão por reperfusão são conhecidas por envolverem, além da formação do ROS, peroxidação lipídica, produção de eucosanóides, ativação de neutrófilos, infiltração, ativação do complemento e produção de citocinas (Appell et al., 1999).



**Figura 5 - Representação esquemática dos mecanismos oxidantes e antioxidantes:**  $O_2^{\cdot-}$  superóxido anion radical;  $O_2$  molecular oxygen;  $H^+$  hydrogen ion, proton;  $H_2O$  water; SOD superoxide dismutase; CAT catalase;  $H_2O_2$  hydrogen peroxide; GSH-Px glutathione peroxidase; GSH reduced glutathione; GSSG oxidized glutathione; GSH-R glutathione reductase;  $NADPH + H^+$  reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate;  $NADP^+$  oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate;  $Fe^{2+}$  ferrous iron;  $OH^-$  hydroxyl ion;  $\cdot OH$  hydroxyl radical (the most potent free oxygen radical); tNOS total nitric oxide synthases; NO nitric oxide radical;  $ONOO^-$  peroxynitrite; MDA malondialdehyde (the last product of lipid peroxidation of membrane phospholipids);  $NO_2^-$  nitrite; PUFA polyunsaturated fatty acid; XO xanthine oxidase (Özen et al., 2004).

Os componentes do ROS podem causar lesão celular quando são produzidos, de modo excessivo e arriscado, lípidos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (Tabela 2), sendo o radical hidroxila ( $\text{HO}\cdot$ ) o mais potente radical de oxigênio livre.

**Tabela 2** – Componentes do ROS

<b>Radicais</b>	<b>Nomes</b>
$\text{HO}\cdot$	Hidroxila
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Ânion superóxido
$^1\text{O}_2$	Oxigênio
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrogênio
$\text{NO}\cdot$	Ácido nítrico

Adaptada de Clanton et al., 1999; Cheeseman, 1993; Marx & Chevion, 1986.

Em estudo detalhado (Juhászova et al., 2004), foi demonstrado que tanto PCI como o farmacológico, por uma variedade de fármacos, agem inibindo a abertura do poro induzida pelas ROS durante a reperfusão, o que esclarece em grande parte a cascata sinalizadora responsável pela inibição do poro.

A superóxido dismutase (SOD) é um potente enzima que pode alimentar  $\text{O}_2^{\cdot-}$  pela catalização de sua dismutação para  $\text{H}_2\text{O}_2$  e oxigênio ( $\text{O}_2$ ). Outro enzima antioxidante, CAT, catalisa a conversão da  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água e oxigênio. Avaliações das atividades dos radicais livres que alimentam enzimas nos níveis finais da peroxidação no plasma ou tecidos musculares poderiam aumentar nossa compreensão do mecanismo da lesão por isquemia seguida de reperfusão (Ozyurt et al., 2007).

Reperfusão de rins isquêmicos aumenta o risco do efeito precoce da lesão isquêmica liberar formas de ROS e acúmulo de neutrófilos ativado acarretando a lesão de reperfusão (Bulkley, 1987). Durante este processo muitas moléculas de oxigênio são fornecidas aos tecidos e grande quantidade de ROS é produzida (Aust et al., 1986). Em isquemia renal experimental, a fonte de ROS inclui cadeia de transporte de elétrons, enzimas oxidantes como xantina oxidase e fagócitos. ROS causa peroxidação lipídica das membranas celulares e alteração da integridade estrutural e da capacidade do transporte e produção de energia (Baud et al., 1993). ROS produzidos nos sistemas biológicos durante processos fisiológicos e fisiopatológicos são atribuídos ao envolvimento da lesão da isquemia seguida de reperfusão. Células leucocitárias e endoteliais ativadas podem gerar estas espécies, o que resulta em dano celular.

Reperusão de áreas isquêmicas aumenta o efeito da lesão isquêmica precoce pela liberação de ROS e acúmulo de neutrófilos ativados. ROS pode lesar proteínas, lípidos, carboidratos e ácidos nucleicos. Contrários a esta potencial lesão, o organismo utiliza suas defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Existe um estranho equilíbrio entre a produção e a destruição de ROS. Quando este equilíbrio é destruído, excesso de ROS é produzido e todos os tecidos são expostos à lesão oxidativa (Aust et al., 1986; Hosnuter et al., 2004).

Anestesia associada com hipotensão arterial e resultante isquemia tecidual também é sugerida como um dos fatores que acarretam a nefrotoxicidade tubular (Zager, 1988, 1991). Todavia, não há evidências satisfatórias de como estes mecanismos moleculares ocorreram. Aumento da concentração dos fluoretos devido ao anestésico pode prejudicar o sistema de defesa antioxidante pelo aumento do complexo dos metais. Os resultados sugerem que os sistemas de defesa antioxidantes enzimático e não enzimático foram prejudicados devido ao tratamento com isoflurano liderando o estresse nas células tubulares e acelerando as reações de peroxidação no tecido renal.

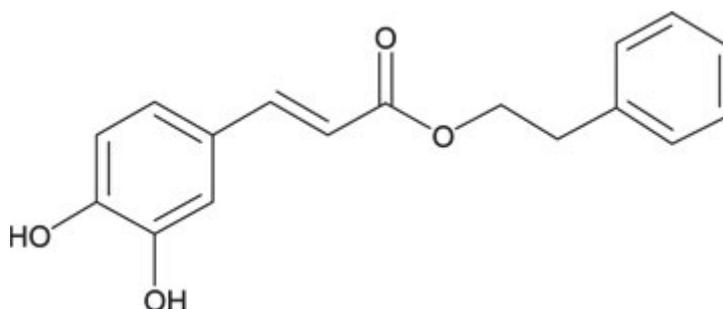
## 1.6 O CAPE (*caffeic acid phenethyl ester*)

Própolis de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) é um produto da colmeia, elaborado a partir de exsudatos de resinas que as abelhas recolhem de determinadas plantas. A composição química da própolis é complexa e relacionada à diversidade vegetal encontrada em torno da colmeia. Embora a própolis seja utilizada em medicina popular há milhares de anos, a falta de padrões que avaliem de maneira precisa suas atividades farmacológicas dificulta a padronização de produtos comerciais que garanta sua eficácia e segurança terapêutica para humanos e outros animais. A própolis recolhida de uma colmeia de abelhas, também conhecida como própolis bruta, apresenta em sua composição básica cerca de 50% de resinas vegetais, 30% de cera de abelha, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de detritos de madeira e terra (Monti et al., 1983; Cirasino et al., 1987). Estes valores se referem à espécie *Apis mellifera* L., cuja própolis é a mais estudada entre as abelhas.

A sigla inglesa CAPE é aceita de modo consagrado pela literatura nacional e internacional como sigla do fenil éster do ácido cafêico. A própolis tem vários

componentes, mas somente o CAPE tem ação anti-inflamatória. São componentes da própolis: flavonóides (galangina, quercetina), ácido cinâmico e seus derivados (ácido clorogênico, ferrúlico e CAPE), esteróides, aminoácidos, aldeídos e cetonas voláteis (Borrelli et al., 2002).

O CAPE é um ativo componente flavonóide do extrato da própolis da abelha. A flavona é uma substância cristalina, amarela, encontrada em flores e folhas. Possui dois grupos hidroxilas localizados no primeiro anel catecol que lhe conferem a propriedade antioxidante (figura 6). A atividade antioxidante depende não apenas do grupo hidroxila, mas também do coeficiente de partição ou hidrofobicidade do CAPE (Özen et al., 2004). Por ter capacidade de se unir aos lípides é um potente inibidor da peroxidação lipídica, tendo característica lipofílica (Irmak et al., 2003). O CAPE utilizado foi obtido pela síntese padronizada por Grunberger et al., 1988.



**Figura 6** – Estrutura química do CAPE (*caffeic acid phenethyl ester*).

CAPE: ácido 2-propenóico, 3-(3,4-dihidroxifenil), 2-feniletil éster  
 $C_{17}H_{16}O_4$   
 Peso Molecular = 284,3  
 Características da molécula: lipofílica e hidrofóbica

Através da conhecida própolis, o CAPE há muitos anos, e ainda na atualidade, tem sido usado na medicina popular. Tem propriedades antioxidantes pela inibição da atividade da lipoxigenase e pela supressão lipídica da peroxidação (Sud'ina et al., 1993; Hepsen et al., 1997; Hepsen et al., 1999; Ilhan et al., 1999; Koltuksuz et al., 1999, 2000). O CAPE inibe o crescimento (citotoxicidade) de diferentes tipos de transformações de células (Grunberger et al., 1988; Khayyal et al., 1993) e pode inibir a produção de peróxido de hidrogênio do éster forbol e a produção tumoral (Frenkel et al.,

1993). Na concentração de  $10 \mu\text{mol.Kg}^{-1}$  o CAPE bloqueia completamente a produção de ROS em neutrófilos humanos e o sistema xantina/xantino oxidase (Sud'ina et al., 1993). Tem propriedades anti-inflamatórias (Michaluart et al., 1999), antiviral (Fesen et al., 1994), imunomoduladora (Fischer et al., 2008). A própolis é o medicamento atual e do futuro (Karsten, 2001), usado na medicina moderna (Stefano & Francesco, 2002; Menezes, 2005; Fischer et al., 2008).

Os índices de estresse oxidativo em ratos com I/R renal foram modificados pelo CAPE (Ozyurt et al., 2001). O CAPE na concentração de  $10 \mu\text{mol.kg}^{-1}$  intraperitoneal bloqueia completamente a produção de ROS nos neutrófilos e o sistema oxidativo xantina-xantino oxidase (Ozer et al., 2004).

O CAPE tem sido usado como antioxidante em processos oxidativos em modelos animais (Fadillioglu et al., 2003; Rezzani et al., 2005). Facilmente atravessa a membrana celular, penetrando na célula, e não tem sido descrita toxicidade quando administrado nos animais estudados (Noelker et al., 2005; Uzar et al., 2006). Foi usado para proteger tecidos do estresse oxidativo mediado pelo ROS e reduzir a peroxidação lipídica em lesões tóxicas e isquêmicas (Irmak et al., 2003; Ozyurt et al., 2001). ROS ataca ácidos gordurosos não polissaturados (PUFAs) nas membranas lipídicas e desse modo a peroxidação lipídica resulta na perda da fluidez e ruptura das membranas. A avaliação das substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é provavelmente o método mais comumente aplicado para a dosagem da peroxidação lipídica (Esterbauer, 1993).

O CAPE protege contra a nefropatia causada pelo metotrexate (MTX), (Uz et al., 2005). Os resultados revelaram, no grupo que recebeu somente MTX, aumentos significantes da adenosina deaminase (ADA), da XO e do NO. Porém, no segundo grupo, que recebeu MTX mais CAPE, estes aumentos não ocorreram.

O CAPE protegeu contra lesão da isquemia seguida de reperfusão da medula de coelhos (Ilhan et al., 1999). Antes da oclusão aórtica se administrou em quatro grupos:  $30 \text{ mg.kg}^{-1}$  de metilprednisolona (MP), via intraperitoneal;  $10 \mu\text{mol.kg}^{-1}$  de CAPE, via intraperitoneal; volume equivalente de NaCl a 0,9% no grupo controle. No grupo sham a aorta não foi ocluída. Foi procedida a avaliação neurológica do déficit motor dos membros inferiores. A avaliação demonstrou que os níveis de malondialdeído (MDA)

foram maiores no grupo controle do que nos grupos sham e MP. O grupo CAPE não apresentou lesões teciduais, comparado com o grupo controle.

O CAPE apresenta ação antioxidante protetora do estresse oxidativo tubular renal causado pelas ondas de choque da litotripsia extracorpórea (OCLE), (Ozguner et al., 2005). Dois grupos de coelhos foram às OCLE: controle, que recebeu apenas OCLE; CAPE recebeu  $10 \mu\text{mol.kg}^{-1}$  intraperitoneal por dia durante 10 dias antes da OCLE. A avaliação revelou que no grupo controle aumentaram significativamente os neutrófilos, uréia e ácido úrico. No grupo CAPE os valores foram menores.

O CAPE em administração profilática protege lesão por isquemia seguida de reperfusão renal em ratos (Gurel et al., 2004). O procedimento foi realizado em 5 grupos: sham; isquemia; I/R; CAPE mais I/R; vitamina E mais I/R. Foram submetidos a laparotomia mediana. Aos 10 minutos de oclusão da artéria renal direita (menos o grupo sham), foi administrado via intraperitoneal NaCl a 0,9% no grupo I/R,  $10 \mu\text{mol.kg}^{-1}$  de CAPE em 10% de etanol via intraperitoneal e  $10 \text{mg.kg}^{-1}$  de vitamina E no último grupo. Aos 30 minutos de isquemia do rim direito, foi procedida a reperfusão por 30 minutos, seguida de nefrectomia bilateral. No grupo isquemia não foi procedida a reperfusão. O resultado revelou que CAPE diminuiu de modo significante a mieloperoxidase (MPO) tecidual, impedindo o sequestro de neutrófilos, atenuando a lesão tecidual.

O CAPE tem efeito protetor na torção/distorção (T/D) da artéria testicular em ratos (Uz et al., 2002), que foram divididos em 4 grupos: sham; controle (torção) (T); T/D mais NaCl a 0,9% intraperitoneal 30 minutos antes da T/D; T/D mais  $10 \mu\text{mol.kg}^{-1}$  de CAPE intraperitoneal 30 minutos antes da T/D. Com exceção do grupo sham, os demais foram submetidos à torção testicular esquerda (rotação de 720 graus). Após torção de 2 horas e distorção de 4 horas, os animais foram sacrificados e realizada orquiectomia bilateral. No grupo T/D mais CAPE as lesões testiculares estavam menores, SOD menor do que no grupo T/D, aumento da MPO e TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). Houve maior inibição do neutrófilo mediador da lesão celular pelo CAPE.

O estudo do CAPE foi realizado em ratos com diferentes agentes anestésicos e sob diferentes vias de aplicação dos mesmos, como cetamina intramuscular (Uz et al., 2005; Oktem et al., 2005; Tekin et al., 2008; Tamer et al., 2004, Çalikoglu et al., 2003;

Koltuksuz et al., 1999), cetamina intraperitoneal (Uz et al., 2002), cetamina intramuscular mais xilazina intramuscular (Bilen et al., 2006), cetamina intraperitoneal mais xilazina intraperitoneal (Saavedra-Lopes et al., 2008; Ozyurt et al., 2007; Khan et al., 2007; Aydogan et et al., 2007, Ek et al., 2008), cetamina intramuscular mais xilazina intramuscular mais propofol intraperitoneal (Akyol et al., 2006), éter (Gurel et al., 2004; Özyurt et al., 2001; Irmak et al., 2001), halotano mais óxido nitroso (Tsai et al., 2006), uretano intraperitoneal (Ozer et al., 2004; Eşrefoğlu et al., 2005; Ozer et al., 2005; Huang et al., 2005; Yildiz et al., 2009) e pentobarbital intraperitoneal (Andrade-Silva et al., 2009). Houve estudo do CAPE sem anestesia (Buyukberber et al., 2009). O CAPE foi estudado em coelhos também com diferentes anestésicos e sob diferentes vias de aplicação dos mesmos, como pentobarbital intravenoso (Tan et al., 2005), cetamina intramuscular (Osguner et al., 2005) e cetamina intramuscular mais xilazina intramuscular (Ilhan et al., 1999). Éter mais cetamina intraperitoneal mais xilazina intraperitoneal foi a técnica anestésica utilizada em ratos para estudo de I/R, porém sem o uso do CAPE (Webster, 2005).

CAPE suprime o estresse oxidativo em pielonefrites induzido por *Escherichia coli* em ratos (Celik et al., 2007). A lesão oxidativa é conhecida por envolver destruição de tecidos mediada pela inflamação, modulação de radicais livres de oxigênio. O CAPE, além das propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, tem ação antibacteriana. Foi investigada a eficiência do CAPE administrado na prevenção de lesões oxidativas na pielonefrite (PYN) causada pela *Escherichia coli*. O experimento constou de 35 ratos Wistar distribuídos nos grupos controle, PYN 24h, PYN 48h, PYN 72h, CAPE 24h, CAPE 48h e CAPE 72h. *E. coli* ( $1 \times 10^9$  c.f.u.) foi inoculada nos ratos PYN e CAPE via cateterização uretral. O CAPE foi injetado em todos os ratos CAPE na dose de  $10\mu\text{mol.kg}^{-1}$ , 24 horas antes da infecção por *E. coli* e injeções foram repetidas cada 24 horas. Os ratos foram sacrificados 24h, 48h e 72h após a infecção nos grupos PYN e CAPE. Os níveis de MDA e NO foram significativamente maiores nos rins do grupo PYN. As atividades das enzimas antioxidantes CAT, SOD, GSH-Px e XO estiveram elevadas pela *E. coli*. A administração do CAPE reduziu os níveis de atividade de XO com aumento de atividade de SOD e GSH-Px. Exame histopatológico mostrou que o CAPE diminuiu a inflamação induzida pela *E. coli*. A administração do CAPE diminuiu a lesão oxidativa ocorrida na PYN.

O exato mecanismo de proteção que ocorre na I/R renal é ainda desconhecido. Há necessidade de ampliar estudos sobre a participação do CAPE no PC farmacológico renal, seja pela importância clínica do assunto, seja pelas importantes propriedades apresentadas pelo CAPE.

## **2 OBJETIVO**

---

O objetivo desta pesquisa experimental foi avaliar o efeito do CAPE em ratos anestesiados com isoflurano, submetidos à nefrectomia direita e ao clampeamento de artéria renal esquerda por 25 minutos.

### **3 MATERIAL E MÉTODO**

---

Após ser submetida e aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, foram incluídos nesta pesquisa 26 ratos Wistar, machos, com peso maior que 250 g, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu da UNESP.

### 3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

A indução anestésica foi realizada com isoflurano na concentração inspirada de 4% com fluxo de 3 L.min<sup>-1</sup> de oxigênio e manutenção com isoflurano na concentração de 1,5 a 2% com fluxo de 0,4 L.min<sup>-1</sup> de oxigênio. Os animais foram incluídos em três grupos:

- **Grupo Controle (GC ou G1), n=8** - os animais foram submetidos à laparotomia mediana, nefrectomia direita e isquemia do rim esquerdo durante 25 minutos.
- **Grupo “Caffeic Acid Phenethyl Ester” (GCAPE ou G2), n=10** - Os animais receberam 10 µmol.Kg<sup>-1</sup> de CAPE intraperitoneal, 30 minutos antes da laparotomia mediana, nefrectomia direita e isquemia renal esquerda durante 25 minutos.
- **Grupo Diluente (GD ou G3), n=8** - Foi injetado o volume diluente do CAPE intraperitoneal 30 minutos antes da laparotomia mediana, nefrectomia direita e isquemia renal esquerda durante 25 minutos.

Nos animais dos três grupos houve reperfusão renal durante 24 horas seguido de sacrifício.

### 3.2 SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL

Procedeu-se à preparação da solução injetável do CAPE, contido em pequeno frasco de cor âmbar com apresentação de 5 mg, peso molecular 284,3. Foi produzido pela “Life Science”, EEUU. Os 5 mg do CAPE, contendo 17.590 µmol, foram diluídos em 01 mL de solução de álcool etílico absoluto com grau de pureza de 99,9% (da empresa Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Alemanha). Feita a diluição, esta resultou na solução de 01 mL de solução alcoólica contendo 17.590 µmol do CAPE, chamada de “solução mãe”. Na sequência, foi retirado 0,1 mL da “solução mãe” que foi diluído com

49,9 mL (houve a diluição 1:500 deste 0,1 mL) do mesmo álcool etílico absoluto, que resultou em 1.759  $\mu\text{mol}$  em 50 mL, ou seja, 35,18  $\mu\text{mol. mL}^{-1}$ . Cada animal recebeu 10  $\mu\text{mol.Kg}^{-1}$  desta solução na cavidade peritoneal, dosagem e volume encontrados para cada animal através de regra de três simples.

