

Marco Antonio Cardoso de Resende

**Efeitos da cetamina S(+)
em dose subanestésica sobre a função e histologia renal, em modelo de isquemia e reperfusão em ratos**

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

Orientador: Prof^a Titular Norma Sueli Pinheiro Módolo

Botucatu - SP

2013

Dedicatória

“O mais importante e bonito do mundo é isto: que as pessoas não estão sempre iguais, ainda não foram terminadas – mas que elas vão sempre mudando.”

Guimarães Rosa

*À Monique,
por partilhar sonhos e materializar alguns deles.*

*Ao Bruno, Rafael e Murilo,
por serem mais que filhos, eterno aprendiz.*

*Ao meu pai e mãe,
por todo o exemplo de dedicação e trabalho.*

*Ao tio Darcy,
por me ensinar a ler o que não está escrito.*

Agradecimento Especial

“Procure ser um homem de valor em vez de procurar ser um homem de sucesso.”

Albert Einstein

“O nascimento do pensamento é igual ao nascimento de uma criança: tudo começa com um ato de amor. Uma semente há de ser depositada num ventre vazio. E a semente do pensamento é o sonho. Por isso os educadores, antes de serem especialistas em ferramentas do saber, deveriam ser especialistas em amor: intérpretes de sonhos.”

Rubem Alves

À Profª Titular Norma Sueli Pinheiro Módolo

orientadora e mestre que ao longo do tempo desperta e interpreta sonhos com sensibilidade, nesta hercúlea trajetória acadêmica.

A você que confiou em nosso projeto, meu muito obrigado!

Agradecimentos

À UNESP – Universidade Estadual Paulista, por ser instituição de excelência acadêmica.

À FAPESP pelo auxílio financeiro para realização deste projeto, processo FAPESP nº 2012/13606-1.

Aos Professores do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, por todo o aprendizado e ensino ofertado com qualidade.

À Rosângela Martins, pela avaliação estatística do trabalho.

À Prof^a Maria Aparecida Custódio Domingues, pelo estudo histológico das lâminas.

À Neli Aparecida Pavan, Joana Jacirene Costa Teixeira, André Renato Passaroni, Sônia Maria Martins e Silva, Tatiana Pineiz, funcionários do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, que sempre se mostraram acessíveis e inspirados a auxiliar a evolução desse projeto.

A Eduardo Pontes Reis e Thays Donaire Consolo, acadêmicos de Medicina, pelo auxílio na realização da pesquisa.

Ao funcionário do Laboratório Experimental de Anestesiologia, Cristiano Correa de Oliveira, meu muito obrigado.

Aos meus colegas de trabalho e incentivadores nessa jornada, em especial, Prof^a. Elizabeth Vaz da Silva, Prof^a. Ilda Antunes Maldonado Charruff, Prof. Sílvio Ramos Lins, Dr. Alberto Vieira Pantoja, Dra. Patrícia Terra e Dr. Nival Magalhães Júnior, a vitória é também de vocês!

Ao anestesiológico, Bruno Barcellos, mais que curioso, um estudioso sobre variáveis e testes estatísticos.

Aos meus residentes do Hospital Universitário Antônio Pedro, razão para estudar mais e sempre.

A todos que contribuíram para a realização desse projeto.

Resende MAC. Efeitos da cetamina S(+) subanestésica sobre a função e histologia renal, em modelo de isquemia e reperfusão em ratos. Botucatu, 2013. 71p. Tese (Doutorado em Anestesiologia), Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

Justificativa e Objetivo. O pós-condicionamento em modelo de isquemia e reperfusão já mostrou evidências de efeito renoprotetor, mas ainda há alguma controvérsia sobre os protocolos e seus resultados. A administração de cetamina S(+) em dose subanestésica em infusão contínua, como estratégia anti-inflamatória, ainda não foi testada na lesão renal aguda, bem como sua interação com o pós-condicionamento isquêmico não é conhecida. Testamos a hipótese de que a cetamina S(+) atenua o dano tubular e melhora a função renal em ratos sob pós-condicionamento. **Método.** Quarenta e um ratos machos *Wistar* ($\geq 300\text{g}$) foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: GS-Sham; GC-Cetamina S(+) em dose subanestésica em infusão contínua; GP-Pós-condicionamento isquêmico; GCP-Cetamina S(+) em dose subanestésica em infusão contínua e pós-condicionamento. Todos os animais foram submetidos à nefrectomia direita. Nos ratos submetidos ao pós-condicionamento (GP e GCP) foi realizada oclusão da artéria renal esquerda por 30 minutos. A reperfusão plena foi precedida por três ciclos de 2 min de reperfusão, seguido por 2 min de reoclusão. A pressão arterial, a frequência cardíaca e a temperatura foram controladas durante o experimento. A hidratação foi realizada com solução de Ringer lactato em infusão contínua intravenosa ($3,0 \text{ mL.Kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$), além de *bolus* após cada coleta. A função renal foi avaliada pela dosagem plasmática de NGAL, creatinina e ureia em três momentos: C1 (após estabilização), C2 (após 30 min de reperfusão completa) e C3 (após 24h). Dano tubular foi avaliado pela histologia renal. Foram utilizados os critérios de RIFLE e AKIN para avaliação evolutiva da creatinemia entre momentos. **Resultados.** A creatinina e a ureia apresentaram aumento estatisticamente significativo nos grupos com pós-condicionamento isquêmico (GS e GC), mas não a NGAL ($p = 0,08$). Dano tubular significativo foi encontrado apenas nos grupos em que foi realizado pós-condicionamento e não houve diferença significativa entre GP e GCP. Os critérios de RIFLE e AKIN revelaram lesões funcionais semelhantes entre GP e GCP. **Conclusão.** A administração de cetamina S(+) não atenua a lesão tubular ou melhora a função renal neste estudo. Os grupos com pós-condicionamento isquêmico apresentaram resultados idênticos sem efeito renoprotetor.