Os ratos foram submetidos à seguinte sequência:

- 1) jejum alimentar;
- 2) pesagem dos animais;
- 3) sob a campânula, anestesia do animal com isoflurano a 4% com fração inspirada de oxigênio ( $\text{FiO}_2$ ) de 1,0, fluxo de  $3\text{L.min}^{-1}$ , em vaporizador Isotec 5 da Ohmeda;
- 4) em torno de 4 minutos o rato anestesiado é retirado da campânula, colocado em recosto de madeira de 45 graus, com borrachas estiradas prendendo o animal ao recosto pelo contorno dos dentes incisivos;
- 5) tração da língua do rato com pinça pela mão esquerda do técnico; introdução da lâmina do laringoscópio na cavidade oral; empunhadura do laringoscópio com a mão esquerda;
- 6) intubação traqueal com sonda H. T<sup>®</sup>. de polivinil flexível numero 240, adquirida da Hemo Técnico Artefatos de Plástico Ltda.
- 7) retirada do animal do recosto, colocação do mesmo sobre um plano de madeira em posição supina, fixação do tubo traqueal com cordonê, circundando o maxilar superior;
- 8) conexão do tubo traqueal ao ventilador artificial dos pulmões (com  $\text{FiO}_2$  de 1,0 e fluxo de  $0,4\text{ L.min}^{-1}$ ) 683 *Rodent Ventilator, Harvard Apparatus, Inc* (USA) e frequência respiratória de 80 por minuto e volume corrente de aproximadamente  $10\text{ mL}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ ;
- 9) observação do padrão respiratório pelo capnograma, o que permitia o ajuste da ventilação;
- 10) manutenção da anestesia com isoflurano entre 1,5 e 2,0%, com  $0,4\text{ L.min}^{-1}$  de oxigênio;
- 11) colocação do animal em decúbito dorsal (posição supina) sobre bolsa térmica gel (MERCUR<sup>®</sup>) aquecida em banho-maria (Banho Maria Modelo 102, FANEM

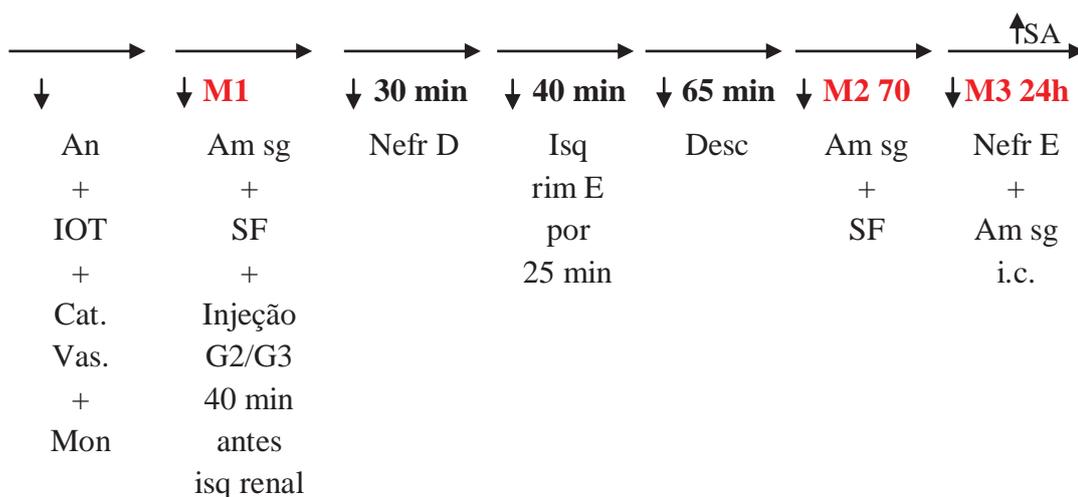
- LTDA®, São Paulo, Brasil), que estava colocada sobre plataforma de madeira, para manutenção da temperatura retal em aproximadamente 37<sup>0</sup> C;
- 12) fixação do animal sobre plataforma de madeira através de fios de cordonê nos seus 4 membros; colocação de bolsa térmica sob o animal;
  - 13) colocação de termômetro no reto do animal ligado a transdutor;
  - 14) antissepsia da região cervical com sabão neutro, seguida de tricotomia desta mesma região;
  - 15) incisão mediana na região cervical, dissecação e cateterismo da veia jugular externa direita com cateter “*extra-catch*” número 24, modelo Angiocatch® BD, para manutenção com 5 mL.Kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> da solução de Ringer lactato (RL) através da bomba de infusão Anne®, Abbott, EEUU, para reposição das perdas; fixação da veia jugular externa com fio de algodão 3-0;
  - 16) pela mesma incisão cervical, dissecação da carótida esquerda, cateterização da mesma com cateter “*extra-catch*” número 24, modelo Angiocatch® BD; fixação da carótida com fio de algodão 3-0; colocação dos transdutores para monitorização da pressão arterial média (PAM), através da conexão distal do cateter ao aparelho AS/3 da “Datex Engstrom®” tipo D-VCN 15-00-02 S/N 763177 (Finlândia); fechamento da incisão cervical com fio de nylon 4-0 em chuleio contínuo; a lavagem do sistema da pressão arterial invasiva foi feita com solução em frasco de 500 mL de RL, onde estava contido 2.500 unidades de heparina;
  - 17) momento 1 (M1): coleta de 1 mL de sangue arterial para leitura da concentração de creatinina, seguida de reposição da volemia com 2 mL da solução de cloreto de sódio a 0,9% pela veia jugular; injeção intraperitoneal da droga (no G2 foi injetado 10 µmol.kg<sup>-1</sup> do CAPE, diluído com álcool etílico absoluto Merck® de 99,9% de pureza, aspirado por micro-pipeta de precisão “Eppendorf Research®”; no G3 foi injetado apenas o diluente álcool etílico absoluto com 99,9% de pureza em volume igual ao do G2, obedecida a proporcionalidade de peso do rato).
  - 18) monitorização: a) fração expirada do gás carbônico (EtCO<sub>2</sub>); b) frequência cardíaca (FC); c) concentrações inspirada e expirada do isoflurane; d) fração inspirada de oxigênio (FiO<sub>2</sub>); e) temperatura retal (TR); f) Pressão arterial média (PAM). Estes valores foram anotados a partir de M1 e na sequência após M1: aos

15 minutos, 30 minutos (nefrectomia direita), 35 minutos, 40 minutos (clampeamento da artéria renal esquerda e início da isquemia renal), 50 minutos, 65 minutos (desclampeamento), pós-desclampeamento imediato e 70 minutos (M2), conforme tabelas 8, 9, 10, 11, 12 e 13 (Anexos).

- 19) verificação de ventilação adequada durante todo o experimento, através de aspiração com micro-sonda por dentro do tubo traqueal toda vez que surgia alteração respiratória (achatamento da curva da capnografia e diminuição da EtCO<sub>2</sub>), o que traduzia obstrução do tubo;
- 20) antisepsia da região abdominal com sabão neutro, tricotomia da região abdominal, laparotomia mediana;
- 21) nefrectomia direita (30 minutos após M1); cerca de 200 rins obtidos de nefrectomia direita por este laboratório, em pesquisas anteriores de I/R, foram submetidos aos exames histológicos e mostraram valores normais para este órgão.
- 22) exposição da artéria renal esquerda, isquemia renal através de *miniclamp* vascular atraumático (*bulldog*), aos 40 minutos após M1;
- 23) clampeamento da artéria renal esquerda por 25 minutos; observação da isquemia renal pela coloração do rim; durante o período de isquemia, a cavidade abdominal permaneceu fechada por meio de sutura com fio de nylon 4-0, com 3 a 4 pontos, em chuleio contínuo e recebeu aquecimento por bolsa térmica gel colocada sobre o abdome;
- 24) desclampeamento da artéria renal esquerda;
- 25) fechamento da parede abdominal com sutura contínua em único plano com fio de nylon 4-0 (geralmente 7 a 10 pontos); colocação de bolsa térmica gel sobre a parede abdominal até o término do procedimento;
- 26) momento 2 (M2): coleta de 1 mL de sangue arterial para leitura de creatinina, seguida da reposição da volemia com 2 mL da solução de cloreto de sódio a 0,9% pela veia jugular;
- 27) ligadura da veia jugular externa direita;
- 28) ligadura da carótida esquerda;
- 29) infiltração da pele e subcutâneo com solução de bupivacaina (tomados 0,3 mL a 0,5%, diluídos para 01 mL com soro fisiológico, sendo injetados 0,3 mL nas paredes da incisão cervical e 0,7 mL nas paredes da incisão abdominal);

- 30) recuperação anestésica do animal e extubação do mesmo, quando reassumia a respiração espontânea;
- 31) manutenção do animal em gaiola de container climatizado, com alimentação e analgesia por 24 horas;
- 32) 24 horas após a reperfusão do rim esquerdo: anestesia do animal com isoflurano a 4%, sob a campânula;
- 33) colocação do animal anestesiado sobre o plano de madeira;
- 34) retirada dos pontos da laparotomia mediana;
- 35) momento 3 (M3): retirada do rim esquerdo para exame histopatológico; retirada de 2 mL de amostra sanguínea intracardíaca, para dosagem de creatinina;
- 36) sacrifício dos animais com 3 mL de pentobarbital sódico a 2,5%, por via intracardíaca.

#### Sequencia experimental em relação ao tempo (minutos)



**Na = anestesia**

**IOT = intubação orotraqueal**

**Mon = monitorização**

**Am sg = retirado 1 mL de sangue arterial (dosagem de creatinina)**

**SF = reposição da volemia com 2 mL de NaCl a 0,9%**

**Injeção G2/G3: injeção intraperitoneal nos grupos G2 ou G3**

**Nefr D = nefrectomia direita**

**Isq = isquemia renal esquerda**

**Desc = desclampamento da artéria renal esquerda**

**Nefr E = nefrectomia esquerda**

**Am sg i.c. = amostra sanguínea intracardíaca**

**SA = sacrifício do animal**

### 3.3 ATRIBUTOS ESTUDADOS

Os atributos estudados em cada um dos animais dos três grupos de estudo foram:

- temperatura
- peso
- pressão arterial média
- creatinina plasmática
- exame histológico do rim esquerdo

#### *Temperatura*

Observada durante todo o experimento, mas anotada somente nos momentos M1 e M2.

#### *Peso*

Obtidos antes do início do experimento.

#### *Pressão arterial média (PAM)*

Observada durante todo o experimento, mas anotada somente nos momentos M1 e M2.

#### *Creatinina plasmática - Momentos Estudados*

Os valores da creatinina plasmática foram obtidos por meio do método enzimático em 3 momentos: no início do experimento (M1), após o fechamento da cavidade abdominal (M2) e 24 horas após o episódio de isquemia (M3).

### 3.4 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Depois de retirado, o rim esquerdo foi preparado para ser submetido à análise histológica. Foi seccionado longitudinalmente e armazenado em solução de DuBoscq-Brasil (6 mL de formol a 40%, 12 mL de álcool absoluto a 99,9%, 1,5 mL de ácido acético e 8 mL de ácido pícrico em solução saturada) por 24 horas.

O órgão foi armazenado em álcool 70% para posterior inclusão em parafina e estudo histológico através da coloração pela hematoxilina-eosina (HE). Os cortes foram

analisados com o auxílio de um microscópio de luz comum e de uma ocular integradora de 25 pontos (figura 7), sendo utilizado o aumento de 40 vezes.

As lesões histológicas pesquisadas em cada lâmina, foram avaliadas em duas regiões: a) Pericapsular, próxima à cápsula renal, “saltando” o primeiro campo abaixo da cápsula; b) Medular, na transição entre córtex e medula. Com base nos 25 pontos da ocular integradora, correspondentes aos 100%, foram contados os pontos que coincidem com áreas de lesão, caracterizadas por picnose, cariólise, cariorrexe e perda do arcabouço dos túbulos renais. Foram analisados 10 diferentes campos da região pericapsular e outros 10 da região medular. A técnica da ocular integradora dos 25 pontos empregada foi a mesma utilizada para contagem de células em outros órgãos (Teixeira et al., 1997; Mandarim-de Lacerda, 1991).

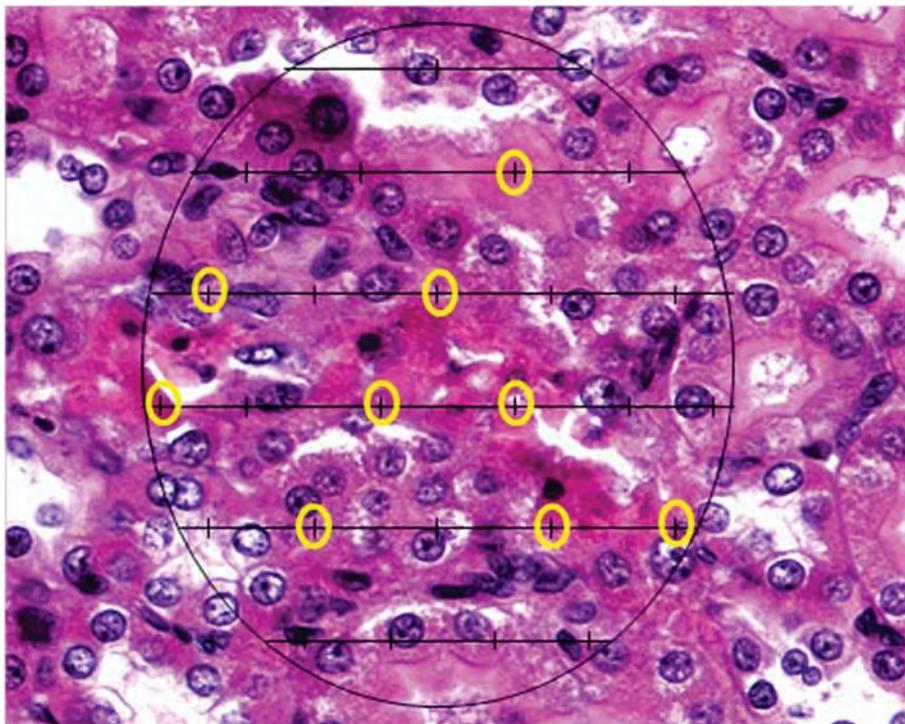
A patologista que realizou a avaliação histológica não teve conhecimento sobre a qual grupo pertenceu o rim. As alterações celulares encontradas foram inicialmente quantificadas em números pontos coincidentes com área de lesão por campo (n), e convertidas em porcentagem (% para 25 campos). Em seguida, as porcentagens encontradas foram transformadas, conforme a classificação de Park et al., 2008, que estabelece diferentes graus de alterações das células renais no estudo da necrose tubular aguda (NTA) (Tabela 3).

**Tabela 3** – Escores dos graus de lesão celular atribuídos aos exames histológicos

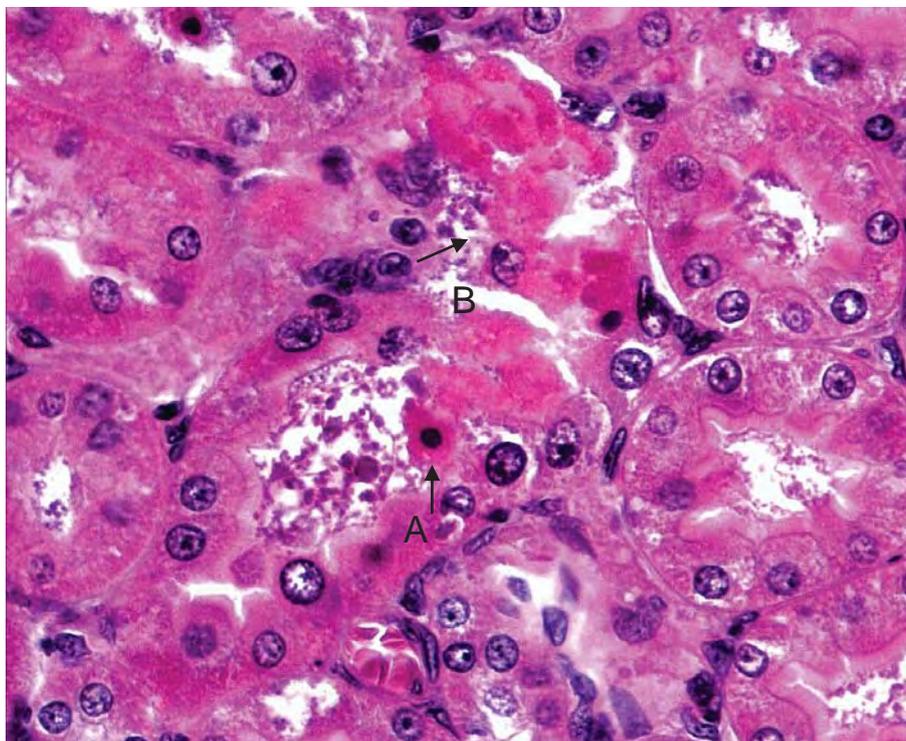
GRAU	TIPO (intensidade)	% DE LESÃO
0	Sem alterações	
1	Leves	< 10% de NTA
2	Leves a moderadas	10 a 25% de NTA
3	Moderadas a intensas	25 a 50% de NTA
4	Intensas	50 a 75% de NTA
5	Muito intensas	> 75% de NTA

Adaptada de Park et al., 2008

A figura 8 apresenta área de túbulos renais utilizada para a determinação da quantidade de focos de necrose tubular aguda.



**Figura 7** – Exemplo da análise morfométrica dos focos de morte celular através da ocular integradora de campos. Número total de campos=25, corresponde a 100%. Nesta imagem 9 pontos (36%) coincidiram com áreas de picnose, cariólise e perda do arcabouço tubular (HE, 1600X).



**Figura 8** – Focos de picnose (seta A), cariólise e perda do arcabouço tubular (seta B), (HE, 1600X)

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparação dos pesos dos animais dos três grupos foi utilizada a análise da variância. Para os valores de creatinina plasmática, foi utilizada a análise de perfil. Para as variáveis que utilizaram escores, sem distribuição normal e homogeneidade de variâncias, foram utilizados os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo, sendo  $p$  a probabilidade de erroneamente se concluir pela significância (Curi, 1998).

## **4 RESULTADOS**

---

#### 4.1 TEMPERATURA RETAL (°C)

A temperatura dos ratos estudados, em seus respectivos grupos (Tabela 4). Não houve diferença significativa da temperatura retal entre os grupos G1( grupo controle) e G2 (grupo CAPE- *caffeic acid phenethyl ester*).

**Tabela 4** - Temperatura retal (°C) dos ratos. Média e desvio-padrão segundo momento e grupo

Grupo	Momento	
	M1	M2
G1	37,6±1,2	37,5±1,5
G2	36,6±1,4	36,4±2,1
G3	36,7±1,2	37,0±1,0

p>0,05, Anova. G1: grupo controle; G2: grupo CAPE- *Caffeic Acid Phenethyl Ester*; G3: grupo diluente; M1 – início do experimento; M2 – momento após o fechamento da cavidade abdominal.

#### 4.2 PESO DO RATO (mg)

Os pesos dos animais nos respectivos grupos G1, G2 e G3 (grupo diluente), (Tabela 5). Os pesos dos animais do G2 foram significativamente maiores em relação a G1 e G3.

**Tabela 5** - Peso (g) dos ratos. Mediana, 1° e 3° quartis, entre colchetes, segundo o grupo

Variável	Grupo			Valor de p
	G1	G2	G3	
Peso-M1	314,0 [310,0; 330,0]a	410,1 [360,0; 450,0]b	380,0 [345,0; 420,0]b	0,0064

G1- grupo controle; G2 - grupo CAPE- *Caffeic Acid Phenethyl Ester*; G3 – grupo diluente; M1 – início do experimento. Letras minúsculas comparam grupos em cada variável. Grupos seguidos de pelo menos 1 letra em comum não diferem estatisticamente. Anova de *Kruskal-Wallis*.

### 4.3 PAM ( pressão arterial média – mm Hg)

A PAM medida em M1 e M2 nos animais dos grupos G1, G2 e G3. O valor de M2 em G3 foi significativamente maior em relação ao G1 e G2.

**Tabela 6** - PAM (mmHg) dos ratos. Média e desvio-padrão segundo momento e grupo

Grupo	Momento	
	M1	M2
<b>G1</b>	108,5±19,8a	77,9±18,0b
<b>G2</b>	116,0±6,8a	86,6±22,0b
<b>G3</b>	108,5±12,2a	90,8±19,7a

G1 - grupo controle; G2 - grupo CAPE- *Caffeic Acid Phenethyl Ester*; G3 – grupo diluente; M1 – início do experimento; M2 – momento após o fechamento da cavidade abdominal. Letras minúsculas comparam grupos em cada variável. Grupos seguidos de pelo menos 1 letra em comum não diferem estatisticamente. Anova.

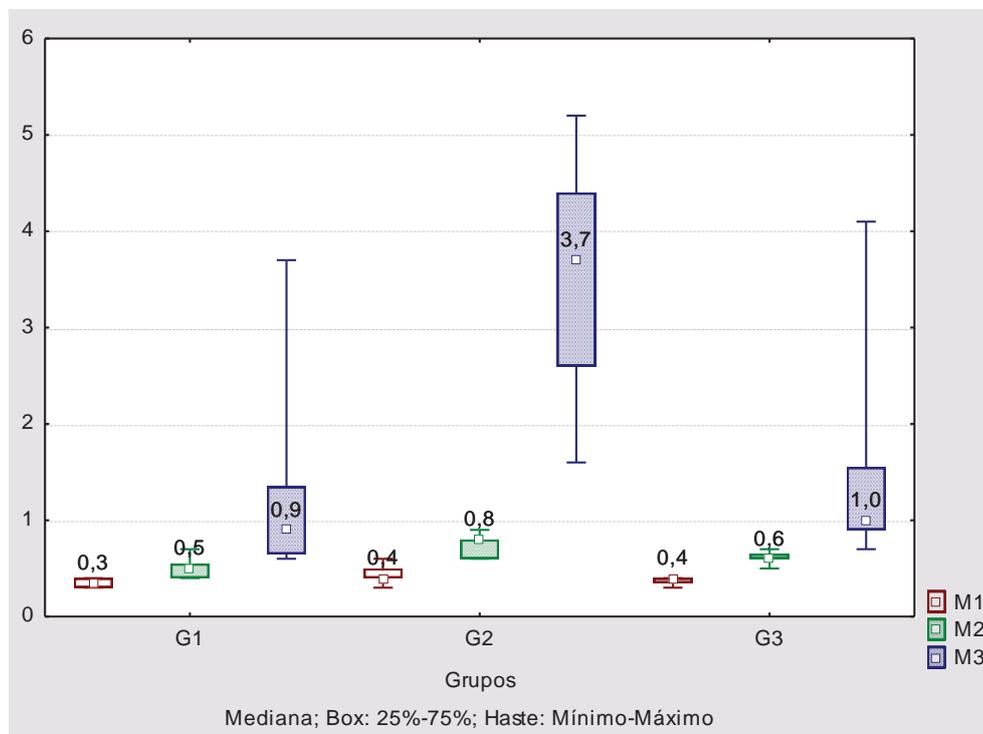
#### 4.4 CREATININA PLASMÁTICA - CrP (mg.100 mL<sup>-1</sup>)

Os valores da creatinina plasmática (Tabela 7 e figura 8) foram obtidos no início do experimento (M1), após o fechamento da cavidade abdominal (M2) e 24 horas após o episódio de isquemia (M3), nos animais dos Grupos G1, G2 e G3. Os valores de M2 e M3 foram significativamente maiores no G2 do que em G1 e em G3. Em relação a Creatinina-M1 não houve diferenças entre os grupos. As Creatinina-M2 e Creatinina-M3 apresentaram diferenças no grupo 2.

**Tabela 7** – Creatinina plasmática - CrP (mg.100mL<sup>-1</sup>) dos ratos. Mediana, 1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> quartis, entre colchetes, segundo o grupo

Variável	G1	G2	G3	Valor de p
<b>Creatinina-M1</b>	0,3 [0,3; 0,4]a	0,4 [0,4; 0,5]a	0,4 [0,3; 0,4]a	0,0540
<b>Creatinina-M2</b>	0,5 [0,4; 0,6]a	0,8 [0,6; 0,8]b	0,6 [0,6; 0,7]a	0,0012
<b>Creatinina-M3</b>	0,9 [0,7; 1,4]a	3,7 [2,6; 4,4]b	1,0 [0,9; 1,6]a	0,0014

G1- grupo controle; G2 - grupo CAPE- *Caffeic Acid Phenethyl Ester*; G3 – grupo diluente; M1 – início do experimento; M2 – momento após o fechamento da cavidade abdominal; M3 – 24 horas após o episódio de isquemia. Letras minúsculas comparam grupos em cada variável. Grupos seguidos de pelo menos 1 letra em comum não diferem estatisticamente. Anova de *Kruskal-Wallis*.



**Figura 9** – Creatinina plasmática (mg.100 mL<sup>-1</sup>) dos ratos. Mediana, 1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> quartis, entre colchetes, segundo momento e grupo.