Palavras-chave: cetamina S(+); isquemia-reperfusão; lesão renal aguda; pós-condicionamento; rato

Resende MAC. Effects of subanesthetic doses of ketamine S(+) on renal function and histology in rats subjected to an ischemia-reperfusion model. Botucatu, 2013. 71p. Thesis (PhD degree in Anesthesiology), Botucatu Medical School, UNESP, Univ. Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

ABSTRACT

Background and objectives. Postconditioning against ischaemia-reperfusion injury has shown renoprotective effects, but there is still some controversy about protocols and its outcomes. The potential application of subanesthetic S(+) ketamine continuous infusion as an antiinflammatory strategy, is not yet available in acute kidney injury, as well as the interaction with ischaemic postconditioning (IP). We tested the hypothesis that it attenuates tubular damage and improves renal function in IP in rats. **Method.** Forty-one male *Wistar* rats (≥ 300 g) were randomized into four groups: GS-sham; GK-subanesthetic S(+) ketamine; GP-posconditioning and GKP-subanesthetic S(+) ketamine and postconditioning. All animals were subjected to right nephrectomy but only in postconditioned rats 30-min left kidney arterial occlusion was performed, in which complete reperfusion were preceded by three cycles of 2 min of reperfusion followed by 2 min of reocclusion. Animals were studied for 24 h. Renal function was assessed by measurement of serum NGAL, creatinine and blood urea nitrogen (BUN) at three moments: C1 (after stabilization), C2 (after 30-min complete reperfusion) and C3 (after 24h). Tubular damage was evaluated by renal histology. RIFLE and AKIN criteria were used to evaluate creatinine among moments. **Results.** Creatinine and BUN significantly increased in IP groups as compared to rats in GS and GK, but not NGAL ($P=0,08$). Despite significant tubular damage found only in IP groups, there was no significant difference between IP and S(+) ketamine/IP. RIFLE and AKIN criteria showed identical functional lesions. **Conclusion.** S(+) ketamine infusion does not attenuate tubular damage or improve renal function. However, IP groups show identical results and postconditioning is unable to show a renoprotective effect in this model.

Key words: S(+) Ketamine, Ischaemia-Reperfusion, Acute Kidney Injury, Postconditioning, Rat

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Critério de RIFLE e Critério de AKIN.....	31
Tabela 2	Grau de lesão tubular renal atribuída aos exames histológicos.....	32
Tabela 3	Valores da média e desvio padrão do peso (kg), segundo o grupo experimental.....	34
Tabela 4	Valores da média e desvio padrão da pressão arterial média (mmHg), segundo grupos e momentos.....	35
Tabela 5	Pressão arterial média, medidas repetidas com um fator de análise de contraste entre grupos.....	36
Tabela 6	Valores da média e desvio padrão da temperatura (°C), segundo grupos e momentos.....	37
Tabela 7	Temperatura, medidas repetidas com um fator de análise de contraste entre grupos.....	38
Tabela 8	Valores da média e desvio padrão da creatinina plasmática (mg.dL ⁻¹), segundo grupos e momentos.....	39
Tabela 9	Creatinina plasmática, medidas repetidas com um fator de análise de contraste entre grupos.....	40
Tabela 10	Valores da média e desvio padrão da ureia plasmática (mg.dL ⁻¹), segundo grupos e momentos.....	41
Tabela 11	Ureia plasmática, medidas repetidas com um fator de análise de contraste entre grupos.....	42
Tabela 12	Valores da média e desvio padrão da NGAL (ng.dL ⁻¹), segundo grupos e momentos.....	43
Tabela 13	NGAL, medidas repetidas com um fator de análise de contraste entre grupos.....	44
Tabela 14	Valores da média e desvio padrão do sódio plasmático (mEq.L ⁻¹), segundo grupos e momentos.....	45
Tabela 15	Sódio plasmático, medidas repetidas com um fator de análise de contraste entre grupos.....	46
Tabela 16	Evolução dos valores de creatinina do grupo GS em diferentes momentos.....	47
Tabela 17	Evolução dos valores de creatinina do grupo GC em diferentes momentos.....	47
Tabela 18	Evolução dos valores de creatinina do grupo GP em diferentes momentos.....	48

Tabela 19	Evolução dos valores de creatinina do grupo GCP em diferentes momentos.....	48
Tabela 20	Mediana 1º e 3º quartis, entre colchetes, referentes à gradação dos exames histológicos segundo os grupos.....	49
Tabela 21	Resultados dos exames histológicos dos rins direito e esquerdo dos grupos.....	68
Tabela 22	Peso (g), temperatura (°C) pressão arterial sistólica (mmHg), pressão arterial diastólica (mmHg) e pressão arterial média (mmHg) dos animais estudados nos diferentes momentos.....	69
Tabela 23	Variáveis bioquímicas (creatinina, NGAL, sódio e ureia) dos animais estudados nos diferentes momentos de coleta.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Isquemia/reperfusão, fenômenos inflamatórios e lesão renal aguda.....	16
Figura 2	Algoritmo experimental utilizado nos grupos.....	27
Figura 3	Rim esquerdo - Grupo Sham (GS), Grau 0 de Park, HE (200x).....	50
Figura 4	Rim esquerdo - Grupo cetamina (GC), Grau 0 de Park, HE (200x).....	50
Figura 5	Rim esquerdo – Grupo pós-condicionamento (GP), Grau 4 de Park, HE (200x).....	51
Figura 6	Rim esquerdo – Grupo cetamina pós-condicionamento (GCP), Grau 5 de Park, HE (200x).....	51
Figura 7	Rim esquerdo – Grupo cetamina pós-condicionamento (GCP), Grau 4 de Park, HE (200x).....	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	PAM ao longo do experimento segundo grupos e momentos	35
Gráfico 2	Temperatura ao longo do experimento segundo grupos e momentos.....	37
Gráfico 3	Creatinina ao longo do experimento segundo grupos e momentos.....	39
Gráfico 4	Ureia plasmática ao longo do experimento segundo grupos e momentos.....	41
Gráfico 5	NGAL (ng.mL ⁻¹) ao longo do experimento segundo grupos e momentos.....	43
Gráfico 6	Sódio (mEq.L ⁻¹) ao longo do experimento segundo grupos e momentos.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LRA	Lesão renal aguda
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
RIFLE	Acrônimo em inglês para critérios de diagnóstico e classificação de lesão renal aguda
AKIN	Do Inglês <i>Acute kidney injury network</i> , critério de diagnóstico e classificação de lesão renal aguda
NGAL	Do inglês <i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
IL	Interleucina
KIM-1	Do Inglês <i>Kidney Injury molecule-1</i>
NAG	N-acetil-glucosaminidase
LFABP	proteína de ligação de ácidos graxos
NTA	Necrose tubular aguda
I / R	Isquemia e reperfusão
NO	Óxido nítrico
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
et al.	colaboradores
UNESP	Universidade Estadual Paulista
NMDA	receptor N-metil-D-aspartato
ANOVA	Análise de variância, técnica estatística
DO₂	Oferta de O ₂