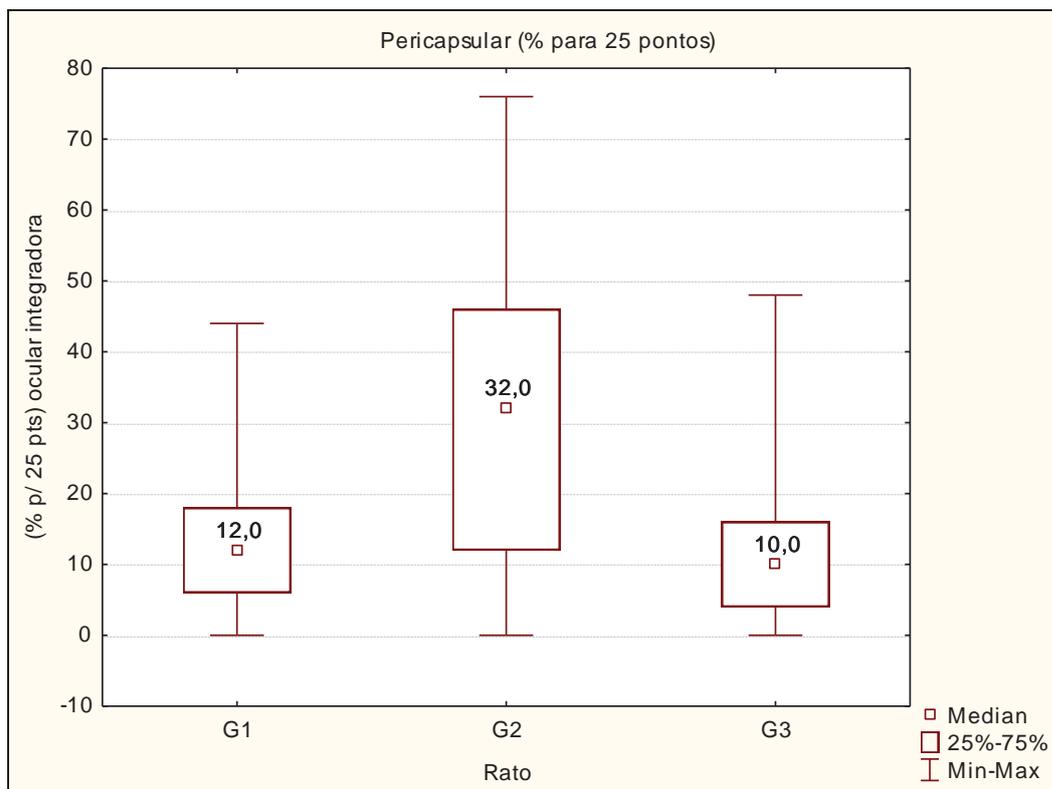
#### 4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO RIM

A Tabela 8 apresenta o resultado da análise das alterações pericapsular e medular por campo analisado (n), por porcentagem (%) e graduação de Park. As alterações da região pericapsular (tanto n quanto % e grau Park) foram significativamente maiores em G2 do que em G1 e G3. As alterações medulares apresentaram valores significativamente maiores em G2 do que G1 e G3. Para todas as variáveis o G2 teve valores maiores.

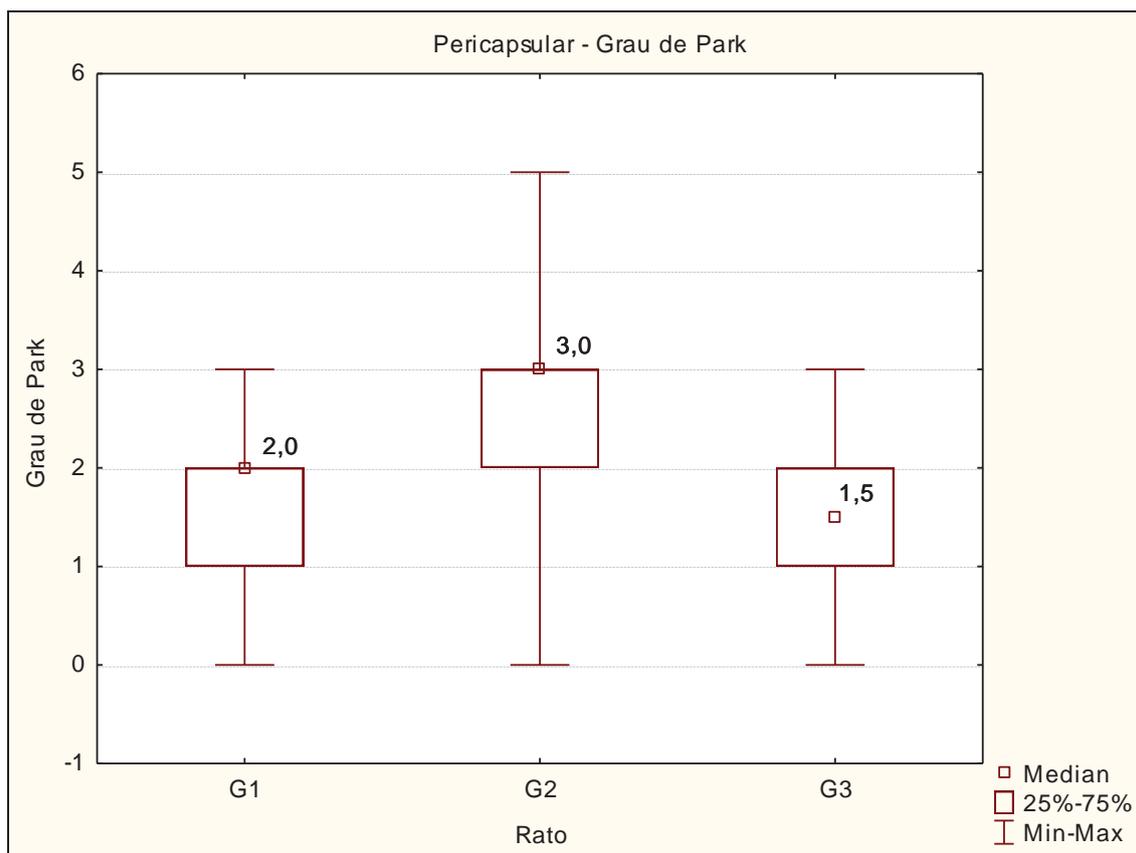
**Tabela 8** - Análises histológicas renais dos ratos. Mediana, 1º e 3º quartis, entre colchetes, referentes as variáveis de medidas gerais segundo grupo

Variável	Grupos			Valor de p
	G1	G2	G3	
<b>Pericapsular - n focos</b>	3,0[1,5;4,5]b	8,0[3,0;11,5]a	2,5[1,0;4,0]b	<0,001
<b>Pericapsular (% para 25 pontos)</b>	12,0[6,0;18,0]b	32,0[12,0;46,0]a	10,0[4,0;16,0]b	<0,001
<b>Pericapsular Grau (Park et al)</b>	2,0[1,0;2,0]b	3,0[2,0;3,0]a	1,5[1,0;2,0]b	<0,001
<b>Medular - n focos</b>	3,0[1,0;5,5]b	5,0[3,0;9,0]a	2,0[0,0;5,0]b	<0,001
<b>Medular (% para 25 pontos)</b>	12,0[4,0;22,0]b	20,0[12,0;36,0]a	8,0[0,0;20,0]b	<0,001
<b>Medular Grau (Park et al)</b>	2,0 [1,0; 2,0]b	2,0[2,0; 3,0]a	1,0[0,0; 2,0]b	<0,001

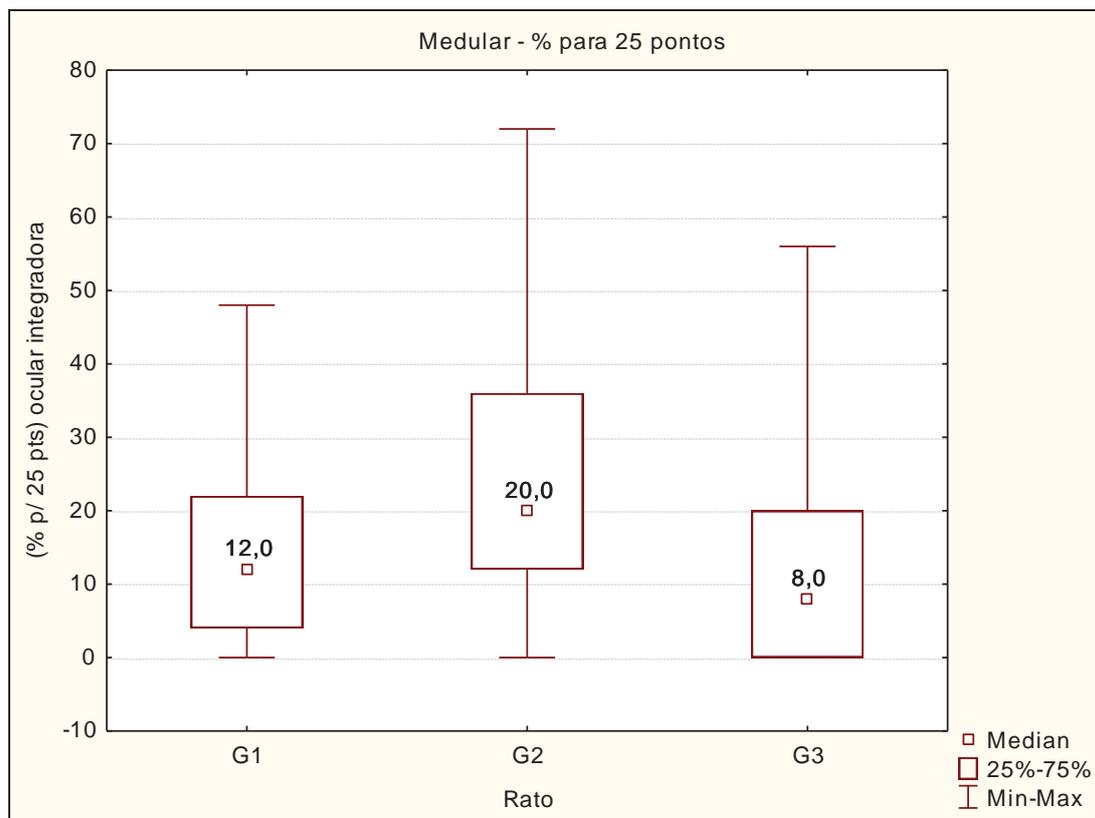
G1- grupo controle; G2 - grupo CAPE - *Caffeic Acid Phenethyl Ester*; G3 - grupo diluente. Letras minúsculas comparam grupos em cada variável. Grupos seguidos de pelo menos 1 letra em comum não diferem estatisticamente. Anova de Kruskal-Wallis.



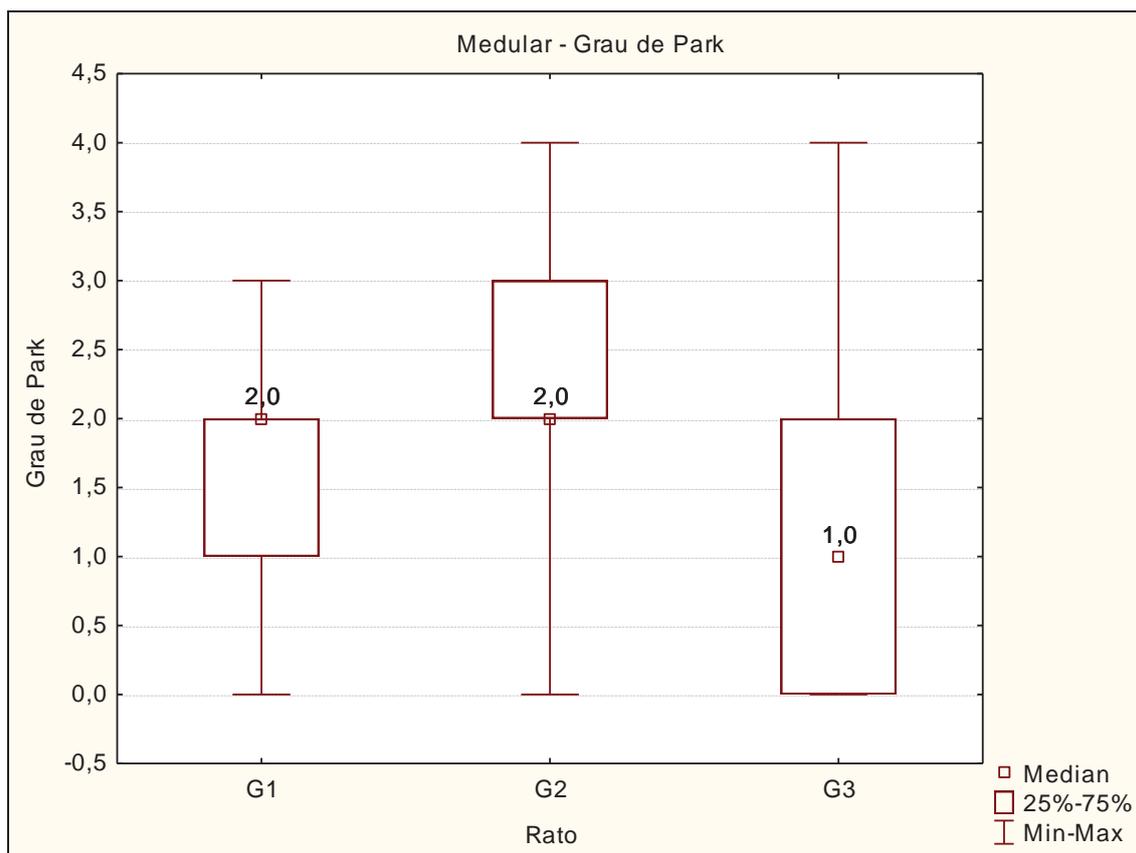
**Figura 10** - Análise das alterações pericapsulares renais em % por 25 campos. Os valores percentuais do G2 foram significativamente superiores aos do G1 e do G3.



**Figura 11**-Análise das alterações pericapsulares renais segundo os graus de Park. Os valores de G2 foram estatisticamente superiores ao G1 e ao G3. Entre G1 e G3 não houve diferença estatística.



**Figura 12**-Análise das alterações medulares renais em % por 25 campos. Os valores de G2 foram estatisticamente superiores ao G1 e ao G3. Entre G1 e G3 não houve diferença estatística.



**Figura 13**-Análise das alterações medulares renais segundo o grau de Park. Os valores de G2 foram estatisticamente superiores ao G1 e ao G3. Entre G1 e G3 não houve diferença estatística.

## **5 DISCUSSÃO**

---

## 5.1 MODELO ANIMAL

O animal escolhido para o experimento foi o rato Wistar por possuir algumas características importantes como modelo experimental que exige manuseio delicado (traqueia, artéria e veia de finos calibres), mas possibilita a coleta do material biológico em quantidade suficiente para a realização dos exames laboratoriais, conforme a literatura (Vianna et al., 2009; Saavedra-Lopes et al., 2008; Semedo et al., 2007; Ozyurt et al., 2006; Ozer et al., 2005). Estudo mostra em camundongos que animais machos foram escolhidos por serem mais susceptíveis à lesão por I/R renal (Park et al., 2004).

Para o experimento o animal escolhido foi o rato Wistar macho por possuir algumas características importantes como modelo experimental que exige para a sua execução técnicas como intubação orotraqueal, dissecação e introdução de cânulas na veia e na artéria. Isto irá possibilitar a coleta do material biológico em quantidade suficiente para a realização dos exames laboratoriais (Vianna et al., 2009; Saavedra-Lopes et al., 2008; Semedo et al., 2007; Ozyurt et al., 2006; Ozer et al., 2005), além da pressão arterial.

A técnica empregada de fazer previamente a nefrectomia direita e basear o estudo da I/R renal apenas no rim esquerdo tem embasamento em estudos de I/R com os dois rins, evidenciando a capacidade do rim contralateral compensar a função daquele submetido à isquemia (Islam et al., 1997). Um rim único pode ser mais susceptível à lesão de I/R do que quando o outro órgão permanece intacto (Fujii et al., 2005).

A anestesia realizada nos animais submetidos ao experimento consistiu na indução pelo isoflurano em respiração espontânea sob uma campânula. As concentrações do anestésico (4%) na indução satisfizeram as condições necessárias para a intubação traqueal, assim como na manutenção (1,5 a 2%) a imobilidade e o relaxamento muscular desejados foram alcançados. Estudos existem em que a traqueostomia foi apresentada como opção à intubação traqueal, empregando a ketamina e a xilazina intramusculares, assim como o relaxante muscular pancurônio (Akyol et al., 2006). Isoflurano protege a função renal contra a I/R renal (Hashiguchi et al., 2005).

A dosagem do CAPE utilizada neste estudo teve embasamento em experimentos de I/R em ratos através da via intraperitoneal na dose de  $10 \mu\text{mol.kg}^{-1}$  (Billen et al., 2006; Özyurt et al., 2001; Irmak et al., 2001; Koltuksuz et al., 1999; Atik et al., 2006;

Ozyurt et al., 2006; Akyol et al., 2006), embora a via intravenosa fosse também utilizada (Huang et al., 2005; Khan et al., 2007; Ozer et al., 2004, 2005), na mesma dosagem. Existem estudos com dose intravenosa de CAPE de  $50 \mu\text{mol.kg}^{-1}$  (Parlakpınar et al., 2005).

As escolhas da via intraperitoneal e da dose de CAPE  $10 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ , empregadas neste estudo, foram baseadas em estudos prévios na Turquia (Koltuksuz et al., 1999; Ozyurt et al., 2001, 2006, 2007; Çalikoglu et al., 2003; Tekin et al., 2008) e no Brasil (Saavedra-Lopes et al., 2008). Estudos recentes continuam usando a mesma dose pela mesma via na Turquia (Colbay et al., 2010).

Não há relatos na literatura sobre trabalhos experimentais de I/R com o CAPE em que os animais fossem anestesiados pelo isoflurano. Porém, há estudo do isoflurano protegendo a função renal contra a I/R renal (Hashiguchi et al., 2005).

A técnica ventilatória neste estudo foi a mesma empregada para estes mesmos animais submetidos à I/R renal por Vianna et al., 2009. Os parâmetros  $\text{FiO}_2$  e  $\text{EtCO}_2$  se mantiveram nos níveis desejados.

Além da reposição das perdas com Ringer Lactato, cuidados foram tomados para que perdas hídricas insensíveis maiores pudessem acontecer, através do fechamento da parede abdominal (sutura) no intervalo ocorrido (25 minutos) entre o clampeamento da artéria renal esquerda até o desclampeamento da mesma.

Para a manutenção da temperatura dos ratos em normotermia foram utilizadas bolsas térmicas. O acompanhamento da temperatura foi feito pelo monitor mas para análise estatística foram consideradas apenas as temperaturas nos momentos M1 e M2, embora fossem anotadas durante o experimento (Anexos, Tabela 15). A análise dos resultados dos dados colhidos da temperatura se situaram muito próximos, sem significância estatística ( $p > 0,05$ ) entre os grupos e entre os momentos (Tabela 4), permanecendo dentro da média da temperatura desejada.

Os animais foram pesados imediatamente antes de iniciar o experimento. Os de maior peso foram os do G2, com diferença significativa dos pesos dos animais do G1 e do G3 ( $p < 0,0064$ , Tabela 5). A escolha dos animais de cada grupo ocorreu de maneira aleatória.

A análise da PAM demonstra que nos 3 grupos não houve diferenças estatísticas de valores em M1. Em M2 do G3 ocorreu o maior valor, com diferença estatística para os valores dos grupos G1 e G2 (Tabela 6).

## 5.2 ALTERAÇÕES DA CREATININA PLASMÁTICA - CrP

A tabela 7 e a figura 9 mostram que em M1, momento da administração do CAPE, não houve diferenças entre os valores da Creatinina Plasmática (CrP) entre os grupos. Os valores da CrP foram maiores com significância estatística nos momentos M2 ( $p < 0,0012$ ) e M3 ( $p < 0,0014$ ) do G2 em relação ao G1 e G3. Os valores maiores da CrP em M2 e M3 foram encontrados exatamente após a administração do CAPE no G2.

Existe uma relação direta, linear, entre o tempo de isquemia e os níveis de creatinina plasmática e o grau de lesão. Vinte e cinco minutos de isquemia arterial dobram os valores basais e quarenta e cinco minutos acarretam um aumento de sete a oito vezes nos níveis plasmáticos de creatinina, com um grau de necrose significativa ( $> 75\%$ ) em relação aos valores basais (Park et al., 2008). Seria então esperado que a CrP estivesse aumentada em animais submetidos à I/R renal, mas existe aqui uma constatação que necessita ser abordada: por que nos grupos controle (G1) e diluente (G3) os valores da CrP foram menores e no grupo CAPE (G2), onde foi administrado um potente antioxidante, que deveria proteger funcionalmente o rim, estes valores estão significativamente maiores em M2 e M3.

As informações colhidas na literatura nos relatam que no grupo CAPE os valores da creatinina deveriam estar em valores iguais ou menores do que nos demais grupos. Estudos experimentais avaliaram a atuação do CAPE como protetor renal, impedindo a elevação da creatinina na presença de substâncias tóxicas renais como o lítio (Oktem et al., 2005), a cisplatina (Özen et al., 2004) ou o contraste radiológico (Colbay et al., 2010).

A variação da temperatura pode acarretar alterações dos valores da creatinina durante o período de isquemia no rim esquerdo do rato, após a nefrectomia direita. Delbridge et al., 2007, demonstraram que a hipertermia resulta em grave lesão e insuficiência renal, enquanto a hipotermia relativa reduziu a lesão renal. A normotermia determinou a elevação transitória da creatinina. No presente estudo da I/R com o CAPE, a temperatura em °C dos diversos grupos ficou entre  $36,6 \pm 1,4$  e  $37,5 \pm 1,5$  e não apresentou valores significantivamente diferentes entre os três grupos, conforme tabela 4, o que evidencia a não interferência da temperatura sobre os valores encontrados da creatinina.

### 5.3 ALTERAÇÕES DA HISTOLOGIA RENAL

Todos os valores encontrados nas lesões renais pericapsulares ou medulares do G2 (grupo CAPE) foram superiores aos valores encontrados nas lesões renais do G1 (grupo controle) e do G3 (grupo diluente), conforme apresenta a tabela 8 e as figuras 10, 11, 12 e 13. O grupo controle é aquele que determina os valores basais dos parâmetros histopatológicos, enquanto o grupo sham é um controle adicional (Atik et al., 2006). O grupo diluente (G3) neste estudo foi o que teve menor alteração histopatológica, porém sem diferença estatística com o grupo controle (G1). Nos três parâmetros analisados pela tabela 8, todos eles, número (n), porcentagem (%) ou pelo grau de Park, os valores do grupo G2 são estatisticamente maiores do que os valores do G1 e do G3 ( $p < 0,001$ ). Estes dados nos permitem inferir que os valores de G2 estão significativamente superiores não apenas aos valores basais do G1, grupo controle (Atik et al., 2006), mas também aos do G3.

O padrão histológico de necrose tubular das áreas pericapsular e medular, encontrado nos animais estudados, assemelha-se, em muitos aspectos, ao descrito em relato sobre lesões de isquemia e reperfusão por Park et al., 2008 (alterações nucleares como picnose, cariólise e cariorrexis, além da perda do arcabouço celular). No presente estudo as alterações variaram desde o grau 1 ao grau 3 no G1, do grau 1 ao grau 3 no G2 e do grau 0 ao grau 2 no G3, com alterações significantes do G2 em relação aos G1 e G3, com  $p < 0,001$  (Tabela 8). O grupo que mais alterações histológicas apresentou foi o G2 (figuras 10, 11, 12 e 13), guardando simultaneidade destas alterações com o resultado do G2 da creatinina, onde, após receber em M1 a administração do CAPE, apresentou valores maiores em M2 e M3, superando os valores do G1 e do G3 nos mesmos momentos. Houve, pois, uma concomitante alteração dos valores da creatinina e do quadro histopatológico exatamente no G2, o que nos trouxe uma situação nova, diferente, pois a literatura relata proteção do tecido renal pelo CAPE (Oktem et al., 2005; Ozer et al., 2005; Ozguner et al., 2005; Uz et al., 2005; Parlakpinar et al., 2006), proteção do tecido renal pelo CAPE nos casos de I/R renal (Gurel et al., 2004; Özyurt et al., 2001; Irmak et al., 2001) ou proteção pelo CAPE nos casos de I/R em outros tecidos não renais (Huang et al., 2005; Yildiz et al., 2009; Ozyurt et al., 2007; Khan et al., 2007; Aydogan et al., 2007; Tamer et al., 2004; Ozer et al., 2004; Çalikoglu et al., 2003; Koltuksuz et al., 1999; Atik et al., 2006; Ozyurt et al., 2006; Tekin et al., 2008).