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE GRÁFICOS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVO.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Grupos Experimentais.....	22
3.2 Momentos Estudados.....	23
3.3 Sequência Experimental.....	23
3.4 Sequência de Eventos.....	28
3.5 Atributos Estudados.....	30
3.6 Critérios de RIFLE e AKIN.....	31
3.7 Metodologia Utilizada.....	32
3.8 Análise Histológica.....	32
3.9 Metodologia Estatística.....	33
4 RESULTADOS.....	34
4.1 Peso.....	34
4.2 Pressão Arterial Média (PAM).....	35
4.3 Temperatura (T).....	37
4.4 Creatinina Plasmática (Crp).....	39
4.5 Ureia Plasmática (Up).....	41
4.6 Lipocalina Associada à Gelatinase dos Neutrófilos Dosada no Plasma (NGALp).....	43
4.7 Sódio Plasmático (Nap).....	45
4.8 Critérios de RIFLE e AKIN.....	47
4.9 Avaliação Histológica.....	49
5 DISCUSSÃO.....	53
6 CONCLUSÃO.....	61
7 REFERÊNCIAS.....	62
APÊNDICE.....	68

1 INTRODUÇÃO

O número de pacientes com lesão renal que se submetem a procedimentos anestésicos tem aumentado, em consequência do envelhecimento populacional e maior prevalência de distúrbios degenerativos. A imensa repercussão social e financeira, que envolve o cuidado do paciente cirúrgico com disfunção renal, pode ser modificada pela precocidade no diagnóstico, pelo controle de fatores condicionantes e pela utilização de medidas capazes de prevenir a lesão renal. A redução da morbimortalidade que advém da melhora no tratamento é objetivo comum¹.

A adoção da terminologia lesão renal aguda (LRA) busca uniformizar uma série de definições anteriormente existentes para a insuficiência renal aguda e expõe eventos de maneira dinâmica, compreendendo desde a disfunção sutil até a necessidade de diálise². A LRA é definida como diminuição abrupta na taxa de filtração glomerular com retenção de escórias nitrogenadas, creatinina e ureia. São dois os principais critérios utilizados para definir e classificar a LRA – RIFLE e AKIN. Em 2004, os critérios de RIFLE, acrônimo na língua inglesa para Risco (**R**isk), Lesão (**I**njury), Falência de função (**F**ailure), Perda de função (**L**oss) e a doença renal terminal (**E**nd stage) foram elaborados na tentativa de relacionar a diminuição da taxa de filtração glomerular (aumento da creatinina sérica em relação ao valor basal) e a diminuição do débito urinário com o desfecho clínico, portanto com a gravidade da lesão renal³. O critério de AKIN, de 2007, manteve os parâmetros – creatinina e débito urinário – mas define três estágios apenas e com a exceção de um aumento de 0,3 mg/dL no valor absoluto de creatinina no estágio 1, é semelhante aos estágios iniciais do critério de RIFLE⁴. (Tabela 1) Quando comparados, o critério de AKIN não melhora a sensibilidade e capacidade preventiva do RIFLE, em definir e classificar a LRA nas primeiras 24 horas após internação em Unidade de Terapia Intensiva (UTI)⁵.

A LRA pode ocorrer em até 7% dos pacientes hospitalizados e 25% dos internados em UTIs⁶, nos quais a hipoperfusão renal, a sepsis, a síndrome da resposta inflamatória sistêmica e a nefrotoxicidade direta são os principais fatores encontrados⁷. A idade, a hipertensão arterial pré-existente, o diabetes melito, a insuficiência cardíaca e as cirurgias complexas e longas são apontados como fatores de risco adicionais em estudos epidemiológicos, principalmente quando cirurgias cardiotorácicas e administração de contraste estão envolvidos^{8,9}.

A busca por biomarcadores que auxiliem o diagnóstico precoce e também alterem o prognóstico da LRA é recorrente. A creatinina considerada como padrão ouro utilizada para o diagnóstico de lesão não é o biomarcador mais fidedigno para análise durante alterações agudas de função renal. Os valores de creatinina podem permanecer inalterados até que 50% da função tenha sido perdida. A secreção tubular de creatinina pode superestimar a função durante o processo de filtração glomerular. Além disso, outros fatores como a idade, o gênero, a hidratação, a massa e o metabolismo muscular interferem com os níveis plasmáticos de creatinina. Para diagnóstico, os biomarcadores renais mais recentes têm mostrado melhor desempenho, quando o tempo para ocorrência e a natureza da lesão são conhecidos, sendo determinados mais pelo contexto geral de doença concomitante em curso do que pela especificidade da lesão renal¹⁰. A lipocalina associada com a gelatinase dos neutrófilos (NGAL), tanto no plasma como na urina, surge como preditor sensível de disfunção renal e tem sua expressão induzida pela lesão epitelial. Em modelos animais, após lesão renal isquêmica ou nefrotóxica, a NGAL apresentou aumento precoce e marcante^{11,12}. Em pacientes pediátricos, níveis plasmáticos e urinários de NGAL apresentaram aumento em cirurgia cardíaca, igual ou superior a dez vezes o valor basal entre duas e seis horas de pós-operatório, com posterior desenvolvimento de lesão renal aguda¹³. Outros biomarcadores como a interleucina 6 (IL-6), a interleucina 8 (IL-8), a interleucina 18 (IL-18), a molécula 1 de lesão renal 1 (KIM-1), a cistatina C, a n-acetil-glicosaminidase (NAG) e a proteína de ligação de ácidos graxos (LFABP)

têm sido utilizados para diagnóstico¹⁰. A incidência de LRA, no entanto, continua a aumentar, apesar da melhora a curto prazo nas taxas de mortalidade, o que torna a habilidade de reconhecer e tratar o problema ainda um desafio¹⁴.

Do ponto de vista etiológico, o rim insuficiente continua a ser entendido como pré-renal, renal e pós-renal. No contexto perioperatório e em pacientes críticos, a necrose tubular aguda (NTA) isquêmica ou tóxica é a causa mais comum de lesão renal aguda, na maioria das vezes por componente pré-renal, hipovolemia subjacente.

Para o desenvolvimento de NTA concorrem lesões microvasculares e tubulares, sendo que respostas inflamatórias induzidas por isquemia e reperfusão (I/R) têm papel preponderante^{15,16}.

À inflamação é creditada em grande parte a fisiopatologia da lesão renal, cuja agressão celular inicial promove alterações morfológicas e funcionais no endotélio vascular e/ou epitélio tubular. Na LRA isquêmica, as lesões celulares por hipóxia ocorrem inicialmente com formação de metabólitos citotóxicos em meio que se tornou anaeróbico, mas a reperfusão, essencial para a sobrevivência ao impedir o dano irreversível, pode também promover dano com restauração por vezes não uniforme de fluxo, lesão tecidual por espécies reativas de oxigênio (ROS) e edema. As respostas inflamatórias em modelos de I/R ocorrem por migração leucocitária, que inclui macrófagos, neutrófilos, células natural killer (nk), linfócitos e formação de infiltrado na lesão renal, com geração de mediadores como citocinas e quimocinas pelas células endoteliais e tubulares, adesão celular e aumento da permeabilidade vascular, além de outros componentes imunológicos como plaquetas e o sistema complemento^{17,18}. A figura 1 apresenta vários fenômenos secundários ao evento de isquemia e reperfusão, que concorrem para LRA.

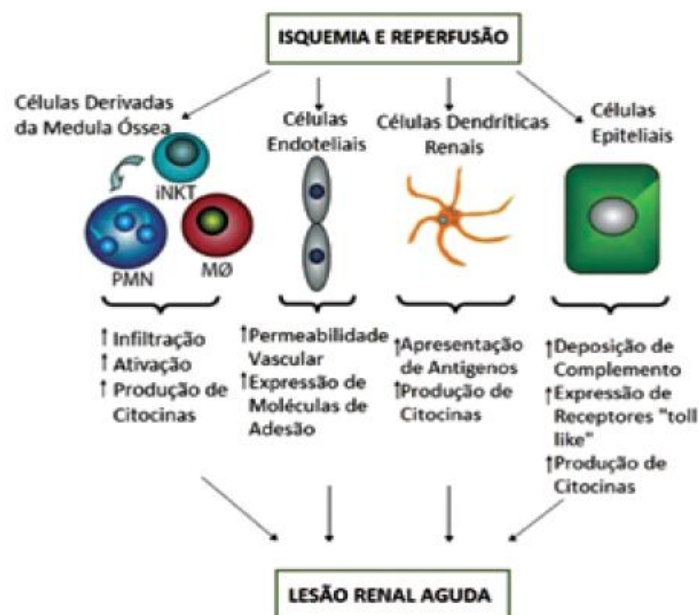


Figura 1 – Isquemia e reperfusão, fenômenos inflamatórios e lesão renal aguda. Adaptada de Kinsey et al. 2008¹⁸.

A perda da integridade celular do endotélio vascular e a hiperexpressão de moléculas de adesão, como a molécula 1 de adesão intracelular (ICAM-1) e a selectina-P, facilitam a interface endotélio-leucocitária, ponto de recrutamento de mais células. Entretanto, prejudicam a manutenção de fluxo sanguíneo, provavelmente pela liberação de radicais de oxigênio^{19,20}. Pode haver piora do dano isquêmico por atividade vasoconstritora de prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, ou ainda por liberação de endotelina ou diminuição de produção de óxido nítrico (NO)²¹. A homeostase da função renal após lesão é complexa e mantida por meio de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. A IL-6 é a citocina pró-inflamatória que tem sido relacionada como mediadora do processo disfuncional isquêmico, enquanto a IL-10 age com potente efeito anti-inflamatório sobre vias relacionadas com a LRA isquêmica ou induzida por cisplatina, sendo esta última responsável por aumento na síntese de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Tal fator é liberado também por células dendríticas renais, cuja principal função é induzir respostas imunes de adaptação intermediadas por linfócitos T. O pré-tratamento com inibidor de IL-18 em ratos tem efeito protetor renal e aqueles com deficiência em IL-18 estão protegidos contra a LRA isquêmica¹⁷.

Para que o quadro de injúria promovido, que pode provocar apoptose e morte celular por isquemia e mesmo durante reperfusão renal, possa ser revertido há necessidade de reestruturação epitelial. O epitélio é dotado de mecanismo no qual a migração de células sobreviventes, a desdiferenciação, a proliferação e a diferenciação celular normalmente estão presentes ²².

O fenômeno de pré-condicionamento isquêmico, descrito originalmente com quatro ciclos de cinco minutos alternados de I/R coronária em cães, antes de isquemia de quarenta minutos, revelou diminuição da área de infarto ²³. Há evidências também em outros órgãos, nos quais a partir de períodos de insulto isquêmico há proteção conferida contra nova isquemia subsequente ²⁴⁻²⁶. Wever et al.²⁷ ao estudarem em revisão sistemática com meta-análise o pré-condicionamento isquêmico renal, em modelo animal, confirmaram efeito renoprotetor com diminuição das dosagens plasmáticas de creatinina e ureia e menor dano histológico. A análise de subgrupos identificou algumas variáveis que podem modificar os resultados e comprometer a eficácia do pré-condicionamento em modelo de isquemia e reperfusão: a janela de proteção – precoce ou tardia; a espécie e o gênero dos animais; o tipo de protocolo e o local do pré-condicionamento ²⁷. Em 2003, Zhao et al.²⁸, também em modelo em cães, defenderam a estratégia de pós-condicionamento como eficaz na redução da lesão de I/R, pois ciclos breves e alternados de isquemia e reperfusão, antes da reperfusão plena, diminuiriam a extensão do infarto miocárdico. O efeito protetor seria comparável ao exercido pelo pré-condicionamento isquêmico, com a diferença de que o estímulo inibidor de lesão não teria o seu momento antes da isquemia (Pré), mas sim antes da reperfusão e após isquemia (Pós), a forma inicialmente gradual de reperfusão poderia atenuar a própria lesão da reperfusão.

Na tentativa de obter uma alternativa farmacológica aos efeitos da isquemia com relação ao pré-condicionamento, foram estudados diferentes fármacos que poderiam demonstrar atividade renoprotetora, como a observada com a anestesia inalatória na proteção miocárdica ²⁹. Anestésicos voláteis ^{30,31}, agonistas opioides ^{32,33}, doadores de óxido nítrico (nitroglicerina) ³⁴, eritropoietina

e análogos^{35,36}, além de outros agentes^{37,38}, têm sido capazes de mimetizar o pré-condicionamento isquêmico, ainda com expectativas sobre o cenário ideal e dentro de qual lógica ocorreria proteção renal. Por mecanismos ainda não completamente elucidados quanto a sua proteção, o rim é submetido a desdiferenciação celular pós-isquêmica, por meio de proteínas protetoras e células menos propensas à isquemia com implicação maior de cinases e proteína G e menor ativação de canais de potássio ATP-dependentes, estes últimos de importância relevante no pré-condicionamento miocárdico por anestésicos voláteis²⁹. A disfunção mitocondrial, evento primário durante lesão de I/R, causa desestruturação do citoesqueleto de actina por ser dependente das reservas de ATP e prejudica a adesão celular. Entretanto, o rim pode regenerar-se eficientemente mesmo após perda da integridade celular, que condiciona exfoliação celular epitelial e rearranjo de junções. Entre as proteínas cinases – p38, c-JunNH₂ e a cinase extracelular (ERK) - que são ativadas no modelo de I/R, a ativação de ERK durante o processo pode ter importância na dinâmica de reestruturação de adesões focais em associação com a fosforilação de tirosina e proteínas sinalizadoras³⁹.