Levantamos aqui uma questão mais ampla: por que exatamente no grupo que recebeu a droga antioxidante protetora CAPE ocorreu alterações funcionais (aumento da CrP) e anatômicas (maiores presenças de necrose tubular) do que nos outros dois grupos que não receberam o CAPE?

#### 5.4 AÇÕES DO CAPE, DO ROS E DO ISOFLURANO

O CAPE é um antioxidante varredor do ROS (Irmak et al., 2003; Ozyurt et al., 2001) e, conforme a literatura, oferece proteção renal. Portanto, o grupo G2, deveria apresentar menores alterações anatômicas (histológicas) e menores valores das alterações funcionais (creatinina plasmática), o que não ocorreu neste estudo. O resultado esperado foi díspar, necessitando se estabelecer as possíveis hipóteses pela ocorrência de tais resultados. As hipóteses a serem estabelecidas podem ser analisadas sob a ótica de que neste estudo do PCI com o uso do CAPE houve anestesia com o isoflurano, fato até hoje não relatado. Estudos demonstram que o esperado pré-condicionamento anestésico (PCA) pelo isoflurano pode ser inibido nas células por:

##### 1 - Varredores do ROS:

- 1) N-2-mercaptopropionil glicina (MPG) e Mn (III)tetrakis 4-ácido benzoico (MnTBAP): Müllenheim et al., 2002;
- 2) N-2-mercaptopropionil glicina (MPG): Tsutsumi et al., 2007;
- 3) N-acetilcisteína (NAC) e MPG: Tanaka et al., 2002;
- 4) NAC: Colbay et al., 2010;
- 5) Dimetiltioureia (DMTU): Sang et al., 2006.

##### 2 - Bloqueadores do $K_{ATP}$ :

- 1) ácido 5 hidroxidecanóico: 5-HD: Tanaka et al., 2003;
- 2) glibenclamida: Cope et al., Kersten et al., Cason et al., 1997;
- 3) glibenclamida: del Valle et al., 2002.

Cabe-nos abordar a tese de que o CAPE, sendo um potente antioxidante na concentração de  $10 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ , também bloqueia completamente a produção de ROS em

neutrófilos humanos e o sistema xantino/xantino oxidase (Sud'ina et al., 1993), pois é um varredor de ROS. É importante lembrar que esta afirmação se refere ao ser humano e que este atual estudo foi realizado em ratos.

Pasqualin & Auler Jr, 2008, relatam que ROS desempenha um papel importante no PCA, afirmando que varredores de radicais livres administrados durante o tratamento prévio com isoflurano aboliram os efeitos protetores contra a lesão de I/R. Esta afirmação feita, por sua vez, encontra respaldo no trabalho de Müllenheim et al., 2002, que estudaram coelhos anestesiados com  $\alpha$ -cloralose, submetidos a 30 minutos de oclusão da coronária, seguido de 2 horas de reperfusão. Dois grupos receberam isoflurano e também varredores de radicais livres como MPG ( $1 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) e MnTBAP ( $100 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ). Dois outros grupos receberam isoflurano sem os varredores. A área de infarto foi reduzida de  $49 \pm 17\%$  no grupo de isoflurano sem varredores, em relação ao grupo controle. Os grupos que receberam isoflurano e varredores tiveram o efeito do pré-condicionamento abolido (isoflurano mais MPG:  $50 \pm 24\%$ ,  $p=0,02$ ; isoflurano mais MnTBAP:  $55 \pm 10\%$ ,  $p=0,001$ ). Este estudo concluiu que o pré-condicionamento com isoflurano depende da liberação de radicais livres. O CAPE, assim como o MPG, é um varredor de ROS, produtor de radicais livres, o que provavelmente ocorreu neste presente estudo, onde o isoflurano não apresentou seu PCA devido a não existência do ROS, que foi varrido. A contra prova existe no atual estudo do CAPE: nos grupos em (G1 e G3), nos quais não foram administrados o CAPE, não ocorreram as alterações, embora todos os 3 grupos tivessem recebido o isoflurano. A inferência nos leva à tese de que onde houve o CAPE não houve o ROS, nem os subsequentes radicais livres e nem a proteção renal, quando os animais receberam isoflurano. Daí a presença de maiores lesões no grupo CAPE, pois o isoflurano para promover pré-condicionamento necessita da liberação de ROS, que agride os tecidos pela presença dos radicais livres. A ausência de radicais livres não proporciona o pré-condicionamento pelo isoflurano.

Interessante estudo de proteção miocárdica do camundongo contra lesão da I/R *in vivo* realizado por Tsusumi et al., 2007, mostrou que MPG, um varredor de ROS, abole PosC induzido por 3 diferentes estímulos: repetidas I/R, isoflurano e SNC-121, um  $\delta$  receptor opióide agonista. Os efeitos PosC do isoflurano e SNC-121 foram recapitulados no modelo *in vitro* da lesão celular e novamente MPG foi mostrada

bloqueando esta proteção. Estes resultados sugerem ROS como um importante gatilho sinalizador envolvido no PosC em todo animal em que provavelmente ocorre ao nível do miócito cardíaco. MPG, varredor de ROS à semelhança do CAPE, nos permite acreditar que no presente estudo houve o bloqueio do ROS pelo CAPE, o que impediu a ação protetora do isoflurano.

Tanaka et al., 2002, estudaram coelhos anestesiados com pentobarbital, submetidos a 30 minutos de oclusão coronariana, seguidos de 3 horas de reperfusão. Os grupos foram randomizados e distribuídos recebendo NaCl 0,9% ou varredores de radicais livres NAC ( $150 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) ou MPG ( $1 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ), na presença ou ausência de isoflurano em 1,0 concentração alveolar mínima (CAM). O isoflurano foi administrado por 30 minutos e descontinuado 15 minutos antes da oclusão da coronária. Um *probe* fluorescente para produção de ânion superóxido (2 mg de dihidroetídio) foi administrado na ausência do anestésico volátil ou 5 minutos antes da exposição ao isoflurano em 2 grupos adicionais. Foram avaliadas a área de infarto e a produção de ânion superóxido. O grupo isoflurano teve área de infarto diminuída em  $24 \pm 4\%$ , comparado com grupo controle ( $43 \pm 3\%$ ). Os grupos NAC ( $43 \pm 3\%$ ) e MPG ( $42 \pm 5\%$ ) tiveram seus efeitos benéficos abolidos, mas não tiveram efeito na área do infarto ( $47 \pm 3\%$  e  $46 \pm 3\%$ , respectivamente). Isoflurano aumentou a produção de superóxido, comparado com grupo controle ( $p < 0,05$ ). Os resultados indicam que a produção de ROS após a administração de isoflurano contribui para proteger o miocárdio contra o infarto *in vivo*. Este resultado mais uma vez reforça que o CAPE, bloqueando ROS, promoveu o aumento da CrP e aumento das lesões tubulares.

A nefropatia por contraste tem incidência de 3-5% em pessoas sem fatores de risco. Esta porcentagem sobe para 100% em portadores de risco como no diabetes, disfunções renais, cardiopatia congestiva e idosos (Briguori et al., 2003; Rich & Crecelius, 1990). É a causa mais comum de LRA em pacientes hospitalizados (Nash et al., 2002; Lameire et al., 2005; Singri et al., 2003). Fatores como desidratação, nefrectomia unilateral (Heyman et al., 1988) e aplicação anterior de indometacina (Heyman et al., 1994) ou L-nitro arginina metil éster (Conesa et al., 2001) podem ser usados para induzir nefropatia por contraste. Após injeção intravenosa, o contraste diatrizoato é imediatamente diluído no plasma circulante. O equilíbrio é alcançado em 10 minutos com o compartimento intracelular e é excretado sem alterações pela filtração

glomerular renal. Cuidados clínicos devem ser tomados, como hidratação prévia e uso da N-acetilcisteína (NAC) antes do procedimento radiológico para evitar a nefropatia (Tepel et al., 2000). NAC possui propriedades antioxidantes como varredor do ROS e também por facilitar a biossíntese da glutathione (Asif & Epstein, 2004). O CAPE, antioxidante e varredor de radicais livres, protege os rins contra as toxicidades causadas pela gentamicina, tetracloreto de carbono, cisplatina e carbonato de lítio (Ogeturk et al., 2005; Ozen et al., 2004; Parlakpinar et al., 2005; Oktem et al., 2005).

Colbay et al., 2010, estudaram os efeitos protetores renais do CAPE e da NAC na nefropatia induzida pelo contraste diatrizoato. Quarenta e dois ratos adultos foram divididos em seis grupos experimentais: 1°) controle; 2°) contraste diatrizoato intravenoso (CIV) 7 mL.kg<sup>-1</sup>; 3°) CAPE (injeção intraperitoneal de 50 µmol.kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>); 4°) NAC (injeção intraperitoneal de 10 mg.kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>); 5°) CIV (pretratado com CAPE intraperitoneal); 6°) CIV pretratado com NAC intraperitoneal. CAPE e NAC foram administrados diariamente. Todos os ratos foram privados de água até o terceiro dia, quando o CIV foi administrado aos grupos CIV, CAPE+CIV, NAC+CIV. Os ratos foram sacrificados no quinto dia. Os valores de oxidantes e antioxidantes foram avaliados. Foram avaliadas as lesões histológicas (anatômicas) e funcionais (dosagem de CrP). As lesões histológicas renais foram maiores no grupo CIV, enquanto os grupos CAPE+CIV e NAC+CIV apresentaram mais lesões do que os grupos controle e CAPE e NAC. Os níveis de CrP dos grupos CAPE+CIV e NAC+CIV foram maiores do que no grupo controle, mas foram significativamente menores do que no grupo CIV. Os valores da CrP do grupo NAC+CIV foram significativamente maiores do que os do grupo CAPE+CIV. Os níveis de MDA foram significativamente menores nos grupos CAPE+CIV e NAC+CIV do que no grupo CIV. O CAPE protegeu a estrutura e a função renais tão bem quanto o NAC contra as lesões causadas pelo CIV através de seus varredores de radicais livres e efeitos anti-inflamatórios. Neste estudo, a diminuição da atividade das enzimas antioxidantes sugere que foram consumidas devido ao aumento do estresse oxidativo. O aumento da atividade enzimática antioxidante pode ser a resposta para a lesão renal após a aplicação do contraste e efetivamente diminuiu os peróxidos. Ratos que receberam CAPE antes de contraste têm aumento das atividades de GSH-Px e CAT nos tecidos renais. Catalase peroxisomal ou GSH-Px varrem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido pela SOD, uma enzima antioxidante específico, que protege células contra

efeitos tóxicos dos radicais superóxidos (Fadillioğlu et al., 2003; Yılmaz et al., 2004). CAPE e NAC mostraram proteger o rim contra lesão da I/R pela diminuição da peroxidação lipídica (Sud'ina et al., 1993; Voghel et al., 2008). Diminuição da lesão oxidativa após a aplicação de CAPE ou NAC tem sido associada com seus varredores de radicais livres e efeitos anti- inflamatórios. LRA induzida por contrastes foi reduzida com CAPE e NAC no presente estudo. O CAPE pode ser útil para prevenir lesões do tecido renal produzidas por contrastes, principalmente em pacientes de alto risco.

Sang et al., 2006, sugeriram que isoflurano produz pré-condicionamento atrasado na lesão isquêmica da medula espinhal pela liberação de radicais livres no coelho. O experimento foi randomizado e constou de 7 grupos: controle, submetido à isquemia medular sem pré-tratamento; grupos isoflurano-24 horas, isoflurano-48 horas e isoflurano-72 horas, que receberam por 40 minutos de 1,0 CAM de isoflurano a 100% de oxigênio por dia durante 5 dias consecutivos, com o último tratamento 24, 48 e 72 horas, respectivamente, antes da isquemia da medula; três outros grupos que receberam somente oxigênio a 100% por 24, 48 e 72 horas por 5 dias consecutivos, com o último pré-tratamento 24, 48 e 72 horas antes da isquemia da medula. Os animais do grupo isoflurano e do grupo oxigênio receberam 3 mL.kg<sup>-1</sup> de salina intraperitoneal 1 hora antes de cada sessão. Em todos os grupos foi administrado a dimetilureia (DMTU) a 10%, um potente varredor de radicais livres, dissolvido na salina (3 mL.kg<sup>-1</sup>) intraperitoneal. 24 horas após o último pré-tratamento, os animais foram submetidos à isquemia da medula, pela oclusão da aorta infrarrenal por 20 minutos. 48 horas após a reperfusão, a função neurológica e a histopatologia foram realizadas. Os resultados neurológicos e histopatológicos dos grupos iso24h e iso48h foram melhores do que os do grupo controle ( $p < 0,005$ ); os resultados do grupo controle não apresentaram diferenças com os grupos O<sub>2</sub>24h, O<sub>2</sub>48h, O<sub>2</sub>72h e iso 72h ( $p > 0,05$ ). Os resultados no grupo isoflurano foram melhores do que DMTU+iso, O<sub>2</sub>, e DMTU+O<sub>2</sub> ( $p < 0,01$ ); não houve diferença entre os resultados DMTU+iso, O<sub>2</sub>, e DMTU+O<sub>2</sub> ( $p > 0,05$ ). A inferência: isoflurano produz atraso no pré-condicionamento contra a lesão isquêmica da medula e os efeitos benéficos podem ser dependentes da liberação de radicais livres. Estes dados nos permitem acreditar que o CAPE, varredor de ROS como o DMTU, impediu que o isoflurano pudesse promover efeitos benéficos sobre o estado funcional e anatômico renal.

Tanaka et al., 2003, testaram a hipótese da abertura mitocondrial dos  $K_{ATP}$  ser o gatilho do PCA do isoflurano ocorrer pela produção de ROS *in vivo*. Coelhos foram anestesiados com pentobarbital e foram submetidos a 30 minutos de oclusão coronariana seguidos de 3 horas de reperfusão. Os coelhos estavam randomizadamente distribuídos para receber solução salina (NaCl a 0,9%) ou apenas o bloqueador seletivo do canal mitocondrial  $K_{ATP}$ , ácido 5-hidroxicarboxílico (5-HD) 10 minutos antes ou imediatamente após 30 minutos de exposição à concentração alveolar mínima (CAM) do isoflurano. Isoflurano diminuiu a área do infarto em  $19 \pm 3\%$  ( $p < 0,05$ ) no ventrículo esquerdo, enquanto o grupo controle diminuiu  $38 \pm 4\%$ . 5-HD administrado antes, mas não após o isoflurano, aboliu este efeito benéfico ( $37 \pm 4\%$ ) comparado a  $24 \pm 3\%$ . O resultado indica que 5-HD administrado 10 minutos antes da exposição ao isoflurano bloqueia a proteção miocárdica, mas 5-HD administrado após a exposição ao isoflurano não afeta a área do infarto. Os dados sugerem que a abertura do canal mitocondrial  $K_{ATP}$  age como um gatilho no pré-condicionamento induzido pelo isoflurano em coelhos. A conclusão: a proteção miocárdica induzida pelo isoflurano requer a ativação do canal mitocondrial  $K_{ATP}$  e produção de ROS. Não havendo a produção do ROS, o isoflurano não apresentou condições para promover o pré-condicionamento. Este estudo reforça a tese da necessidade da existência do ROS para o isoflurano produzir o PCA.

Em 1997, Cope et al., Kersten et al. e Cason et al., demonstraram que exposições efêmeras do coração animal a anestésicos voláteis potentes conduziam a estado de parcial proteção dos efeitos de isquemia e reperfusão. Esta proteção foi caracterizada pela fase de memória (ficou intacta após a descontinuação do anestésico) e foi inibida pela glibenclamida canal  $K_{ATP}$  inibidor. Estas características e a grandeza da proteção obtida, sugeriu como PCI o termo pré-condicionamento anestésico (PCA) adotado. Este estudo nos leva à idêntica conclusão do estudo de Tanaka et al., 2003.

Conhecimentos do mecanismo do PCA e sua semelhança com o PCI são importantes na compreensão como células e órgãos saudáveis reagem ao estresse isquêmico. Isto também é importante para conhecer se PCA ocorre em modelos animais mais idosos ou com doenças cardíacas e humanos idosos com doença cardíaca. Não está claro se PCI pode ser sucessivamente induzido no modelo animal idoso e estudos do PCI no modelo cardíaco de doença (diabetes) são poucos (del Valle et al., 2002). PCI

pode ser induzido em pacientes. Todavia, PCI parece não ocorrer em pacientes diabético ou de idade avançada, em pacientes tomando glibenclamida sulfonilureia (bloqueador de canal  $K_{ATP}$ ), e com o concomitante uso de soluções cardioplégicas durante by-pass cirúrgico. Todavia, poucos estudos indicam ser o PCI mantido em pacientes idosos.

Durak et al., 1999, relataram que isoflurano prejudica o sistema de defesa antioxidante no rim da cobaia. Neste trabalho, isoflurano foi selecionado para investigação em 3 grupos de 5 cobaias: 1º) isoflurano a 2,0% por 30 minutos por dia por 3 dias consecutivos; 2º) recebeu apenas oxigênio puro nas mesmas condições; 3º) grupo controle. No fim do experimento, 2 horas após o último tratamento com isoflurano, os animais foram sacrificados e seus rins removidos. MDA, resistência oxidativa (OR) e GSH-Px estiveram aumentadas no grupo isoflurano, comparado com o grupo controle, o que prejudicou a defesa antioxidante dos tecidos renais. Não houve diferença entre grupo controle e grupo oxigênio. Não houve diferença entre uréia e creatinina séricas entre grupos, o que indica ausência de prejuízo da função renal. Exame histopatológico revelou congestão glomerular, hiper celularidade glomerular, necrose das células tubulares proximais e resíduos celulares na luz dos tubos distais no grupo isoflurano. Não houve alterações no grupo controle e no grupo oxigênio houve congestão glomerular mínima e perda do citoplasma em algumas células do tubo proximal. Os resultados demonstram que o tratamento com isoflurano prejudicou os sistemas de defesa antioxidante enzimático e não enzimático nos tecidos renais. Isoflurano e ou um dos seus metabólitos podem fazer parte da inibição dos enzimas SOD e CAT. Aumento da resistência oxidativa também supõe a hipótese que isoflurano causa pré-oxidação nas estruturas celulares. Parece que isoflurano resulta em considerável perda do sistema de defesa antioxidante e acarreta estresse oxidante no tecido renal, cujo aumento dos níveis do MDA no tecido afetado. Por causa da reduzida capacidade de defesa antioxidante, células tubulares foram expostas aos radicais livres através das reações mediadas pela peroxidação. Os resultados histopatológicos revelam consideráveis desarranjos como congestão glomerular, necrose das células tubulares proximais e resíduos celulares na luz dos túbulos distais dos tecidos afetados. Embora houvesse lesões histológicas, não houve insuficiência funcional (uréia e creatinina). As alterações tubulares renais relatadas por Durak et al., 1999, se assemelham àquelas ocorridas com a utilização do CAPE e do isoflurano, neste trabalho. Algumas

investigações sugerem que nefrotoxicidade por compostos fluoretos surgem de fluoretos voláteis de fluoretos inorgânicos (Mazze et al., 1972), os quais podem inibir sistemas enzimáticos (Ellenhorn et al., 1988).

Existem controvérsias a respeito do benefício dos varredores do ROS durante a lesão I/R. ROS contribui para a disfunção miocárdica pós-isquêmica (Bolli et al., 1989). MPG, varredor do ROS, administrado antes da reperfusão, atenua a disfunção miocárdica pós-isquêmica (Bolli et al., 1989; Myers et al., 1986). Inversamente, ROS pode ser gatilho da proteção cardíaca induzida pela isquemia (Pain et al., 2000) e preconditionante farmacológico (Cohen et al., 2001). Outro estudo com MPG antes do estímulo preconditionante isquêmico no coração de coelhos atenua a proteção contra a lesão da I/R (Baines et al., 1997). Estes estudos sugerem um importante papel provisório do ROS no pré-condicionamento e na lesão I/R. Neste presente estudo da proteção renal, o CAPE foi administrado antes do clampeamento da artéria renal esquerda (insulto isquêmico). Para haver o preconditionamento do isoflurano há necessidade de existir a liberação do ROS, e o CAPE, varredor do ROS, como a NAC e MPG, pode inibir o estresse oxidativo do isoflurano.

Produção de ROS tem sido observada desde os primeiros minutos da reperfusão e é proposta como um mecanismo maior da lesão por reperfusão (Becker, 2004). Estímulos protetores cardíacos como PCI, anestésicos inalatórios e opióides têm induzido um sinal intenso do ROS que protege da subsequente lesão (Cohen et al., 2001; Pain et al., 2000; Tanaka et al., 2002). PosC atenua a geração deletéria do ROS e este pode ser um importante componente da proteção cardíaca permitida pelo PosC nos modelos *in vivo* (Kin et al., 2004) e *in vitro* (Sun et al., 2005). Penna et al., 2006, mostraram que varredores do ROS bloqueiam a redução do tamanho do infarto do PosC em corações de ratos *ex vivo* sugerindo que ROS seja o gatilho do PosC; porém, os modelos *ex vivo* apresentam certa limitação na importância. Todavia, no presente estudo, utilizando camundongo em modelo *in vivo* ou PosC, foi investigado se ROS está envolvido em importante cascata comandante do PosC isquêmico e farmacológico e determinou que este mecanismo foi responsável pelo PosC em miócitos cardíacos ventriculares.

O papel do ROS no PosC não está claro. Recentes publicações mostram que PosC atenua a produção de ROS imediatamente na reperfusão *in vivo* no coração do

rato (Kin et al., 2004). O mesmo grupo demonstrou que PosC hipóxico *in vitro* resultou na diminuição de células mortas, diminuição da produção de ROS e na diminuição da carga mitocondrial de cálcio (Sun et al., 2005). Os autores sugerem que redução de ROS representa um importante componente da proteção cardíaca fornecida pelo PosC. Todavia, Penna et al., 2006, demonstraram que varredores do ROS atenuam PosC no coração isolado do rato perfundido com solução de Langendorff. Os resultados de Tsutsumi et al., 2007, confirmam os achados de Penna et al., 2006, sugerindo ROS como gatilho no PosC no camundongo *in vivo* no modelo de lesão de I/R utilizando três diferentes estímulos de PosC, mostrando que a geração de ROS pelo estímulo protetor nos miócitos cardíacos pode estar envolvida no mecanismo do PosC. A identificação das variedades específicas do ROS envolvido e a localização do lugar da produção do ROS, assim como o mecanismo para a indução do sinal da transdução protetora, necessitam ser elucidados em futuros estudos.