A cetamina, um derivado da fenciclidina, com pouco mais de 50 anos de utilização, tem seus efeitos tanto anestésicos como analgésicos, mediados principalmente pelo antagonismo não competitivo sobre receptores NMDA (N-metil-D-aspartato). Outros mecanismos relacionados envolvem a diminuição da liberação pré-sináptica de glutamato, a atuação em receptores opioides μ (mu) e κ (kappa), além de antagonismo sobre receptores monoaminérgicos, nicotínicos e colinérgicos⁴⁰. O sistema talamoneocortical e vias de condução podem ser deprimidos de maneira seletiva, antes de áreas mais antigas no cérebro, com ativação dos sistemas reticular e límbico. A mistura racêmica original foi manipulada e o enantiômero S(+) revelou afinidade três a quatro vezes maior pelo receptor do NMDA, que a forma R(-). A cetamina S(+) tem ação simpaticomimética menor do que a observada com a cetamina racêmica, bem como é menos alucinógena e tem recuperação mais precoce, além de possuir maior potência analgésica e anestésica⁴¹.

A atividade anti-inflamatória da cetamina parece estar relacionada com a inibição da formação de precursor de citocina, do fator nuclear de amplificação de cadeia leve Kappa de células B ativadas (NF- κ B). Experimentalmente, a cetamina demonstrou atividade supressora sobre a produção de TNF- α induzida por endotoxemia⁴². Kawasaki et al.⁴³ comprovaram ação inibitória sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias no sangue humano *in vitro*. A concentração plasmática necessária para ação analgésica e anti-inflamatória é menor do que aquela encontrada para fins anestésicos, em que efeitos psicomiméticos são observados⁴⁴. Em cirurgia cardíaca, o emprego de doses baixas de cetamina (0,2 mg.kg⁻¹) em associação com anestesia geral, em estudo aleatório, duplamente encoberto e prospectivo, já havia revelado atenuação da resposta de IL-6 durante e após procedimento. Neste modelo, tal citocina era considerada como preditor de disfunção orgânica e morte⁴⁵. A adição de pequenas doses de cetamina antes da indução⁴⁶ ou a infusão contínua de cetamina S(+)⁴⁷ diminuem a resposta de citocinas pró-inflamatórias durante e após cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea (CEC). Os efeitos benéficos da cetamina que advêm de funções imunomoduladoras sobre a resposta sistêmica inflamatória em cirurgia de revascularização do miocárdio com CEC, no qual um mecanismo de I/R está envolvido, também têm potencial de ocorrência em cirurgias não cardíacas. Contudo, foi comprovado por Molojavyi et al.⁴⁸ que a cetamina racêmica bloqueia os efeitos cardioprotetores que ocorrem no pré-condicionamento isquêmico em ratos, fato determinado pelo isômero R(-). Mullenheim et al.⁴⁹ não evidenciaram interferência da cetamina S(+) sobre o pré-condicionamento cardíaco em coelhos, mas confirmaram o bloqueio da cardioproteção com *bolus* único de cetamina racêmica *in vivo*.

No rim, alterações histológicas secundárias à grave isquemia perioperatória são marcadamente definidas por necrose tubular aguda com hemorragia. Piora do dano histológico, com escores mais altos para lesão tubular, já foi atribuído ao uso de cetamina S(+) em ratos, associado a níveis mais altos de catecolaminas⁵⁰.

Portanto, a hipótese deste estudo é que a dose subanestésica da cetamina S(+) em infusão contínua pode minimizar a ação simpaticomimética e ter ação anti-inflamatória na avaliação da função e histologia renais.

Na literatura pesquisada não encontramos, até o momento, a utilização de cetamina em dose subanestésica visando à atenuação das lesões desencadeadas por I/R com pós-condicionamento em modelo utilizando ratos.

2 OBJETIVO

O objetivo desta pesquisa foi analisar o efeito de doses subanestésicas de cetamina S(+) sobre a histologia e a função renais, por meio da dosagem plasmática da NGAL, da ureia e da creatinina e aplicação dos critérios de AKIN e RIFLE, em ratos submetidos à isquemia e reperfusão com pós-condicionamento, sob anestesia com isoflurano.

3 MATERIAL E MÉTODO

Após a aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo 946/2012) da Faculdade de Medicina de Botucatu, foram incluídos no estudo 41 ratos *Wistar (Rattus norvegicus albinus)*, machos, com peso entre 300 e 500g, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

O experimento foi realizado no Laboratório Experimental de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos e alocados aleatoriamente em quatro grupos experimentais. Todos foram induzidos por via inalatória com isoflurano em concentração inspirada de 4% e fluxo de oxigênio de 3 a 4 litros por minuto durante 5 minutos e mantidos conforme o grupo pertencente como descrito a seguir:

- **Grupo GS (Sham):** manutenção da anestesia com isoflurano em concentrações inspiradas entre 1% a 3% e submetidos à laparotomia mediana e nefrectomia direita (n=10).
- **Grupo GC (Cetamina):** manutenção da anestesia com isoflurano em concentrações inspiradas entre 1% a 3% e cetamina S(+), 1,25 mg.kg⁻¹.h⁻¹, em infusão contínua em bomba de infusão e submetidos à laparotomia mediana e nefrectomia direita (n=10).
- **Grupo GP (Pós-condicionamento):** manutenção da anestesia com isoflurano em concentrações inspiradas entre 1% a 3% submetidos à laparotomia mediana e nefrectomia direita. Os animais deste grupo foram submetidos a clampeamento da artéria renal esquerda por 30 minutos e, antes da soltura definitiva do clampe atraumático, à manobra de pós-condicionamento, que

consistiu em três ciclos de isquemia por 2 minutos e reperfusão por 2 minutos. A seguir, reperfusão plena por 30 minutos (n=10).