Stowe et al., 2004, estudaram pré-condicionamento cardíaco por anestésicos halogenados. Agentes anestésicos voláteis como halotano, isoflurano e sevoflurano são as drogas mais comumente usadas para manter o padrão da anestesia geral. Há muito tempo são conhecidos para prover proteção contra o efeito da isquemia e reperfusão cardíaca. Vários mecanismos são atribuídos a esta proteção cardíaca, incluindo dilatação coronariana, redução da contratilidade com correspondente diminuição da demanda metabólica e o efeito da diminuição da entrada do  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais L-tipo  $\text{Ca}^{2+}$ .

Recentemente, a fase de memória da cardioproteção tem sido observada por estes agentes, com inibição pelo KATP. Estas sequências sugerem um caminho em que partes dos componentes utilizados no PCI, a despeito das diferenças marcantes entre estes dois estímulos e o termo PCA, tem sido adotado. Varredores do ROS praticam PCA, sugerindo um efeito dos agentes anestésicos para causar a formação de ROS. Tais efeitos têm sido recentemente diretamente demonstrados. O mecanismo pelo qual estas drogas induzem à formação de ROS não está clara. Todavia, a inibição direta do transporte de elétrons mitocondrial do sistema enzimático e as alterações bioenergéticas mitocondriais nos corações pré-condicionados pelos anestésicos voláteis, fortemente, implica a mitocôndria como alvo para estes efeitos. Além disso, diminuição da formação de ROS durante a I/R em corações pré-condicionados pelos anestésicos voláteis podem assinalar a melhora da estrutura e da função pós-isquêmica.

Vários aspectos do PCA parecem ser os mesmos do PCI, sugerindo que, pelo menos em parte, a sinalização da sequência é comum para estes altamente diferentes estímulos. ROS é pré-requisito para PCI e também parece ser como PCA, mas nem as espécies reativas específicas nem o papel de jogar como indutor do pré-condicionamento é conhecido. O mecanismo pelo qual os anestésicos induzem a formação de ROS é também desconhecido, como a precisão dos caminhos das células sinalizadoras que produzem o estado de proteção cardíaca. Todavia, o relatado efeito da exposição ao anestésico para inibir a respiração mitocondrial fortemente implica os ETS (eletronic transport system) como fontes da geração de ROS que inicia PCA, exatamente como K<sub>ATP</sub> podem ser mediador e efector do PCA.

Estudo recente mostra que outro anestésico halogenado (sevoflurano) condiciona proteção de tecido nervoso através do ROS (Yang et al., 2011).

Existem, conforme o exposto, argumentações com embasamento em estudos experimentais, que o isoflurano necessita da presença do ROS para promover o PCA (Müllenheim et al., 2002; Pasqualin & Auler Jr, 2008; Tsusumi et al., 2007; Tanaka et al., 2002; Sang et al., 2006; Tanaka et al., 2003; Cope et al., Kersten et al. e Cason et al., 1997, Durak et al., 1999). Por outro lado, o CAPE, através de sua ação antioxidante, se manifesta como um varredor do ROS (Sud'ina et al., 1993, Irmak et al., 2003; Ozyurt et al., 2001). Neste estudo, houve a administração prévia de isoflurano, seguida da administração intraperitoneal do CAPE. Isoflurano administrado isoladamente protege o rim (Hashiguchi et al., 2005). O CAPE administrado sem I/R renal e sem o isoflurano protege o rim (Özen et al., 2004, Oktem et al., 2005, Colbay et al., 2010, Oktem et al., 2005; Ozer et al., 2005; Ozguner et al., 2005; Uz et al., 2005; Parlakpinar et al., 2006). Em experimentos com I/R renal sem isoflurano o CAPE também protege o rim (Gurel et al., 2004; Özyurt et al., 2001; Irmak et al., 2001). A associação isoflurano/CAPE, como ocorreu neste experimento, promoveu efeitos lesivos ao tecido renal.

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---

O CAPE e o isoflurano são protetores da função renal. Porém, o CAPE, impedindo a presença de oxidantes, impediu a presença do ROS. Sem ROS, não houve a ação pré-condicionante do isoflurano, o que promoveu importantes lesões renais. Não há estudos relatados de I/R renal em que houvesse a associação de anestesia pelo isoflurano e administração do CAPE.

## **7 CONCLUSÕES**

---

Observando-se os resultados encontrados verifica-se que o modelo experimental apresentado produziu:

- 1) alterações funcionais (aumento da creatinina) no grupo CAPE;
- 2) alterações histológicas (maior presença de necrose tubular aguda) no grupo CAPE.

## **8 REFERÊNCIAS**

---

- Abernethy VE, Lieberthal W. Acute renal failure in the critically ill patient. *Crit Care Clin.* 2002;18:203-22.
- Aitchison KA, Baxter GF, Awan MM, Smith RM, Yellon DM, Opie LH. Opposing effects on infarction of delta and kappa opioid receptor activation in the isolated rat heart: implications for ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol.* 2000;95:1-10.
- Akyol A, Ulusoy H, Imamoğlu M, Çay A, Yuluğ E, Alver A, et al. Does propofol or caffeic acid phenethyl ester prevent lung injury after hindlimb ischaemia-reperfusion in ventilated rats? *Injury.* 2006;37:380-7.
- Andrade-Silva AR, Ramalho FS, Ramalho LNZ, Saavedra-Lopes M, Jordão AA, Vanuchi H, et al. Effect of FN $\kappa$ B inhibition by CAPE on skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res.* 2009;254-62.
- Ames A III, Wright RL, Kowada M, Thurston M, Majno G. Cerebral ischemia, II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol.* 1968;52:437-53.
- Appell HJ, Glöser S, Soares JMC, Duarte JA. Structural alterations of skeletal muscle induced by ischemia and reperfusion. *Basic Appl Myol.* 1999;263-8.
- Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation.* 2005;111:194-7.
- Asif A, Epstein M. Prevention of radiocontrast-induced nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 2004;44:12-24.
- Atik E, Görür S, Kiper AN. The effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on histopathological changes in testicular ischemia-reperfusion injury. *Pharmacol Res.* 2006;54:293-7.
- Aust SD, Thomas CE, Morehouse LA, Saito M, Bucher JR. Active oxygen and toxicity. *Adv Exp Med Biol.* 1986;197:513-26.
- Aydogan H, Gurlek A, Parlakpınar H, Askar I, Bay-Karabulut A, Aydogan N, et al. Beneficial effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the ischemia-reperfusion injury in rat skin flaps. *Plast Reconstr Surg.* 2007;60:563-8.

Baines CP, Goto M, Downey JM. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29:207-16.

Barbosa V, Sievers RE, Zaugg CE, Wolfe CL. Preconditioning ischemia time determines the degree of glycogen depletion and infarct size reduction in rat hearts. *Am Heart J.* 1996;131:224-30.

Barnard ML, Snyder SJ, Engerson TD, Turrens JF. Antioxidant enzyme status of ischemic and postischemic liver and ischemic kidney in rats. *Free Radic Biol Med.* 1993;15:227-32.

Baud L, Ardaillou R. Involvement of reactive oxygen species in kidney damage. *Br Med Bull.* 1993;49:621-9.

Beaussier M, Mouren S, Souktani R, Arthaud M, Massias L, Vicaut E, et al. Role of nitric oxide and cyclooxygenase pathways in the coronary vascular effects of halothane, isoflurane and desflurane in red blood cell-perfused isolated rabbit hearts. *Br J Anaesth.* 2002;88:399-407.

Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiov Res.* 2004;61:461-70.

Bernaudin M, Tang Y, Reilly M, Petit E, Sharp FR. Brain genomic response following hypoxia and re-oxygenation in the neonatal rat: identification of genes that might contribute to hypoxia tolerance. *J Biol Chem.* 2002;277:728-38.

Billen BT, Kiling H, Alaybeyoglu N, Çelik M, Iraz M, Sezgin N. Effect of caffeic acid phenethyl ester on survival of axial pattern flaps in rats with ischemia-reperfusion injuries. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2006;40:73-8.

Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, DuBose CM, Lai EK, Roberts R, et al. Direct evidence that oxygen-derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:4695-9.

Borrelli F, Maffia P, Pinto L, Ianaro A, Russo A, Capasso F, et al. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia.* 2002;73:53-63.

- Bosco PJ, Schweizer RT. Use of oxygen radical scavengers on autografted pig kidneys after warm ischemia and 48-hour perfusion preservation. *Arch Surg.* 1988;123:601-4.
- Briguori C, Tavano D, Colombo A. Contrast agent-associated nephrotoxicity. *Prog Cardiovasc Dis.* 2003;45:493-503.
- Buljubasic N, Rusch NJ, Marijic J, Kampine JP, Bosn-jak ZJ. Effects of halothane and isoflurane on calcium and potassium channel currents in canine coronary arterial cells. *Anesthesiology.* 1982;76:990-8.
- 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.
- Bulkley GB. Free radical mediated reperfusion injury: a selective review. *Br J Cancer.* 1987;8(suppl):66-73.
- Buyukberber M, Savas MC, Bagci C, Koruk M, Gulsen MT, Tutar E, et al. Therapeutic effect of caffeic acid phenethyl ester on cerulein-induced acute pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 2009;15:5181-85.
- Çalikoglu M, Tamer L, Sucu N, Coskun B, Ercan B, Gul A, et al. The effects of caffeic acid phenethyl ester on tissue damage in lung after hindlimb ischemia-reperfusion. *Pharm Res.* 2003;48:397-403.
- Cason BA, Gamperl AK, Slocum RE, Hickey RF. Anesthetic-induced pre-conditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits. *Anesthesiology.* 1997;87:1182-90.
- Celik S, Gorur S, Aslantas O, Erdogan S, Ocak S, Hakverdi S. Caffeic acid phenethyl ester suppresses oxidative stress in *Escherichia coli*-induced pyelonephritis in rats. *Mol Cell Biochem.* 2007;297:131-8.
- Cheeseman K.H. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Mol Aspects Med.* 1993;14:191-7.

- Chiari PC, Bienengraeber MW, Pagel PS, Krolikowski JG, Kersten JR, Warltier DC. Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits. *Anesthesiology*. 2005;102:102-9.
- Cirasino L, Pisati A, Fasani F. Contact dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis*. 1987;16:110-1.
- Clanton TL, Zuo L, Klawitter P. Oxidants and skeletal muscle function: physiologic and pathophysiologic implications. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999;222:253-62.
- Cohen MV, Yang XM, Neumann T, Heusch G, Downey JM. Favorable remodeling enhances recovery of regional myocardial function in the weeks after infarction in ischemically preconditioned hearts. *Circulation*. 2000;102:579-83.
- Cohen MV, Yang XM, Liu GS, Heusch G, Downey JM. Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K (ATP) channels. *Circ Res*. 2001;89:273-8.
- Colbay M, Yuksel S, Uslan I, Acarturk G, Karaman O, Bas O. Novel approach for the prevention of contrast nephropathy. *Exp Tox Pathol*. 2010;62:81-9.
- Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Prevention of Ischemia-Reperfusion Injury. *Anesthesiology*. 2001; 94:1133-8.
- Conesa EL, Valero F, Nadal JC, Fenoy FJ, Lopez B, Arregui B, et al. N-acetyl-L-cysteine improves renal medullary hypoperfusion in acute renal failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;281:730-7.
- Cope DK, Impastato WK, Cohen MW, Downey JM. Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. *Anesthesiology*. 1997;86:699-709.
- Curi PR. *Metodologia e Análise da Pesquisa em Ciências Biológicas*. Botucatu: Ed.Tipomic; 1998. 220p.
- Delbridge MS, Shrestha BM, Raftery AT, El Nahas AM, Haylor JL. The effect of body temperature in a rat model of renal ischemic-reperfusion injury. *Transplant Proceed*. 2007;39:2983-5.

Del Valle HF, Lascano EC, Negroni JA. Ischemic preconditioning protection against stunning in conscious diabetic sheep: role of glucose, insulin, sarcolemmal and mitochondrial KATP channels. *Cardiovasc Res.* 2002;55:642-59.

Dobashi K, Ghosh B, Orak JK, Singh I, Singh AK. Kidney ischemia±reperfusion: modulation of antioxidant defenses. *Mol Cell Biochem.* 2000;205:1-11. Downey LM. Anti-preconditioning. *Basic Res Cardiol.* 2000;95-11.

Downey JM, Cohen MV. Why do we still not have cardioprotective drugs? *Circ J.* 2009;73:1171-7.

Durak I, Öztürk S, Dikmen B, Güven C, Çimen MYB, Büyükköçak S, et al. Isoflurane impairs antioxidant defence system in guinea pig kidney. *Can J Anesth.* 1999;46:797-802.

Ellenhorn MJ, Barceloux DG. *Medical Toxicology.* New York: Elsevier; 1988.

Ek RO, Serter M, Ergin K, Yildiz Y, Cecen S, Kavak T, et al. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on TNBS-induced colitis in ovariectomized rats. *Dig Dis Sci.* 2008;53:1609-17.

Eşrefoğlu M, Gül M, Parlakpınar H, Acet A. ;Effects of melatonin and caffeic acid phenethyl ester on testicular injury induced by myocardial ischemia/reperfusion in rats. *Fund Clin Pharmacol* 2005;19:365-72.

Esterbauer H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am J Clin Nutr.* 1993;57:779-85.

Fadillioglu E, Erdogan H, Iraz M, Yagmurca M. Effects of caffeic acid phenethyl ester against doxorubicin-induced neuronal oxidant injury. *Neurosci Res Commun.* 2003;33:132-38.

Fadillioglu E, Erdogan H, Sogut S, Kuku I. Protective effects of erdosteine against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *J Appl Toxicol.* 2003;23:71-4.

Feng J, Lucchinetti E, Ahuja P, Pasch T, Perriard JC, Zaugg M. Isoflurane postconditioning prevents opening of the mitochondrial permeability transition pore through inhibition of glycogen synthase kinase 3beta. *Anesthesiology.* 2005;103:987-95.

Feng J, Fischer G, Lucchinetti E, Zhu M, Bestmann L, Jegger D, et al. Infarct-remodeled myocardium is receptive to protection by isoflurane postconditioning: role of protein kinase B/Akt signaling. *Anesthesiology*. 2006; 104:1004-14.

Fesen MR, Pommier Y, Leteurtre E, Hiroguchi E, Yung J, Kohn KW. Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds. *Biochem Pharmacol*. 1994;48:595.

Fischer G, Hübner SO, Vargas GD, Vidor T. Imunomodulação pela própolis. *Arq Inst Biol*. 2008;75:247-53. Artigo de revisão.

Frenkel K, Wei H, Bhimani R, Ye J, Zadunaisky JA, Huang M, et al. Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester. *Cancer Res*. 1993;53:1255-61.

Fujii T, Takaoka M, Tsuruoka N, Kiso Y, Tanaka T, Matsumura Y. Dietary supplementation of L-carnosine prevents ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *Biol Pharm Bull*. 2005;28:361-3.

Gho BC, Shoemaker RG, Doel MA, Dunker DJ, Verdouw PD. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation*. 1996;94:2193-200.

Gianello P, Saliez A, Bufkens X, René P, Dominique M, Seiji H, et al. EUK-134, a synthetic superoxide dismutase and catalase mimetic, protects rat kidneys from ischemia± reperfusion-induced damage. *Transplantation*. 1996;62:1664-6.

Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischemia, but open upon reperfusion. *Biochem J*. 1995;307: 93-8.

Gross ER, Gross GJ. Ligand triggers of classical preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res*. 2006;70:212-21.

Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Oltz EM, Efros L, Caldwell M, et al. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia*. 1988;44:230-32.

Gurel A, Armutcu F, Sahin S, Sogut S, Ozyurtd H, Gulec M, et al. Protective role of I-tocopherol and caffeic acid phenethyl ester on ischemia ± reperfusion injury via nitric oxide and myeloperoxidase in rat kidneys. *Clin Chim Acta*. 2004;339:33-41.

- Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion – a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 2004;61:372-85.
- Halliwell B, Gutteridge JM: Iron and free radicals: two aspects of antioxidant protection. *Trends Biochem Sci.* 1986;11:372-5.
- Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE: Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med.* 1992;119:598-620.
- Hashiguchi H, Morooka H, Miyoshi H, Matsumoto M, Koji T, Sumikawa K. Isoflurane protects renal function against ischemia and reperfusion through inhibition of protein kinases, JNK and ERK. *Anesth Analg.* 2005;101:1584-9.
- Haukoos J, Korthuis R, Niemann J. Inflammatory and immunologic responses to ischemia and reperfusion. In: Paradis N, Halperin H, Kern K, Wenzel V, Douglas A, editors. *Cardiac Arrest - The Science and Practice of Resuscitation Medicine.* Cambridge: Cambridge University Press; 2007. p.163-76.
- Hepsen IF, Bayramlar H, Gultek A, Ozen S, Tilgen F, Evereklioglu C. Caffeic acid phenethyl ester to inhibit posterior capsule opacification in rabbits. *J Cataract Refract Surg.* 1997;23:1572-6.
- Hepsen IF, Er H, Cekic O. Topically applied water extract of propolis to suppress corneal neovascularization in rabbits. *Ophthalm Res.* 1999;31:426-31.
- Heyman SN, Brezis M, Reubinoff CA, Greenfeld Z, Lechene C, Epstein FH, et al. Acute renal failure with selective medullary injury in the rat. *J Clin Invest.* 1988;82:401-12.
- Heyman SN, Rosen S, Brezis M. Radiocontrast nephropathy: a paradigm for the synergism between toxic and hypoxic insults in the kidney. *Exp Nephrol.* 1994;2:153-7.
- Heyndrickx GR. Early reperfusion phenomena. *Sem Cardiothorac Vasc Anesth.* 2006;10:236-41.
- Hosnuter M, Gürel A, Pabuçcu O, Armutcu F, Kargi E, Isikdemir A. The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. *Burns.* 2004;30:121-5.

Huang SS, Liu SM, Lin SM, Liao PH, Lin RH, Chen YC, et al. Antiarrhythmic effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Clin Biochem.* 2005;38:943-7.

Ilhan A, Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, Ciralik H, Akyol O. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1999;16:458-63.

Irmak MK, Koltuksuz U, Kutlu NO, Yağmurca M, Ozyurt H, Karaman A, et al. The effect of caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury in comparison with alpha-tocopherol in rat kidneys. *Urol Res.* 2001;29:190-3.

Irmak MK, Fadilloğlu E, Sogut S, Erdoğan H, Gulec M, Ozer, et al. Effects of caffeic acid phenethyl ester and alphanatocopherol on reperfusion injury in rat brain. *Cell Biochem Funct.* 2003;21:283-9.

Islam CF, Mathie RT, Dinneen MD, Kiely EA, Peters AM, Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney: the effect of preconditioning. *Br J Urol.* 1997;79:842-7.

Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fisbein KW, et al. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest* 2004; 113: 1535-49.

Julier K, da Silva R, Garcia C, Bestmann L, Frascarolo P, Zollinger A, 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.

Karsten M. Propolis-current and future medical uses. *Am Bee J.* 2001;141:507-10.

Kajiwara I, Kawamura K, Hiratsuka Y, Takebayashi S. The influence of oxygen free radical scavengers on the reduction of membrane-bound Na(+) $\pm$  K(+)-ATPase activity induced by ischemia/reperfusion injury in the canine kidney. *Nephron.* 1996;72:637-43.

Kaur A, Garg UC, Sethi AK, Gorowara S, Sharma S, Ganguly NK: Effect of various oxygen free radical scavengers in preventing tissue injury caused by *Escherichia coli* in pyelonephritic mice. *Biochem Int.* 1988;16:1083-93.

Kersten JR, Schmeling TJ, Hettrick DA, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC. Mechanism of myocardial protection by isoflurane. Role of adenosine triphosphate-regulated potassium (KATP) channels. *Anesthesiology*. 1996; 85:794-807; discussion 27A.

Kersten JR, Schmeling TJ, Paget OS, Gross GJ, Warltier DC. Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute reperfusion phase. *Anesthesiology*. 1997;87:361-70.

Khan M, Elango C, Ansari MA, Singh I, Singh AK. Caffeic acid phenethyl ester reduces neurovascular inflammation and protects rat brain following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem*. 2007;102:365-77.

Khayyal MT, El-Ghasaly MA, El-Khatip AS. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. *Drugs Exp Clin*. 1993;19:197-203.

Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, Wang NP, Corvera JS, Halkos ME, et al. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res*. 2004;62:74-85.

Kloner RA, Speakman MT, Przyklenk K. Ischemic preconditioning: a plea for rationally targeted clinical trials. *Cardiovasc Res*. 2002;55:526-33.

Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, Aydin M, Karaman A, Gultek A, et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents intestinal reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg*. 1999;34:1458-62.

Koltuksuz U, Irmak MK, Karaman A, Uz E, Var A, Ozyurt H, et al. Testicular nitric oxide levels after unilateral testicular torsion-detorsion in rats pretreated with caffeic acid phenethyl ester. *Urol Res*. 2000;28:360-3.

Koti RS, Seifalian AM, Davidson BR. Protection of the liver by ischemic preconditioning: a review of mechanisms and clinical applications. *Dig Surg*. 2003;20:383-96.

Krolkowski JG, Bienengraeber M, Weihrauch D, Warltier DC, Kersten JR, Pagel PS. Inhibition of mitochondrial permeability transition enhances isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion: the role of mitochondrial KATP channels. *Anesth Analg*. 2005;101:1590-6.

- Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure. *Lancet*. 2005;365:417-30.
- Lee HT, Emala CW. Protective effects of renal ischemic preconditioning and adenosine pretreatment: role of A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> receptors. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000;278:380-7.
- Lin F. Stem cells in kidney regeneration following acute renal injury. *Pediatr Res*. 2006;59:74.
- Lorsomradee S, Cromheecke S, Lorsomradee S, De Hert SG. Cardioprotection with volatile anesthetics in cardiac surgery. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. 2008; 16:256-64.
- Mandarim-de-Lacerda CA. Manual de quantificação morfológica: morfometria, alometria e estereologia. Rio de Janeiro, CEBIO; 1991.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002;298:1912-34.
- Marx G, Chevion M. Site-specific modification of albumin by free radicals: reaction with copper (II) and ascorbate. *J Biochem*. 1986;236:397-400.
- Mazze RI, Cousins MJ, Kosek J. Dose-related methoxyflurane nephrotoxicity in rats: a biochemical and pathologic correlation. *Anesthesiology*. 1972;36:571-87.
- McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med*. 1985;312:159-63.
- Menezes H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arq Inst Biol*. 2005;72:405-11. Artigo de revisão.
- Michaluart P, Masferrer JL, Carothers AM, Subbaramaiah K, Zweifel BS, Koboldt C, et al. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. *Cancer Res*. 1999;59:2347-52.
- Molajavi A, Preckel B, Comfere T, Mullenheim J, Thamer V, Schlack W. Effects of ketamine and its isomers on ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Anesthesiology*. 2001; 94:623-9; discussion 5A-6A.