- **Grupo GCP (Cetamina e Pós-condicionamento):** manutenção da anestesia com isoflurano em concentrações inspiradas entre 1% a 3% e cetamina S(+), $1,25 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$, em infusão contínua em bomba de infusão, submetidos à laparotomia mediana e nefretomia direita. Os animais deste grupo foram submetidos a clampeamento da artéria renal esquerda por 30 minutos e, antes da soltura definitiva do clampe atraumático, a manobra de pós-condicionamento que consistiu em três ciclos de isquemia por 2 minutos e reperfusão por 2 minutos. A seguir, reperfusão plena por 30 minutos (n=11)

3.2 MOMENTOS ESTUDADOS

- **Momento 1 (M1):** após 10 minutos de estabilização que se seguiram à cateterização arterial e venosa. Neste momento foi realizada a primeira coleta de sangue (C1) para as dosagens laboratoriais.
- **Momento 2 (M2):** imediatamente antes da liberação do clampe da artéria renal esquerda nos grupos GP e GCP e obedecido este mesmo tempo nos grupos sem isquemia (GS e GC).
- **Momento 3 (M3):** após 30 minutos de reperfusão renal. Neste momento realizou-se a segunda coleta de sangue (C2) para as dosagens laboratoriais.

Após 24 horas do experimento, realizou-se a terceira coleta de sangue (C3) para as dosagens laboratoriais.

3.3 SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL

Após pesagem, os ratos foram disponibilizados em campânula de material acrílico inerte, transparente e com volume adequado (3 a 4L), apropriado para indução inalatória de animais de pequeno porte. O fluxo de gases frescos foi administrado por meio de orifício superior, enquanto orifício na porção inferior contribuía para a exalação de gases. A indução anestésica inalatória foi iniciada com isoflurano, em concentração inspirada de 4% e fluxo de oxigênio de três a quatro litros por minuto, durante cinco minutos. Após este tempo, com sinais de narcose apropriada para manipulação, o animal foi retirado da campânula e uma máscara adaptada ao seu focinho.

Os animais foram mantidos com anestesia inalatória sob máscara, em ventilação espontânea, frequência respiratória aproximada de 60 incursões por minuto. O isoflurano, em sistema sem absorvedor de CO₂, foi administrado em vaporizador calibrado Isotec 5 Ohmeda, com fração inspirada de oxigênio de 100%. A titulação inalatória em concentrações menores, que variaram de 1,5% a 3,0%, ao longo do procedimento, foram modificadas a partir da reação dos animais ou alterações na pressão arterial média. A adequação da anestesia foi aferida por teste algico cutâneo em topografia abdominal e ausência de tremores.

Para cateterismo, após incisão transversal na região cervical dos animais sob anestesia local, com 0,3 mL de bupivacaína 0,125% e dissecação da veia jugular interna direita e artéria carótida esquerda, foram utilizados cateteres *venocaths* 24G. A bomba Anne[®] (ABBOTT Laboratórios do Brasil Ltda.) foi empregada para infusão de solução de hidratação com 3,0 mL.Kg⁻¹.h⁻¹ de Ringer lactato em todos os grupos, imediatamente após obtenção da punção jugular, no momento seguinte à indução inalatória de cinco minutos, e infusão contínua de cetamina S(+), 1,25 mg.kg⁻¹.h⁻¹, apenas nos grupos GC e GCP.

Foi utilizado monitor Datex-Engstrom para detecção contínua dos parâmetros fisiológicos. A canulação carotídea esquerda permitiu a visualização da frequência de pulso carotídeo e pressão arterial invasiva (PAI).

A frequência de pulso apresentada pelo monitor como maior que 250 batimentos por minuto por limitações do próprio aparelho, dado que a frequência cardíaca normal dos ratos é superior a 300 bpm. A temperatura retal foi monitorada e mantida entre 37°C e 38°C com bolsas térmicas (Bolsa térmica Gel - Body Care - Mercur®).

Cada animal teve registro de atributos de monitorização em fichas individuais em três momentos, (pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e pressão arterial média, frequência cardíaca e temperatura retal) e de atributos bioquímicos dosados (NGAL, creatinina, ureia e sódio), obtidos pela retirada de 2,0 mL de sangue da carótida esquerda. Cada retirada de sangue foi acompanhada de infusão de *bolus* de 4 mL de Ringer lactato.

O cálculo da dose de cetamina S(+) foi realizado segundo fórmula experimental preconizada pelo *FDA (Food and Drug Administration) – Guidance for Industry- Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers*.⁵¹ Esta fórmula converte a dose em ratos (DR) a partir da dose equivalente em humanos (DEH), tanto em mg.kg^{-1} quanto $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e leva em consideração as diferenças de superfície corpórea total. A dose a ser empregada, já convertida, para infusão contínua foi de $1,25 \text{ mg.kg}^{-1} .\text{h}^{-1}$.

FÓRMULA: $\text{DEH} = \text{DR} \times 0,16$

Após estabilização de 10 minutos, o grupo cetamina S(+) e o grupo GCP tiveram a infusão do fármaco iniciada por 15 minutos, antes da laparotomia para nefrectomia direita. Para prevenir a compensação renal pelo rim não submetido à isquemia, foi realizada nefrectomia direita em todos os grupos, conforme método modificado proposto por Dobashi⁵², sendo os tempos nos grupos sem isquemia (GS e GC) replicados de maneira a manter a similaridade para o tempo total do procedimento. Os animais dos grupos GP e GCP tiveram clampeamento da artéria renal esquerda por 30 minutos e três ciclos de reperfusão, por dois minutos, e isquemia, também por dois minutos, totalizando 12 minutos, para promoção de pós-condicionamento, seguido de reperfusão plena por 30 minutos.

Foi utilizado o clipe temporário de Schwartz (Rs-5452, Roboz) para clampeamento arterial atraumático.

O tempo para primeiro momento de registro dos dados de monitorização (M1) e primeira coleta de sangue arterial para análise (C1) ocorreu após estabilização de 10 minutos, quando então era iniciada a infusão de cetamina S(+) nos grupos já nomeados. Foi realizada abertura da cavidade abdominal, sob infiltração cutânea com 0,7 mL de bupivacaína 0,125%, para nefrectomia direita e clampeamento temporário da artéria renal esquerda apenas nos grupos GP e GCP, com isquemia renal mantida por 30 minutos. Nos animais do GS e GC, o rim esquerdo não foi submetido a eventos de isquemia. Cada animal teve seu abdome fechado por sutura contínua.

Após este período e imediatamente antes da liberação da artéria renal esquerda nos grupos GP e GCP, ou no mesmo tempo replicado nos grupos sem isquemia (GS e GC), era realizado novo registro para monitorização (M2). Uma nova amostra de sangue arterial era colhida apenas (C2) após o intervalo para reperfusão plena do órgão, logo a seguir o registro de nova monitorização (M3). Após fechamento da parede abdominal, o rato foi despertado e encaminhado a container climatizado, no qual permaneceu por 24 horas, com livre acesso à água e alimentação.

Vinte e quatro horas após, os animais foram submetidos à laparotomia sob anestesia com oxigênio e isoflurano, utilizando-se a mesma técnica. A nefrectomia esquerda foi realizada e colhida a terceira amostra de sangue arterial (C3), diretamente do coração do animal, sendo este imediatamente sacrificado com injeção intracardíaca de bupivacaína.