Monti M, Berti E, Carminati G, Cusini M. Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. *Contact Derm.* 1983;9:163.

Müllenheim J, Molojavyi A, Preckel B, Thamer V, Schlack W. Thiopentone does not block ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Can J Anaesth.* 2001a; 48:784-9.

Müllenheim J, Frassdorf J, Preckel B, Thamer V, Schlack W. Ketamine, but not S(+)-ketamine, blocks ischemic preconditioning in rabbit hearts in vivo. *Anesthesiology.* 2001b;94:630-6.

Müllenheim J, Ebel D, Frassdorf J, Fräßdorf J, Preckel B, Thämer V, et al. Isoflurane preconditions myocardium against infarction via release of free radicals. *Anesthesiology.* 2002;96:934-40.

Murphy PG, Myers DS, Davies MJ, Webster NR, Jones JG. The antioxidant potential of propofol (2,6-diisopropylphenol). *Br J Anaesth.* 1992; 68:613-8.

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;74:1124-36.

Myers ML, Bolli R, Lekich RF, Hartley CJ, Roberts R. N-2-mercaptopropionylglycine improves recovery of myocardial function after reversible regional ischemia. *J Am Coll Cardiol.* 1986;8:1161-8.

Nash K, Hafeez A, Hou S. Hospital-acquired renal insufficiency. *Am J Kidney Dis.* 2002;39:930-6.

Noelker C, Bacher M, Gocke P, Wei X, Klockgether T, Du Y, et al. The flavanoid caffeic acid phenethyl ester blocks 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Neurosci Lett.* 2005;383:39-43.

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.

Ogeturk M, Kus I, Colakoglu N, Zararsiz I, Ilhan N, Sarsilmaz M. Caffeic acid phenethyl ester protects kidneys against carbon tetrachloride toxicity in rats. *J Ethnopharmacol.* 2005;97:273-80.

Oktem F, Ozguner F, Sulak O, Olgar S, Akturk O, Yilmaz HR, et al. Lithium-induced renal toxicity in rats: protection by a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Mol Cell Biochem.* 2005;277:109-15.

Özen S, Akyol Ö, Iraz M, Sögüt S, Özugurlu F, Özyurt H, et al. Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Appl Toxicol.* 2004;24:27-35.

Ozer MK, Parlakpınar H, Acet A. Reduction of ischemia-reperfusion induced myocardial infarct size in rats by caffeic acid phenethyl ester (CAPE). *Clin Biochem.* 2004;37:702-5.

Ozer MK, Parlakpınar H, Vardi N, Cigremis Y, Ucar M, Acet A. Myocardial ischemia/reperfusion-induced oxidative renal damage in rats: protection by caffeic acid phenethyl ester (CAPE). *Shock.* 2005;24:97-100.

Ozguner F, Armagan A, Koyu A, Caliskan S, Koylu H. A novel antioxidant agent, caffeic acid phenethyl ester prevents shock wave-induced renal tubular oxidative stress. *Urol Res.* 2005;33:239-43.

Ozyurt H, Irmak MK, Akyol O, Sögüt S. Caffeic acid phenethyl ester changes the indices of oxidative stress in serum of rats with renal ischemia-reperfusion injury. *Cell Biochem Funct.* 2001;19:259-63.

Ozyurt B, Iraz M, Koca K, Ozyurt H, Sahin S. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury in rats. *Mol Cell Biochem.* 2006;292:197-203.

Ozyurt H, Ozyurt B, Koca K, Ozgocmen S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects rat skeletal muscle against ischemia±reperfusion-induced oxidative stress. *Vasc Pharmacol.* 2007;47:108-12.

Pain T, Yang XM, Critz SD, Yue Y, Nakano A, Liu GS, et al. Opening of mitochondrial KATP channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circulat Res.* 2000;87:460-6.

Park KM, Kim JI, Ahn Y, Bonventre AJ, Bonventre JV. Testosterone is responsible for enhanced susceptibility of males to ischemic renal injury. *J Biol Chem.* 2004;279:52:282-92.

Park Y, Hirose R, Dang K, Xu F, Behrends M, Tan V, et al. Increased severity of renal ischemia-reperfusion injury with venous clamping compared to arterial clamping in a rat model. *Surgery.* 2008;143:243-51.

Parlakpınar H, Ozer MK, Ucar M, Gaffaroglu M, Vardi N, Koc M, et al. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on amikacin-induced nephrotoxicity in rats. *Cell Biochem Funct.* 2006;24:363-7.

Parlakpınar H, Sahna E, Acet A, Mizrak B, Polat A. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on myocardial ischemia-reperfusion-induced apoptotic cell death. *Toxicology.* 2005;209:1-14.

Parlakpınar H, Tasdemir S, Polat A, Bay-Karabulut A, Vardi N, Ucar M, et al. Protective role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. *Toxicology.* 2005;207:169-77.

Pasqualin RC, Auler Jr JOC. Proteção miocárdica pelo pré e pós-condicionamento anestésico. *Rev Bras Anesthesiol.* 2008;58:506-19.

Pell TJ, Baxter GF, Yellow DM, Drew GM. Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol.* 1998;275:H1542-7.

Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, Raimondo S, Cappello S, Gattullo D, et al. Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel and protein kinase c activation. *Basic Res Cardiol.* 2006;101:180-9.

Rezzani R, Giugno L, Buffoli B, Bonomini F, Bianchi R. The protective effect of caffeic acid phenethyl ester against cyclosporine A-induced cardiotoxicity in rats. *Toxicology.* 2005;212:155-64.

Rich MW, Crecelius CA. Incidence, risk factors, and clinical course of acute renal insufficiency after cardiac catheterization in patients 70 years of age or older: a prospective study. *Arch Intern Med.* 1990;150:1237-42.

Riksen NP, Smits P, Rongen GA. Ischemic preconditioning: from molecular characterization to clinical application: part I. *Neth J Méd.* 2004;62:353-63.

Saavedra-Lopes M, Ramalho FS, Ramalho LNZ, Andrade-Silva A, Martinelli ALC, Jordão Jr AA, et al. The protective effect of CAPE on hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *J Surg Res.* 2008;150:271-7.

Sang H, Cao L, Qiu P, Xiong L, Wang R, Yan G. Isoflurane produces delayed preconditioning against spinal cord ischemic injury via release of free radicals in rabbits. *Anesthesiology.* 2006;105:953-60.

Semedo P, Wang PM, Andreucci TH, Cenedeze MA, Teixeira VPA, Reis MA, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate tissue damages triggered by renal ischemia and reperfusion injury. *Transplant Proc.* 2007;39:421-27.

Singri N, Ahya SN, Levin ML. Acute renal failure. *JAMA.* 2003;289:747-51. Spieckermann PG, Bruckner J, Kubler W, Lohr B, Bretschneider HJ. [Preischemic stress and resuscitation time of the heart]. *Verh Dtsch Ges Kreislaufforsch.* 1969;35:358-64.

Star RA. Treatment of acute renal failure. *Kidney Int.* 1998;54:1817-31.

Stefano C, Francesco C. Propolis an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia.* 2002;73:1-6.

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

Sud'ina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA, Korshunova GA, Sumbatyan NV, Varfolomeev SD. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett.* 1993;329:21-4.

Sun HY, Wang NP, Kerendi F, Halkos M, Kin H, Guyton RA, et al. Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca<sup>2+</sup> overload. *AJP-Heart Circ Physiol.* 2005;288:1900-08.

Tamer L, Sucu N, Ercan B, Ünlü A, Çalikoğlu M, Bilgin R, et al. The effects of the caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on erythrocyte membrane damage after hind limb ischemia-reperfusion. *Cell Biochem Funct.* 2004;22:287-90.

Tan J, Ma Z, Han L, Du R, Zhao L, Wei X, et al. Caffeic acid phenethyl ester possesses potente cardioprotective in a rabbit model of acute myocardial ischemia-reperfusion injury. *AJP-Heart Circ Physiol.* 2005;289:2265-71.

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

Tanaka K, Weihrauch D, Ludwig LM, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC. Mitochondrial adenosine triphosphate-regulated potassium channel opening acts as a trigger for isoflurane-induced preconditioning by generating reactive oxygen species. *Anesthesiology.* 2003;98:935-43.

Tanaka K, Ludwig LM, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC. Mechanisms of cardioprotection by volatile anesthetics. *Anesthesiology.* 2004; 100:707-21.

Teixeira VPA, Hial V, Gomes RAS, Castro ECC, Reis MG, Rodrigues MLP, et al. Correlation between adrenal central vein parasitism and heart fibrosis in chronic chagasic myocarditis. *A J Trop Med Hyg.* 1997;56:177-80.

Tekin A, Küçükkartallar T, Türkyilmaz S, Dinckan A, Esen H, Ates B, et al. Effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on sepsis in rats. *Inflammation.* 2008;31:273-80.

Tepel M, Van der Giet M, Schwarzfeld C, Laufer U, Liermann D, Zidek W. Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. *N Engl J Med.* 2000;343:180-4.

Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. Postconditioning: a form of “modified reperfusion” protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-akt pathway. *Circul Res.* 2004;95:230-2.

Tsutsumi YM, Yokoyama T, Horikawa Y, Roth DM, Patel HM. Reactive oxygen species trigger ischemic and pharmacological postconditioning: *in vivo* and *in vitro* characterization. *Life Sci.* 2007;81:1223-7.

- Uz E, Oktem F, Yılmaz, HR, Uzar E, Ozgu F. The activities of purine-catabolizing enzymes and the level of nitric oxide in rat kidneys subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Molec Cell Biochem.* 2005;277:165-70.
- Uz E, Söğüt S, Sahin S, Var A, Ozyurt H, Güleç M, et al. The protective role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. *World J Urol.* 2002;20:264-70.
- Uzar E, Sahin O, Koyuncuoglu HR, Uz E, Bas O, Kilbas S, et al. The activity of adenosine deaminase and the level of nitric oxide in spinal cord of methotrexate administered rats: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Toxicology.* 2006;218:125-133.
- Vianna PTG, Castiglia YMM, Braz JRC, Viero RM, Beier S, Vianna Filho PTG, et al. Remifentanyl, isoflurane and preconditioning attenuate renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Transplant Proc.* 2009;41:4080-2.
- Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, Mamarbachi AM, Villeneuve L, Fortier A, et al. Chronic treatment with N-acetyl-cysteine delays cellular senescence in endothelial cells isolated from a subgroup of atherosclerotic patients. *Mech Ageing Dev.* 2008;129:261-70.
- Weber NC, Schlack W. Inhalational anaesthetics and cardioprotection. *Handb Exp Pharmacol.* 2008:187-207.
- Webster RS. O papel do condicionamento isquêmico na lesão de isquemia e reperfusão do músculo grácil de ratos [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2005.
- Weihrauch D, Krolikowski JG, Bienengraeber M, Kersten JR, Warltier DC, Pagel PS. Morphine enhances isoflurane-induced postconditioning against myocardial infarction: the role of phosphatidylinositol-3-kinase and opioid receptors in rabbits. *Anesth Analg.* 2005;101:942-9.
- Yang Q, Dong H, Deng J, Wang Q, Ye R, Li X, et al. Sevoflurane preconditioning induces neuroprotection through reactive oxygen species-mediated up-regulation of antioxidant enzymes in rats. *Anesth Analg.* 2011;112:931-7.

Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev.* 2003;83:1113-51.

Yildiz Y, Serter M, Ek RO, Ergin K, Cecen S, Demir EM, et al. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on intestinal ischemia-reperfusion injury. *Dig Dis Sci.* 2009;54:738-44.

Yilmaz HR, Uz E, Yucel N, Altuntas I, Ozcelik N. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. *J Biochem Mol Toxicol.* 2004;18:234-8.

Zager RA. Gentamicin nephrotoxicity in the setting of acute renal hypoperfusion. *Am J Physiol.* 1988;254:574-81.

Zager RA. Myoglobin depletes renal adenine nucleotide pools in the presence and absence of shock. *Kidney Int.* 1991;39:111-9.

Zhao ZQ, Morris CD, Buddle JM, Wang NP, Muraki S, Sun HE, et al. Inhibition of myocardial apoptosis reduces infarct size and improves regional contractile dysfunction during reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2003;59:132-42.

## **ANEXOS**

---

**Tabela 9** - Grupo Controle (G1) - Laparotomia, nefrectomia direita, isquemia rim E dos ratos 01, 02, 03 e 04

**G1-Rato 01 – 320 g - 13.10.2008**

	9:25h		9:55h				10:40	10:45	
Momentos min	0	15	30	35	40	50	65	70	Extu
	M1		NefD		Isq		Desc	M2	bação
Temp °C	36,4	37,1	38,1	37,5	37,1	36,1	36,7	36,0	
PAM	116	115	113	110	60	53	67	80	

**G1-Rato 02 – 350 g - 13.10.2008**

	12:50h								
Momentos min	0	15	30	35	40	50	65	70	Extu
	M1		NefD		Isq		Desc	M2	bação
Temp °C	36,8	37,6	38,3	38,3	38,4	38,0	37,6	37,2	
PAM	80	93	86	90	93	60	50	97	

**G1-Rato03 – 318 g - 13.10.2008**

	15:20h								
Momentos min	0	15	30	35	40	50	65	70	Extu
	M1		NefD		Isq		Desc	M2	bação
Temp °C	37,3	38,5	38,3	38,5	38,5	38,5	38,3	37,0	
PAM	80	76	61	76	71	68	61	44	

**G1-Rato 04 – 310 g - 14.10.2008**

	08:55h								
Momentos min	0	15	30	35	40	50	65	70	Extu
	M1		NefD		Isq		Desc	M2	bação
Temp °C	38,7	38,3	37,7	36,9	36,4	38,1	38,9	38,9	
PAM	125	109	112	96	84	89	45*	75	

**Tabela 10** - Grupo Controle (G1) - Laparotomia, nefrectomia direita, isquemia rim E dos ratos 05, 06, 07 e 08

**G1-Rato 05 – 310 g - 14.10.2008**

11:05h									
Momentos min	0	15	30	35	40	50	65	70	Extu
	M1		NefD		Isq		Desc	M2	bação
Temp <sup>0</sup> C	38,2	38,5	38,3	37,8	37,1	36,8	39	38,0	
PAM	110	104	108	69	75	62	44	98	

**G1-Rato 06 – 310 g - 14.10.2008**

15:50h									
Momentos min	0	15	30	35	40	50	65	70	Extu
	M1		NefD		Isq		Desc	M2	bação
Temp <sup>0</sup> C	38,6	38,1	37,6	36,6	36,2	38,2	38,9	38,9	
PAM	125	109	112	96	84	89	45*	75	

**G1-Rato 07 – 300 g - 20.10.2008**

9:05h									
9:35h			9:45			10:10		10:15h	
Momentos min	0	15	30	35	40	50	65	70	Extu
	M1		NefD	*	Isq		Desc	M2	bação
Temp <sup>0</sup> C	37,3	38,3	36,6	36,2	34,5	35,1	40,1	38,8	
PAM	102	119	57	61	78	80	89	64	

\*Obstrução do tubo traqueal

**G1-Rato 08 – 340 g - 20.10.2008**

13:10h									
13:40h			13:50h			14:15		14:25h	
Momentos min	0	15	30	35	40	50	65	70	Extu
	M1		NefD		Isq		Desc	M2	bação
Temp <sup>0</sup> C	36,2	36,7	36,5	35,8	34,6	35,9	35,8	34,9	
PAM	130	168	154	127	108	146	88	90	

**Tabela 11** - Grupo CAPE (G2) - Laparotomia, nefrectomia D + isquemia renal E + injeção intraperitoneal de solução do CAPE dos ratos 01, 02, 03, 04 e 05

**G2-Rato 01 (440 g + 0,250 mL de CAPE) – 10.11.2008**

	09:30h		10:00h		10:10h		10:35h	10:40h	
Momentos min	0	15	30	35	40	50	65	70	
	M1		NefD		Isq		Desc	PósD	M2
Temp °C	35,4	36,9	37,3	36,6	36,0	36,5	37,3	37,2	36,2
PAM	119	147	144	94	108	108	115	71	114

**G2-Rato 02 (380 g + 0,216 mL de CAPE) – 10.11.2008**

	13:00 h		13:30h		13:40h		14:05h	14:15	
Momentos min	0	15	30	35	40	50	65	70	
	M1		NefD		Isq		Desc	PósD	M2
Temp °C	36,6	38,5	39,4	38,1	37,8	37,7	38,9	37,9	37,7
PAM	130	150	123	67	73	115	118	62	123

**G2-Rato 03 (450 g + 0,255 mL de CAPE) – 10.11.2008**

	14:55 h		15:25h		15:35h		16:00h	16:15h	
Momentos min	0	15	30	35	40	50	65	70	
	M1		NefD		Isq		Desc	PósD	M2
Temp °C	35,7	38,7	38,6	36,8	36,0	35,0	39,0	36,7	35,4
PAM	114	113	109	70	45	41	72	62	71

**G2-Rato 04 (470 g + 0,267 mL de CAPE) – 10.11.2008**

	17:00 h		17:30h		17:40h		18:05h	18:15h	
Momentos min	0	15	30	35	40	50	65	70	
	M1		NefD		Isq		Desc	PósD	M2
Temp °C	36,9	38,3	38,4	37,5	37,1	37,2	37,5	37,3	37,1
PAM	114	65	57	59	65	57	48	50	57

**G2-Rato 05 (440 g + 0,250 mL de CAPE) – 11.11.2008**

	08:00h		08:30h		08:40h		09:05h	09:15	
Momentos min	0	15	30	35	40	50	65	70	
	M1		NefD		Isq		Desc	PósD	M2
Temp °C	33,7	37,3	38,4	37,5	34,5	35,8	34,7	33,0	31,5
PAM	116	133	141	48	65	90	85	59	70

**Tabela 12** - Grupo CAPE (G2) - Laparotomia, nefrectomia D + isquemia renal E + injeção intraperitoneal de solução do CAPE dos ratos 06, 07, 08, 09 e 10

**G2-Rato 06 ( 460 g + 0,261 mL de CAPE) – 11.11.2008**

	09:40h		10:10h		10:20h		10:45h	10:50	
Momentos min	0	15	30	35	40	50	65	70	
	<b>M1</b>		<b>NefD</b>		<b>Isq</b>		<b>Desc</b>	<b>PósD</b>	<b>M2</b>
Temp °C	<b>38,2</b>	<b>39,9</b>	<b>38,0</b>	<b>36,9</b>	<b>36,8</b>	<b>38,2</b>	<b>39,0</b>	<b>38,5</b>	<b>37,9</b>
PAM	<b>110</b>	<b>108</b>	<b>98</b>	<b>60</b>	<b>59</b>	<b>104</b>	<b>69</b>	<b>42</b>	<b>106</b>

**G2-Rato 07 (300 g + 0,170mL de CAPE) – 11.11.2008**

	13:25h		13:55h		14:05h		14:30h	14:35	
Momentos min	0	15	30	35	40	50	65	70	
	<b>M1</b>		<b>NefD</b>		<b>Isq</b>		<b>Desc</b>	<b>PósD</b>	<b>M2</b>
Temp °C	<b>36,6</b>	<b>37,9</b>	<b>37,5</b>	<b>36,8</b>	<b>35,9</b>	<b>35,0</b>	<b>35,6</b>	<b>35,3</b>	<b>34,5</b>
PAM	<b>122</b>	<b>115</b>	<b>75</b>	<b>54</b>	<b>50</b>	<b>105</b>	<b>106</b>	<b>40</b>	<b>96</b>

**G2-Rato 08 (340 g + 0,193 mL de CAPE) – 11.11.2008**

	15:10h		15:40h		15:50h		16:15h	16:20h	
Momentos min	0	15	30	35	40	50	65	70	
	<b>M1</b>		<b>NefD</b>		<b>Isq</b>		<b>Desc</b>	<b>PósD</b>	<b>M2</b>
Temp °C	<b>37,6</b>	<b>38,1</b>	<b>38,1</b>	<b>37,8</b>	<b>37,7</b>	<b>37,9</b>	<b>38,2</b>	<b>38,0</b>	<b>37,4</b>
PAM	<b>108</b>	<b>111</b>	<b>116</b>	<b>62</b>	<b>59</b>	<b>53</b>	<b>53</b>	<b>48</b>	<b>84</b>

**G2-Rato 09 (360 g + 0,204 mL de CAPE) – 01.12.2008**

	13:40h								70
Momentos min	0	15	30	35	40	50	65		70
	<b>M1</b>		<b>NefD</b>		<b>Isq</b>		<b>Desc</b>	<b>PósD</b>	<b>M2</b>
Temp °C	<b>37,5</b>	<b>37,9</b>	<b>37,8</b>	<b>37,6</b>	<b>37,2</b>	<b>40</b>	<b>39,8</b>	<b>38,0</b>	<b>37,5</b>
PAM	<b>108</b>	<b>98</b>	<b>82</b>	<b>80</b>	<b>80</b>	<b>66</b>	<b>75</b>	<b>60</b>	<b>70</b>

**G2-Rato 10 (360 g + 0,204 mL de CAPE) – 01.12.2008**

	15:40h		h		h		h		70
Momentos min	0	15	30	35	40	50	65		70
	<b>M1</b>		<b>NefD</b>		<b>Isq</b>		<b>Desc</b>	<b>PósD</b>	<b>M2</b>
Temp °C	<b>38,2</b>	<b>37,6</b>	<b>37,9</b>	<b>38,0</b>	<b>38,3</b>	<b>39,4</b>	<b>39,6</b>	<b>39,2</b>	<b>38,5</b>
PAM	<b>119</b>	<b>111</b>	<b>103</b>	<b>100</b>	<b>96</b>	<b>97</b>	<b>78</b>	<b>60</b>	<b>75</b>

**Tabela 13** - Grupo Diluente (G3) – Laparotomia+nefrectomia D + isquemia renal E + injeção intraperitoneal da solução diluente do CAPE, porém sem o CAPE) dos ratos 01, 02, 03 e 04

**G3-Rato 01(420 g + 0,238 mL da solução diluente do CAPE) – 24.11.2008**

	08:55h		09:25h		09:35h		10:00h		10:10h
Momentos min	0	15	30	35	40	50	65		70
	M1		NefD		Isq		Desc	PósD	M2
Temp °C	36,8	36,6	36,2	35,2	34,7	36,4	37,1	37,1	36,7
PAM	111	133	134	100	99	132	133	115	128

**G3-Rato 02(350 g + 0,198 mL da solução diluente do CAPE) – 24.11.2008**

	10:40h		11:10h		11:20h		11:45h		11:55h
Momentos min	0	15	30	35	40	50	65		70
	M1		NefD		Isq		Desc	PósD	M2
Temp °C	36,8	38,6	38,3	38,1	37,4	38,9	38,8	38,6	38,0
PAM	123	105	106	90	103	94	87	98	105

**G3-Rato 03(310 g + 0,176 mL da solução diluente do CAPE) – 25.11.2008**

	08:40h		09:10h		09:20h		09:45h		09:55h
Momentos min	0	15	30	35	40	50	65		70
	M1		NefD		Isq		Desc	PósD	M2
Temp °C	34,8	36,7	36,6	34,5	34,1	36,5	36,6	36,6	36,1
PAM	127	112	98	60	78	114	110	40	102

**G3-Rato 04(370 g + 0,210 mL da solução diluente do CAPE) – 25.11.2008**

	10:45h		11:15h		11:25h		11:50h		11:54h
Momentos min	0	15	30	35	40	50	65		70
	M1		NefD		Isq		Desc	PósD	M2
Temp °C	36,9	38,6	37,5	36,9	35,7	38,6	39,4	38,4	36,9
PAM	104	102	56	47	77	82	79	70	89

**Tabela 14** - Grupo Diluente (G3) – Laparotomia+nefrectomia D + isquemia renal E + injeção intraperitoneal da solução diluente do CAPE, porém sem o CAPE) dos ratos 05, 06, 07 e 08

**G3-Rato 05(430 g + 0,244mL da solução diluente do CAPE) – 25.11.2008**

	13:25h		13:55h		14:05h		14:30h		14:36h
Momentos min	0	15	30	35	40	50	65		70
	M1		NefD		Isq		Desc	PósD	M2
Temp °C	36,1	37,2	37,2	36,0	35,9	37,4	38,0	37,0	35,1
PAM	96	100	89	40	88	81	92	65	77

**G3-Rato 06 (390 g + 0,221 mL da solução diluente do CAPE) – 25.11.2008**

	15:10h		15:40h		15:50h		16:15h		16:15h
Momentos min	0	15	30	35	40	50	65		70
	M1		NefD		Isq		Desc	PósD	M2
Temp °C	36,0	38,5	38,3	37,8	37,2	37,7	39,3	38,9	37,8
PAM	108	111	104	67	71	89	86	75	80

**G3-Rato 07 (420 g + 0,244 mL da solução diluente do CAPE) – 01.12.2008**

	09:00 h		09:30 h		09:40 h		10:05 h		
Momentos min	0	15	30	35	40	50	65		70
	M1		NefD		Isq		Desc	PósD	M2
Temp °C	39,0	38,2	38,2	37,3	37,3	38,5	38,5	38,2	37,9
PAM	91	89	77	58	64	66	64	70	75

**G3-Rato 08 (340 g + 0,193 mL da solução diluente do CAPE) – 01.12.2008**

	11:00h		h		h		h		
Momentos min	0	15	30	35	40	50	65		70
	M1		NefD		Isq		Desc	PósD	M2
Temp °C	37,0	38	38,5	38,0	37	37,9	38	37,9	37,6
PAM	108	105	95	80	76	84	56	65	60

**Tabela 15 - Resultados Temperatura dos Ratos (°C)**

<i>Resultados Temperatura G1 (Controle)</i>		
RATO 01	36,4	36
RATO 02	36,8	37,2
RATO 03	37,3	37
RATO 04	38,7	38,9
RATO 5	38,2	38
RATO 6	39,6	38,9
RATO 7	37,3	38,8
RATO 8	36,2	34,9

<i>Resultados Temperatura G2 (CAPE)</i>		
RATO 01	35,4	36,2
RATO 02	36,6	37,7
RATO 03	35,7	35,4
RATO 04	36,9	37,1
RATO 05	33,7	31,5
RATO 06	38,2	37,9
RATO 07	36,6	34,5
RATO 08	37,6	37,4
RATO 09	37,5	37,5
RATO 10	38,2	38,5

<i>Resultados Temperatura G (Diluyente)</i>		
RATO 01	36,8	36,7
RATO 02	36,8	38
RATO 03	34,8	36,1
RATO 04	36,9	36,9
RATO 05	36,1	35,1
RATO 06	36	37,8
RATO 07	39	37,9
RATO 08	37	37,6

**Tabela 16** - Resultado dos pesos dos ratos (em gramas)

<i>Peso dos Ratos G1 (Controle)</i>	
RATO 01	320
RATO 02	350
RATO 03	318
RATO 04	310
RATO 5	310
RATO 6	310
RATO 7	300
RATO 8	340

<i>Peso dos Ratos G2 (CAPE)</i>	
RATO 01	440
RATO 02	380
RATO 03	450
RATO 04	470
RATO 05	440
RATO 06	460
RATO 07	300
RATO 08	340
RATO 09	360
RATO 10	360

<i>Peso dos Ratos G3 (Diluyente)</i>	
RATO 01	420
RATO 02	350
RATO 03	310
RATO 04	370
RATO 05	430
RATO 06	390
RATO 07	420
RATO 08	340

**Tabela 17** - Resultados PAM dos Ratos (mmHg)

<b><i>Resultados PAM G1 (Controle)</i></b>		
RATO 01	116	80
RATO 02	80	97
RATO 03	80	44
RATO 04	125	75
RATO 5	110	98
RATO 6	125	75
RATO 7	102	64
RATO 8	130	90

<b><i>Resultados PAM G2 (CAPE)</i></b>		
RATO 01	119	114
RATO 02	130	123
RATO 03	114	71
RATO 04	114	57
RATO 05	116	70
RATO 06	110	106
RATO 07	122	96
RATO 08	108	84
RATO 09	108	70
RATO 10	119	75

<b><i>Resultados PAM G3 (Diluyente)</i></b>		
RATO 01	111	128
RATO 02	123	105
RATO 03	127	102
RATO 04	104	89
RATO 05	96	77
RATO 06	108	80
RATO 07	91	75
RATO 08	108	70

**Tabela 18** - Resultados da Creatinina dos Ratos (mg.dL<sup>-1</sup>)

<i>Resultados Creatinina G1 (Controle)</i>			
RATO 01	0,3	0,5	0,7
RATO 02	0,3	0,5	0,8
RATO 03	0,4	0,4	1,2
RATO 04	0,4	0,4	0,6
RATO 5	0,4	0,4	1
RATO 6	0,4	0,7	1,5
RATO 7	0,3	0,6	3,7
RATO 8	0,3	0,5	0,6
<i>Resultados Creatinina G2 (CAPE)</i>			
RATO 01	0,6	0,9	2,6
RATO 02	0,4	0,9	4,7
RATO 03	0,5	0,8	5,2
RATO 04	0,4	0,8	3,6
RATO 05	0,5	0,8	4,4
RATO 06	0,4	0,8	3,8
RATO 07	0,4	0,6	1,6
RATO 08	0,4	0,6	3,6
RATO 09	0,3	0,6	4,1
RATO 10	0,4	0,7	2,1
<i>Resultados Creatinina G3 (Diluyente)</i>			
RATO 01	0,4	0,6	1,1
RATO 02	0,4	0,6	1,7
RATO 03	0,4	0,5	0,7
RATO 04	0,3	0,7	0,9
RATO 05	0,3	0,6	0,9
RATO 06	0,4	0,7	0,9
RATO 07	0,4	0,6	4,1
RATO 08	0,4	0,6	1,4

**Tabela 19** - Alterações histológicas nos rins dos ratos 1, 2, 3 e 4 do Grupo 1

Campo 40xs	Caso/09	Pericapsular - n focos	Pericapsular (% p/ 25	Medular - n focos	Medular (% p/ 25	grupo_patge
1	911	0	0	0	0	Rato1 G1
2	911	0	0	0	0	Rato1 G1
3	911	7	28	0	0	Rato1 G1
4	911	1	4	2	8	Rato1 G1
5	911	2	8	5	20	Rato1 G1
6	911	2	8	9	36	Rato1 G1
7	911	8	32	4	16	Rato1 G1
8	911	1	4	10	40	Rato1 G1
9	911	1	4	5	20	Rato1 G1
10	911	3	12	3	12	Rato1 G1
1	912	3	12	8	32	Rato2 G1
2	912	5	20	1	4	Rato2 G1
3	912	9	36	1	4	Rato2 G1
4	912	4	16	2	8	Rato2 G1
5	912	3	12	6	24	Rato2 G1
6	912	3	12	7	28	Rato2 G1
7	912	9	36	12	48	Rato2 G1
8	912	7	28	7	28	Rato2 G1
9	912	4	16	1	4	Rato2 G1
10	912	5	20	10	40	Rato2 G1
1	913	3	12	1	4	Rato3 G1
2	913	4	16	2	8	Rato3 G1
3	913	2	8	6	24	Rato3 G1
4	913	3	12	3	12	Rato3 G1
5	913	3	12	4	16	Rato3 G1
6	913	3	12	5	20	Rato3 G1
7	913	4	16	2	8	Rato3 G1
8	913	3	12	4	16	Rato3 G1
9	913	5	20	0	0	Rato3 G1
10	913	11	44	0	0	Rato3 G1
1	914	0	0	3	12	Rato4 G1
2	914	1	4	2	8	Rato4 G1
3	914	3	12	3	12	Rato4 G1
4	914	3	12	2	8	Rato4 G1
5	914	6	24	3	12	Rato4 G1
6	914	2	8	2	8	Rato4 G1
7	914	1	4	2	8	Rato4 G1
8	914	1	4	1	4	Rato4 G1
9	914	2	8	2	8	Rato4 G1
10	914	2	8	2	8	Rato4 G1

**Tabela 20** - Alterações histológicas nos rins dos ratos 5, 6, 7 e 8 do Grupo 1

Campo 40xs	Caso/09	Pericapsular - n focos	Pericapsular (% p/ 25)	Medular - n focos	Medular (% p/ 25)	grupo_patge
1	915	0	0	4	16	Rato5 G1
2	915	2	8	4	16	Rato5 G1
3	915	0	0	7	28	Rato5 G1
4	915	1	4	7	28	Rato5 G1
5	915	3	12	9	36	Rato5 G1
6	915	5	20	5	20	Rato5 G1
7	915	4	16	5	20	Rato5 G1
8	915	2	8	4	16	Rato5 G1
9	915	4	16	3	12	Rato5 G1
10	915	3	12	1	4	Rato5 G1
1	916	0	0	0	0	Rato6 G1
2	916	4	16	2	8	Rato6 G1
3	916	0	0	3	12	Rato6 G1
4	916	3	12	1	4	Rato6 G1
5	916	3	12	2	8	Rato6 G1
6	916	3	12	0	0	Rato6 G1
7	916	0	0	2	8	Rato6 G1
8	916	1	4	4	16	Rato6 G1
9	916	1	4	0	0	Rato6 G1
10	916	0	0	0	0	Rato6 G1
1	917	4	16	11	44	Rato7 G1
2	917	5	20	6	24	Rato7 G1
3	917	9	36	9	36	Rato7 G1
4	917	8	32	4	16	Rato7 G1
5	917	8	32	7	28	Rato7 G1
6	917	9	36	4	16	Rato7 G1
7	917	5	20	6	24	Rato7 G1
8	917	7	28	6	24	Rato7 G1
9	917	3	12	6	24	Rato7 G1
10	917	8	32	11	44	Rato7 G1
1	918	2	8	3	12	Rato8 G1
2	918	4	16	2	8	Rato8 G1
3	918	3	12	1	4	Rato8 G1
4	918	5	20	0	0	Rato8 G1
5	918	2	8	1	4	Rato8 G1
6	918	2	8	0	0	Rato8 G1
7	918	1	4	3	12	Rato8 G1
8	918	0	0	0	0	Rato8 G1
9	918	3	12	0	0	Rato8 G1
10	918	4	16	2	8	Rato8 G1

**Tabela 21 - Alterações histológicas nos rins dos ratos 1, 2, 3, 4 e 5 do Grupo 2**

Campo 40xs	Caso/09	Pericapsular - n focos	Pericapsular (% p/ 25)	Medular - n focos	Medular (% p/ 25)	grupo_patge
1	919	2	8	3	12	Rato1 G2
2	919	0	0	4	16	Rato1 G2
3	919	2	8	2	8	Rato1 G2
4	919	1	4	1	4	Rato1 G2
5	919	1	4	0	0	Rato1 G2
6	919	0	0	0	0	Rato1 G2
7	919	3	12	1	4	Rato1 G2
8	919	3	12	1	4	Rato1 G2
9	919	1	4	2	8	Rato1 G2
10	919	0	0	0	0	Rato1 G2
1	920	1	4	1	4	Rato2 G2
2	920	2	8	3	12	Rato2 G2
3	920	7	28	5	20	Rato2 G2
4	920	11	44	9	36	Rato2 G2
5	920	1	4	7	28	Rato2 G2
6	920	1	4	7	28	Rato2 G2
7	920	0	0	12	48	Rato2 G2
8	920	2	8	0	0	Rato2 G2
9	920	1	4	5	20	Rato2 G2
10	920	0	0	4	16	Rato2 G2
1	921	4	16	4	16	Rato3 G2
2	921	10	40	5	20	Rato3 G2
3	921	5	20	11	44	Rato3 G2
4	921	9	36	9	36	Rato3 G2
5	921	4	16	10	40	Rato3 G2
6	921	10	40	5	20	Rato3 G2
7	921	19	76	1	4	Rato3 G2
8	921	10	40	17	68	Rato3 G2
9	921	13	52	6	24	Rato3 G2
10	921	8	32	8	32	Rato3 G2
1	922	14	56	4	16	Rato4 G2
2	922	13	52	11	44	Rato4 G2
3	922	8	32	7	28	Rato4 G2
4	922	10	40	7	28	Rato4 G2
5	922	11	44	7	28	Rato4 G2
6	922	16	64	14	56	Rato4 G2
7	922	10	40	10	40	Rato4 G2
8	922	7	28	8	32	Rato4 G2
9	922	14	56	7	28	Rato4 G2
10	922	17	68	10	40	Rato4 G2
1	923	7	28	10	40	Rato5 G2
2	923	2	8	7	28	Rato5 G2
3	923	4	16	15	60	Rato5 G2
4	923	2	8	9	36	Rato5 G2
5	923	18	72	13	52	Rato5 G2
6	923	8	32	11	44	Rato5 G2
7	923	4	16	8	32	Rato5 G2
8	923	7	28	5	20	Rato5 G2
9	923	6	24	11	44	Rato5 G2
10	923	2	8	9	36	Rato5 G2

Tabela 22 - Alterações histológicas nos rins dos ratos 6, 7, 8, 9 e 10 do Grupo 2

Campo 40xs	Caso/09	Pericapsular - n foco	Pericapsular (% p/ 25)	Medular - n focos	Medular (% p/ 25)	grupo_patge
1	924	9	36	15	60	Rato6 G2
2	924	4	16	3	12	Rato6 G2
3	924	1	4	2	8	Rato6 G2
4	924	9	36	4	16	Rato6 G2
5	924	9	36	8	32	Rato6 G2
6	924	15	60	2	8	Rato6 G2
7	924	7	28	6	24	Rato6 G2
8	924	16	64	5	20	Rato6 G2
9	924	5	20	11	44	Rato6 G2
10	924	4	16	3	12	Rato6 G2
1	925	11	44	17	68	Rato7 G2
2	925	7	28	14	56	Rato7 G2
3	925	10	40	8	32	Rato7 G2
4	925	8	32	2	8	Rato7 G2
5	925	1	4	1	4	Rato7 G2
6	925	8	32	1	4	Rato7 G2
7	925	0	0	1	4	Rato7 G2
8	925	12	48	5	20	Rato7 G2
9	925	13	52	0	0	Rato7 G2
10	925	14	56	4	16	Rato7 G2
1	926	7	28	0	0	Rato8 G2
2	926	6	24	6	24	Rato8 G2
3	926	10	40	9	36	Rato8 G2
4	926	12	48	1	4	Rato8 G2
5	926	3	12	3	12	Rato8 G2
6	926	6	24	2	8	Rato8 G2
7	926	10	40	2	8	Rato8 G2
8	926	8	32	3	12	Rato8 G2
9	926	7	28	5	20	Rato8 G2
10	926	11	44	3	12	Rato8 G2
1	927	12	48	18	72	Rato9 G2
2	927	10	40	12	48	Rato9 G2
3	927	12	48	11	44	Rato9 G2
4	927	9	36	4	16	Rato9 G2
5	927	9	36	11	44	Rato9 G2
6	927	12	48	8	32	Rato9 G2
7	927	15	60	5	20	Rato9 G2
8	927	13	52	7	28	Rato9 G2
9	927	17	68	7	28	Rato9 G2
10	927	15	60	6	24	Rato9 G2
1	928	1	4	13	52	Rato10 G2
2	928	4	16	15	60	Rato10 G2
3	928	8	32	11	44	Rato10 G2
4	928	9	36	6	24	Rato10 G2
5	928	9	36	2	8	Rato10 G2
6	928	13	52	3	12	Rato10 G2
7	928	9	36	3	12	Rato10 G2
8	928	12	48	5	20	Rato10 G2
9	928	12	48	2	8	Rato10 G2
10	928	14	56	3	12	Rato10 G2

**Tabela 23** - Alterações histológicas nos rins dos ratos 1, 2, 3 e 4 do Grupo 3

Campo 40xs	Caso/09	Pericapsular - n focos	Pericapsular (% p/ 25)	Medular - n focos	Medular (% p/ 25)	grupo_patge
1	929	0	0	1	4	Rato1 G3
2	929	3	12	0	0	Rato1 G3
3	929	4	16	5	20	Rato1 G3
4	929	0	0	3	12	Rato1 G3
5	929	2	8	6	24	Rato1 G3
6	929	2	8	1	4	Rato1 G3
7	929	3	12	1	4	Rato1 G3
8	929	2	8	0	0	Rato1 G3
9	929	1	4	2	8	Rato1 G3
10	929	1	4	0	0	Rato1 G3
1	930	1	4	0	0	Rato2 G3
2	930	4	16	1	4	Rato2 G3
3	930	2	8	7	28	Rato2 G3
4	930	4	16	6	24	Rato2 G3
5	930	2	8	7	28	Rato2 G3
6	930	3	12	5	20	Rato2 G3
7	930	4	16	4	16	Rato2 G3
8	930	9	36	5	20	Rato2 G3
9	930	11	44	8	32	Rato2 G3
10	930	6	24	6	24	Rato2 G3
1	931	0	0	1	4	Rato3 G3
2	931	2	8	2	8	Rato3 G3
3	931	3	12	4	16	Rato3 G3
4	931	2	8	2	8	Rato3 G3
5	931	1	4	0	0	Rato3 G3
6	931	2	8	2	8	Rato3 G3
7	931	3	12	5	20	Rato3 G3
8	931	2	8	0	0	Rato3 G3
9	931	2	8	4	16	Rato3 G3
10	931	4	16	0	0	Rato3 G3
1	932	9	36	1	4	Rato4 G3
2	932	4	16	0	0	Rato4 G3
3	932	3	12	8	32	Rato4 G3
4	932	7	28	8	32	Rato4 G3
5	932	7	28	4	16	Rato4 G3
6	932	7	28	2	8	Rato4 G3
7	932	6	24	2	8	Rato4 G3
8	932	3	12	0	0	Rato4 G3
9	932	4	16	0	0	Rato4 G3
10	932	3	12	4	16	Rato4 G3

**Tabela 24** - Alterações histológicas nos rins dos ratos 5, 6, 7 e 8 do Grupo 3

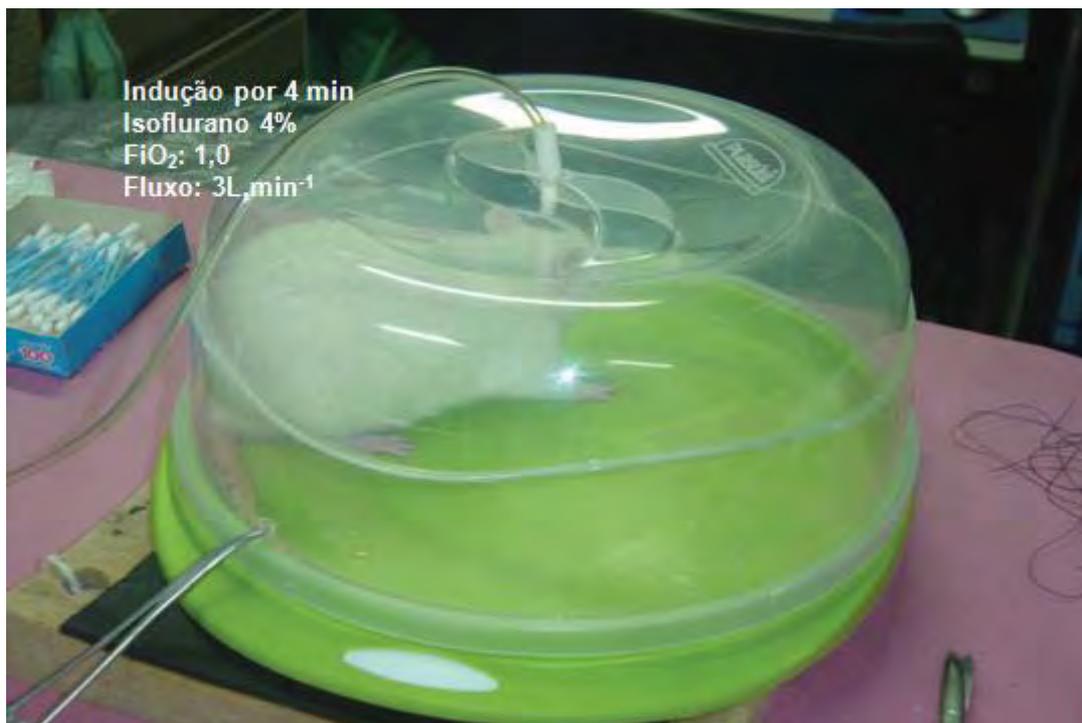
Campo 40xs	Caso/09	Pericapsular - n focos	Pericapsular (% p/ 25)	Medular - n focos	Medular (% p/ 25)	grupo_patge
1	933	1	4	0	0	Rato5 G3
2	933	2	8	3	12	Rato5 G3
3	933	0	0	3	12	Rato5 G3
4	933	0	0	0	0	Rato5 G3
5	933	3	12	3	12	Rato5 G3
6	933	5	20	2	8	Rato5 G3
7	933	2	8	2	8	Rato5 G3
8	933	1	4	1	4	Rato5 G3
9	933	3	12	0	0	Rato5 G3
10	933	2	8	0	0	Rato5 G3
1	934	0	0	3	12	Rato6 G3
2	934	0	0	2	8	Rato6 G3
3	934	0	0	0	0	Rato6 G3
4	934	4	16	0	0	Rato6 G3
5	934	0	0	1	4	Rato6 G3
6	934	0	0	0	0	Rato6 G3
7	934	1	4	2	8	Rato6 G3
8	934	1	4	1	4	Rato6 G3
9	934	0	0	1	4	Rato6 G3
10	934	2	8	2	8	Rato6 G3
1	935	2	8	3	12	Rato7 G3
2	935	1	4	1	4	Rato7 G3
3	935	6	24	0	0	Rato7 G3
4	935	9	36	0	0	Rato7 G3
5	935	4	16	2	8	Rato7 G3
6	935	10	40	2	8	Rato7 G3
7	935	7	28	5	20	Rato7 G3
8	935	10	40	5	20	Rato7 G3
9	935	1	4	6	24	Rato7 G3
10	935	1	4	14	56	Rato7 G3
1	936	12	48	12	48	Rato8 G3
2	936	3	12	3	12	Rato8 G3
3	936	6	24	0	0	Rato8 G3
4	936	1	4	0	0	Rato8 G3
5	936	2	8	10	40	Rato8 G3
6	936	1	4	11	44	Rato8 G3
7	936	4	16	12	48	Rato8 G3
8	936	12	48	13	52	Rato8 G3
9	936	6	24	4	16	Rato8 G3
10	936	10	40	12	48	Rato8 G3