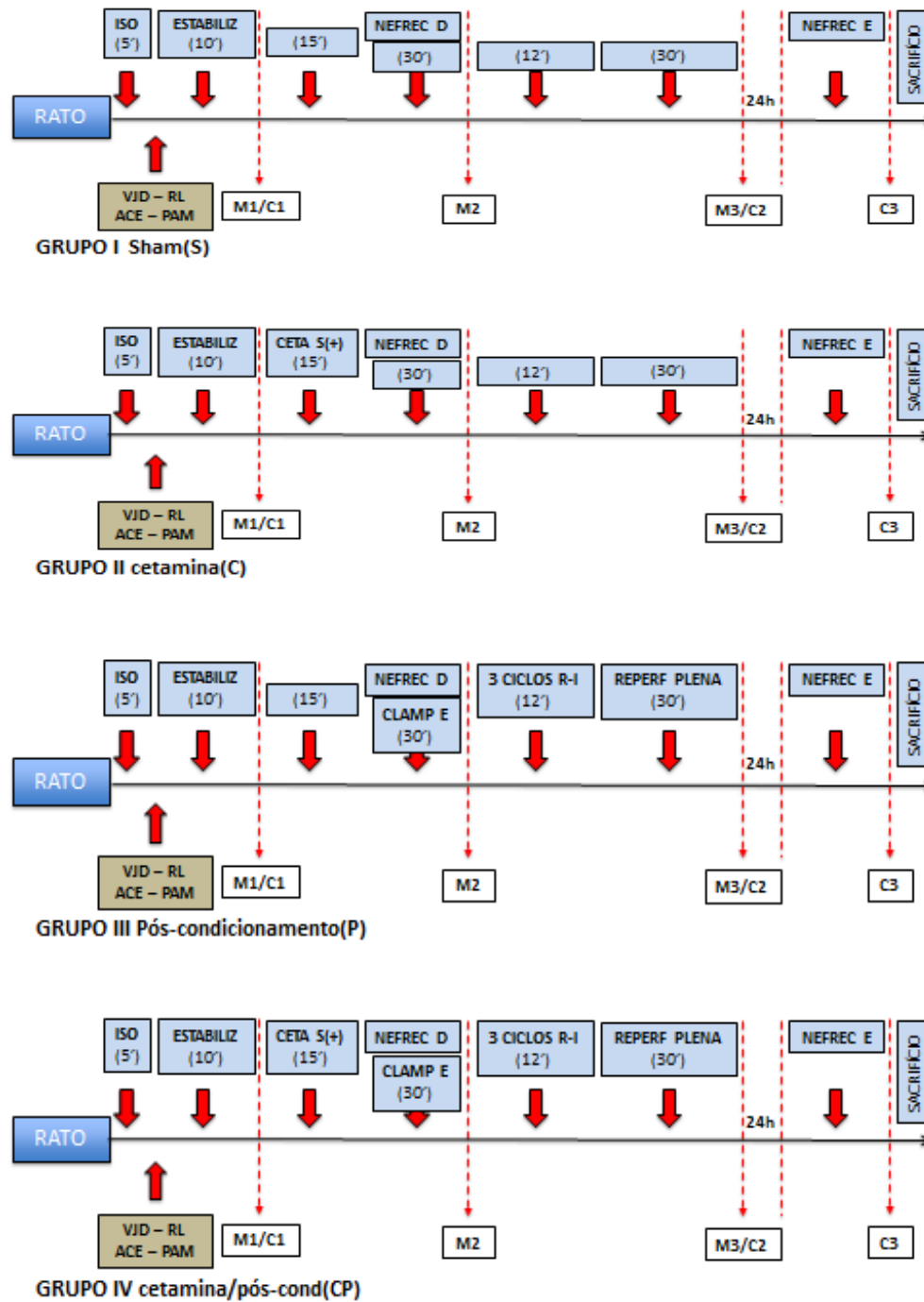


Figura 2 - Algoritmo experimental utilizado nos grupos.

3.4 SEQUÊNCIA DE EVENTOS

1. Os animais tiveram livre acesso à água e alimentos.
2. Foram pesados imediatamente antes do início do experimento.
3. Todos os cálculos relativos às soluções foram feitos e as soluções preparadas.
4. Os animais foram anestesiados em um recipiente específico com isoflurano a 4% e oxigênio a 100%.
5. Colocação de bolsas aquecidas para manutenção da temperatura retal em 37-38°C.
6. Ventilação espontânea com fração inspirada de oxigênio de 100% e isoflurano com concentração variando de 1,5% a 3% em máscara facial.
7. Colocação do termômetro retal.
8. Infiltração com bupivacaína 0,125% sem vasoconstritor de região cervical do animal para dissecação e cateterismo da veia jugular interna direita, para infusão contínua de solução de hidratação e cetamina S(+) em bomba.
9. Iniciada infusão venosa de Ringer lactato a $3,0 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$, para a reposição de perdas de fluidos.
10. Dissecação e cateterismo da artéria carótida esquerda para monitorização da pressão arterial e coleta de amostras de sangue.
11. Avaliação da estabilidade hemodinâmica
12. Coleta dos seguintes dados de monitoração: pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média, frequência cardíaca e temperatura retal (M1).
13. Coleta de 2,0 mL de sangue de carótida esquerda para as dosagens de NGAL, creatinina, ureia e sódio (C1). Reposição com *bolus* de 4,0 mL de solução de Ringer lactato.

14. Início da infusão contínua de cetamina S(+) por 15 minutos.
15. Infiltração de pele para laparotomia com bupivacaína 0,125% sem vasoconstritor, visando analgesia.
16. Laparotomia com nefrectomia à direita.
17. Clampeamento da artéria renal esquerda por período de 30 minutos, nos dois grupos com isquemia. Nos grupos sem isquemia, tempo igual será contabilizado. A infusão de cetamina nos grupos GC e GCP.
18. Após os 30 minutos, nos grupos com ou sem isquemia, imediatamente antes da liberação da artéria renal esquerda e foram registrados novos dados de monitorização (M2).
19. Desclameamento com pós-condicionamento, períodos de reperfusão-isquemia em três ciclos, com quatro minutos cada (2', 2', respectivamente), totalizando 12 minutos. Nos grupos sem isquemia foi contabilizado o mesmo tempo.
20. Reperusão plena de artéria renal por 30 minutos. Nos grupos sem isquemia, tempo igual foi contabilizado.
21. Registro dos dados de monitorização (M3).
22. Coleta da segunda amostra de sangue da carótida esquerda para dosagem plasmática de NGAL, creatinina, ureia e sódio (C2). A retirada foi acompanhada de infusão em *bolus* de 4,0 mL de Ringer lactato.
23. Avaliação da estabilidade hemodinâmica.
24. Realizado o fechamento da parede abdominal.
25. Realizada a retirada dos cateteres venoso e arterial.
26. Fechada a incisão cervical.
27. Foi descontinuado o anestésico inalatório.
28. Aguardou-se a recuperação do animal até o despertar.
29. O animal foi mantido em gaiola climatizada, com alimentação e livre

acesso à água por 24 horas.