**Tabela 25** - Alterações histológicas pericapsulares em % transformadas em graus de Park

Grupo patologia	% Pericapsular	Grau (Park et al)	Grupo
911	6	1	G1
912	18	2	G1
913	12	2	G1
914	8	1	G1
915	10	2	G1
916	4	1	G1
917	30	3	G1
918	10	2	G1
919	4	1	G2
920	4	1	G2
921	38	3	G2
922	48	3	G2
923	20	2	G2
924	32	3	G2
925	36	3	G2
926	30	3	G2
927	48	3	G2
928	36	3	G2
929	8	1	G3
930	16	2	G3
931	8	1	G3
932	20	2	G3
933	8	1	G3
934	0	0	G3
935	20	2	G3
936	20	2	G3

**Tabela 26** - Alterações histológicas medulares em % transformadas em graus de Park

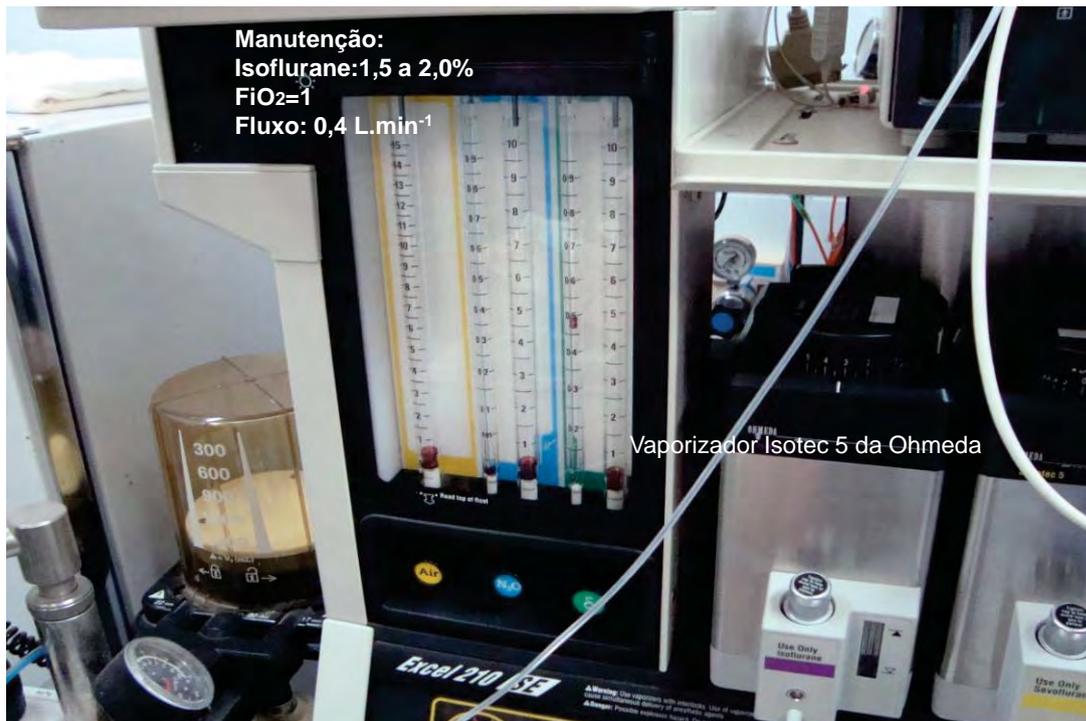
Grupo patologia	% Medular	Grau (Park et al)	Grupo
911	14	2	G1
912	26	3	G1
913	10	2	G1
914	8	1	G1
915	18	2	G1
916	6	1	G1
917	24	2	G1
918	4	1	G1
919	4	1	G2
920	20	2	G2
921	28	3	G2
922	30	3	G2
923	38	3	G2
924	18	2	G2
925	12	2	G2
926	12	2	G2
927	30	3	G2
928	16	2	G2
929	4	1	G3
930	22	2	G3
931	8	1	G3
932	8	1	G3
933	6	1	G3
934	4	1	G3
935	10	2	G3
936	42	3	G3



**Anestesia do rato**



**Intubação traqueal do rato**



Manutenção da anestesia



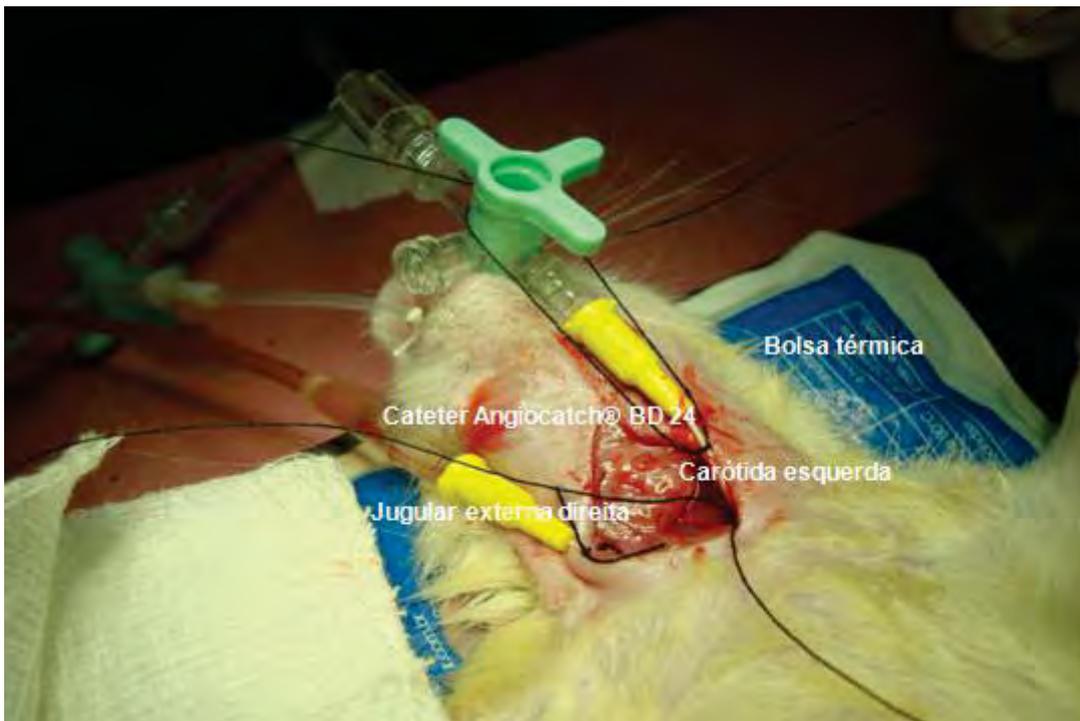
Ventilador utilizado



Monitorização do rato anestesiado



Tricotomia cervical



**Cateterização da veia jugular externa direita e da carótida esquerda**

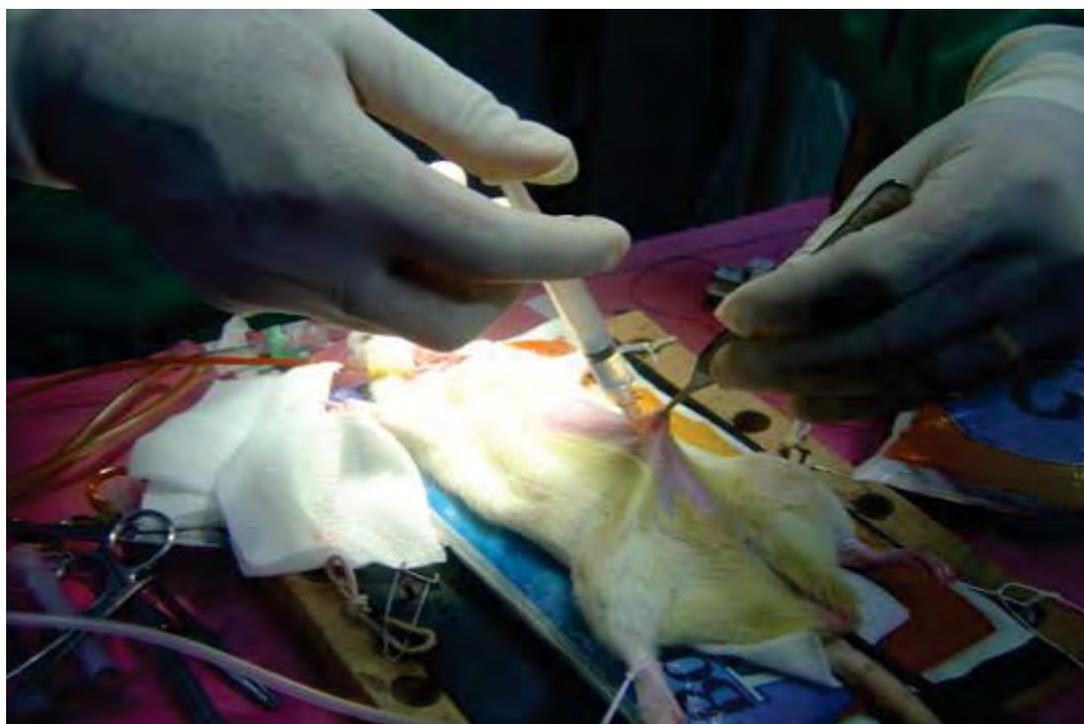


**Coleta de 1 mL de sangue arterial em M1 e M2 (creatinina)**

**M1: coleta de amostra de sangue**



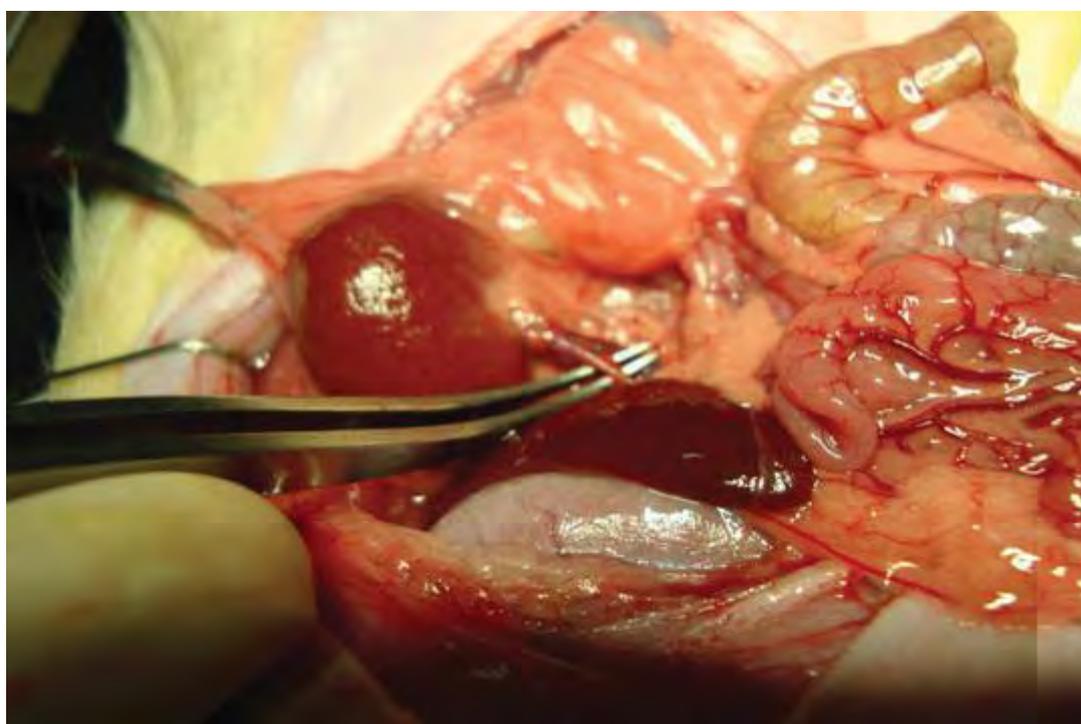
**Reposição da volemia**



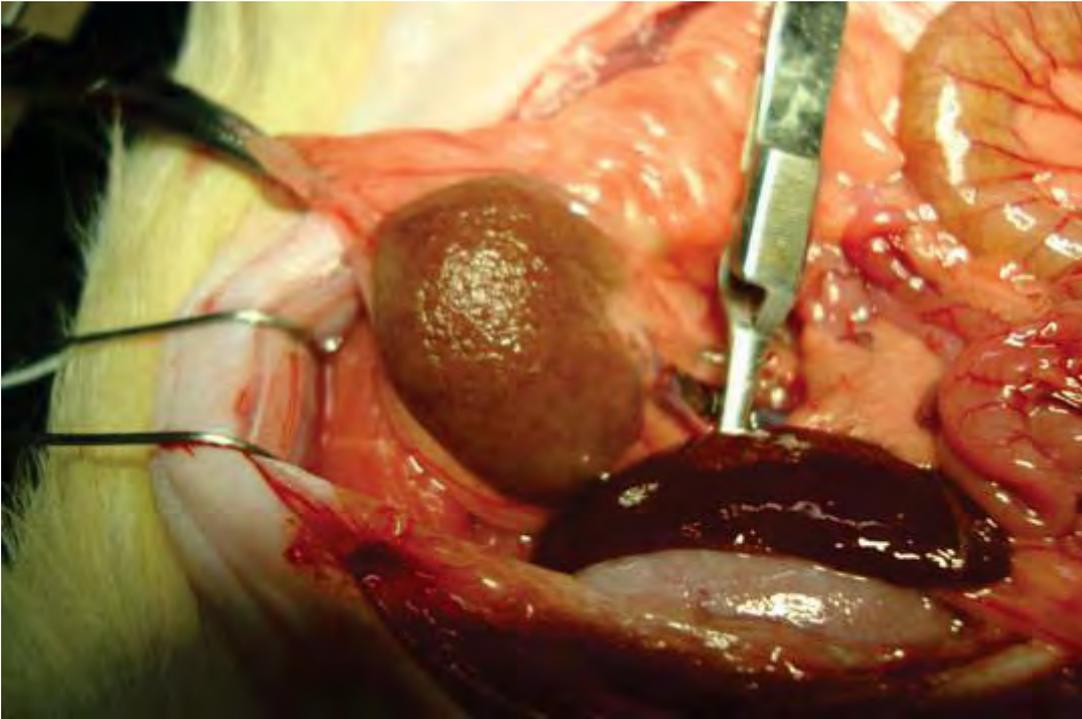
**Momento 1: injeção do CAPE (ou do diluente) intraperitoneal**



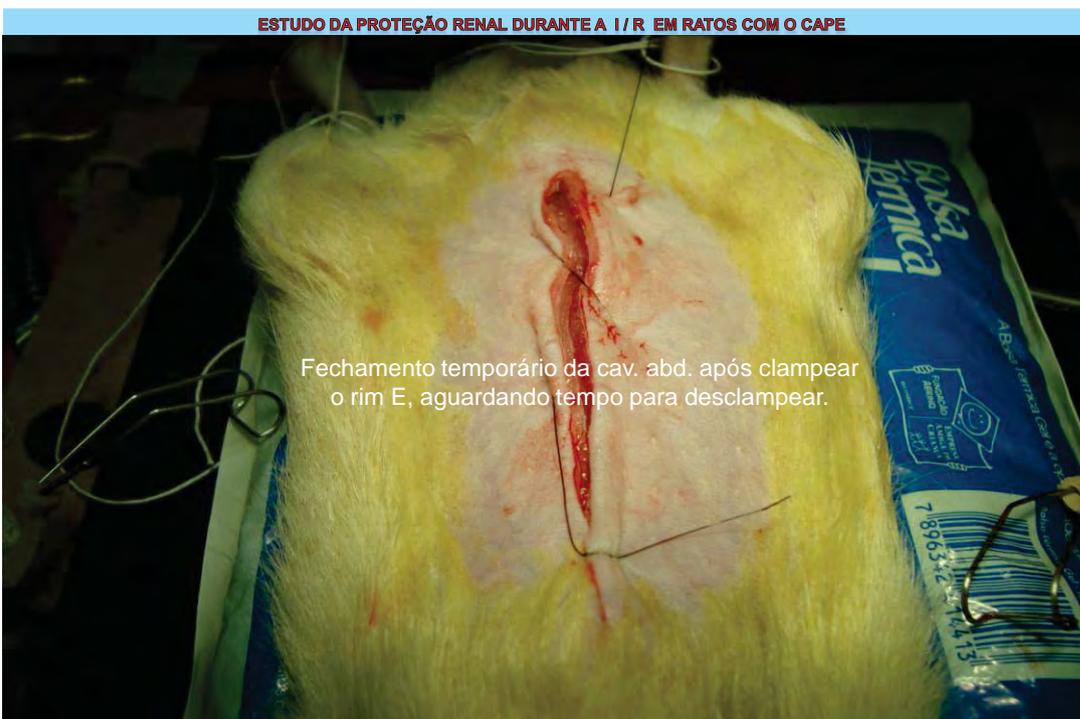
Laparotomia: nefrectomia direita



Dissecção da artéria renal esquerda



**Clampeamento da artéria renal esquerda por 25 minutos**

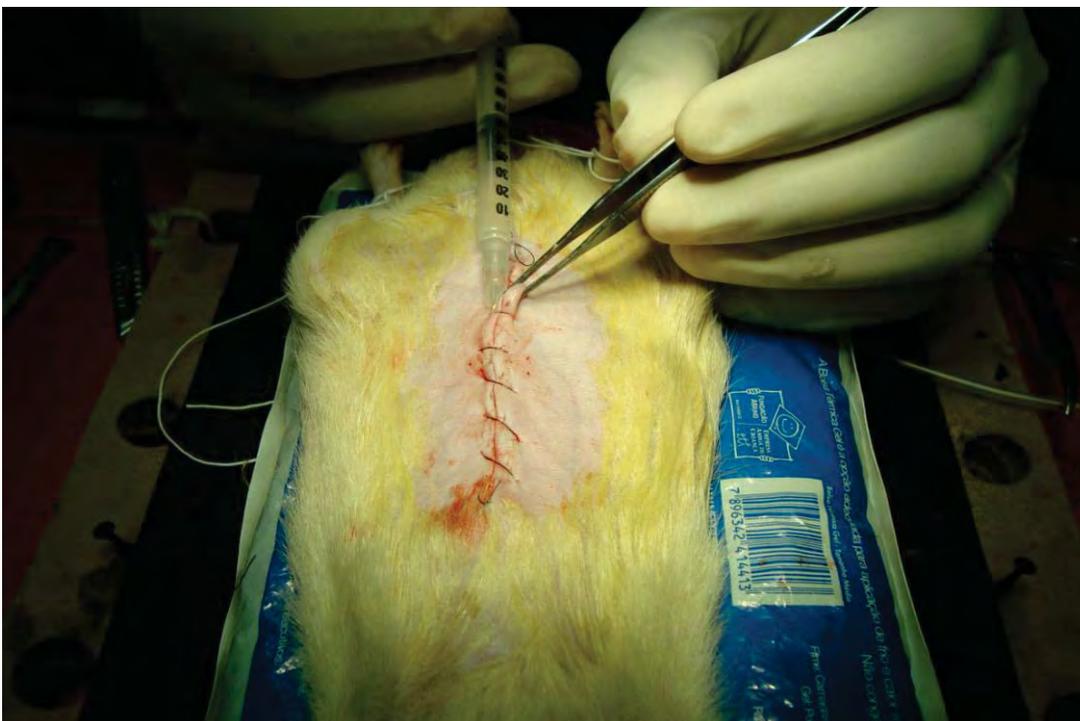


**Fechamento temporário da cavidade abdominal (rim clampeado)**

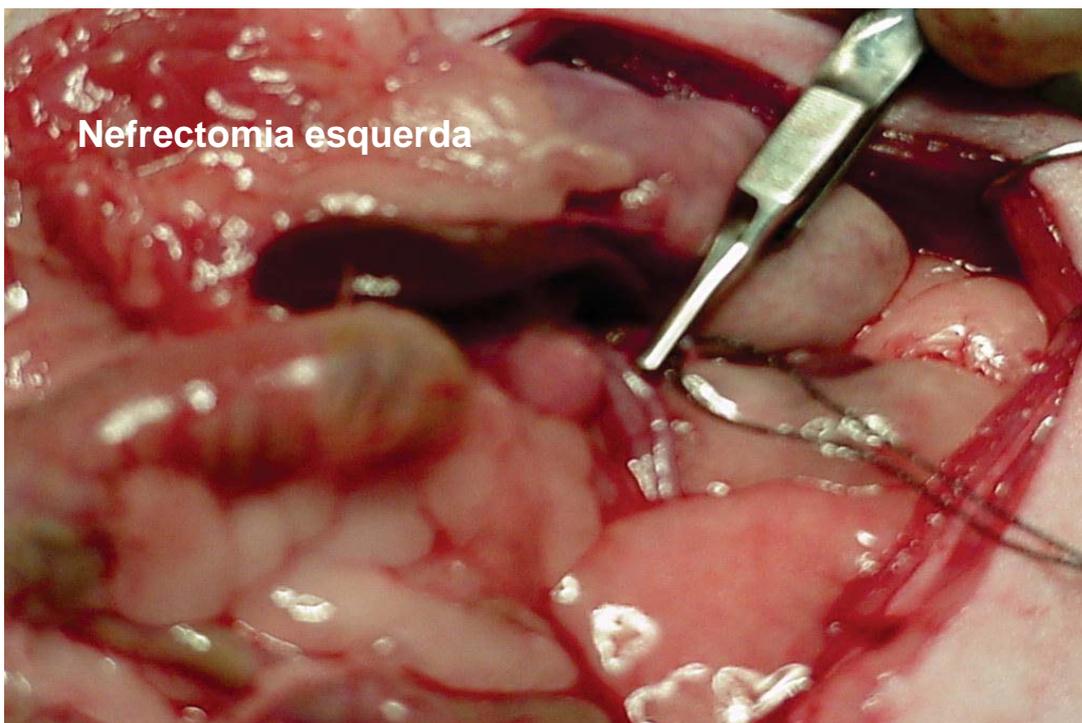
**Coleta de 1 mL de sangue arterial em M1 e M2 (creatinina)**



**M2: coleta de amostra de sangue**



**Fechamento da parede abdominal + anestesia local**



**Nefrectomia esquerda**



**M3: coleta de 2 mL de sangue intracardíaco**