30. Após 24 horas os animais foram novamente anestesiados em recipiente específico com isoflurano a 4% e oxigênio a 100%.
31. Realizada a nefrectomia esquerda.
32. Coleta de 2,0 mL de sangue intracardíaco para as dosagens de NGAL, creatinina, ureia e sódio (C3).
33. Realizado o sacrifício do animal com sobredose de bupivacaína 0,5% por via intracardíaca, na dose de 3 mg.kg^{-1} sem vasoconstritor.

3.5 ATRIBUTOS ESTUDADOS

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

- Pressão arterial média (PAM)
- Frequência de pulso carotídeo
- Temperatura retal
- Dosagem plasmática de NGAL
- Dosagem plasmática de creatinina
- Dosagem plasmática de ureia
- Dosagem plasmática de sódio
- Critérios de RIFLE e AKIN

3.6 CRITÉRIOS DE RIFLE E AKIN

A creatinina nos grupos GP e GCP foi avaliada em termos de variação de porcentagem entre os valores basais encontrados (C1) e a evolução da coleta em outros momentos C1-C2 e C1-C3. A partir desta variação foram utilizados os critérios de RIFLE e AKIN para classificar o grau de lesão. A tabela 1 apresenta os graus de lesão ou estágios correspondentes e a relação do aumento dos valores basais.

Tabela 1 - Critério de RIFLE³ e Critério de AKIN⁴

GRAU RIFLE	RFG/ Creatinina plasmática	Débito urinário	GRAU AKIN	Creatinina plasmática	Débito urinário
Risk	↓ > 25% Cr (1.5x) ↑	<0.5mL.kg ⁻¹ .h ⁻¹ 6h	Estágio 1	↑0,3mg/dL ou ↑1,5-1,9x basal	<0.5mL.kg ⁻¹ .h ⁻¹ 6h
Injury	↓ >50% Cr (2.0x) ↑	<0.5mL.kg ⁻¹ .h ⁻¹ 12h	Estágio 2	↑2-2,9x basal	<0.5mL.kg ⁻¹ .h ⁻¹ 12h
Failure	↓ >75% Cr (3.0x) ↑	<0.3mL.kg ⁻¹ .h ⁻¹ 24h ou anúria ≥ 12h	Estágio 3	↑ ≥ 3x basal	<0.3mL.kg ⁻¹ .h ⁻¹ 24h ou anúria ≥ 12h
Loss	LRA persistente	>4 sem			
End	Perda completa	>3 meses			

3.7 METODOLOGIA UTILIZADA

Para as dosagens de ureia, creatinina e NGAL foram utilizados reagentes da marca EBRAM e o equipamento para análise foi o COBAS MIRA PLUS (automático). Para as dosagens de sódio foram utilizados reagentes CELM, processados no Fotometro de Chama e para a NGALp foi utilizada a metodologia Elisa e empregados kits padrão da Bioporto.

3.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os rins foram submetidos à análise histológica. Depois de retirados, foram seccionados longitudinalmente e armazenados em frascos separados. Foram mantidos em solução de *Duboscq-Brasil* durante as primeiras 48 horas, sendo, a seguir, conservados em álcool a 70% e encaminhados ao laboratório de anatomia-patológica. A solução de *Duboscq-Brasil* foi preparada com 6 mL de formol a 40%, 12 mL de álcool absoluto, 1,5 mL de ácido acético e 8 mL de ácido pícrico. As secções histológicas, coradas em hematoxilina-eosina, foram avaliadas pela microscopia ótica. Utilizou-se graduação, como descrita por Park et al., para análise morfológica da gravidade da lesão celular tubular - que considera negativo ou zero a ausência de lesão, e outros graus ascendentes em escore até cinco (5) - com equivalência para porcentagem de necrose tubular.

Tabela 2 - Grau de lesão tubular renal atribuída aos exames histológicos

GRAU	TIPO	% DA LESÃO (NECROSE)
0	Sem lesão	-
1	Leve	< 10%
2	Moderada	10 a 25%
3	Moderada a grave	25 a 50%
4	Grave	50 a 75%
5	Muito grave	➤ 75 %

Adaptado de Park et al. ⁵³

A análise histológica foi realizada por uma única patologista, que desconhecia os grupos de origem estudados.

3.9 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

O tamanho da amostra do estudo foi calculado levando em consideração outros trabalhos da mesma linha de pesquisa, em que nove animais, no mínimo, eram disponibilizados por grupo.

A análise descritiva foi apresentada sob a forma de tabelas e os dados observados expressos pela média, desvio padrão e mediana e por gráficos ilustrativos.

A análise inferencial foi composta pelos seguintes métodos:

- a ANOVA para medidas repetidas e análise de contrastes foram usadas para avaliar o comportamento das variáveis bioquímicas e de monitorização ao longo de três momentos no interior de cada grupo experimental;
- a ANOVA para medidas repetidas com um fator e análise de contrastes foram realizadas para verificar se a evolução das variáveis foi diferenciada entre os grupos (efeito da interação); e
- a ANOVA de Kruskal-Wallis (não paramétrica) foi aplicada para comparação do peso entre os quatro grupos, e o teste de Mann-Whitney para comparação do grau de lesão histológica entre dois grupos experimentais.

Foi aplicada a transformação logarítmica (log natural) nos dados para análise longitudinal (ANOVA para medidas repetidas), devido à falta de normalidade na distribuição (distribuição Gaussiana) das variáveis nos grupos estudados.

O critério de determinação de significância adotado foi o nível de 5%. A análise estatística foi processada pelo *software* SAS 6.11 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

4 RESULTADOS

4.1 PESO

Tabela 3 - Valores da média e desvio padrão (DP) do peso (kg), segundo o grupo experimental e o correspondente nível descritivo (p)

Grupo	n	Média ± DP
GS	10	401,0 ± 64,2
GC	10	435,0 ± 55,4
GP	10	414,0 ± 44,8
GCP	11	431,8 ± 44,2
Total	41	420,7 ± 52,5

p = 0,43

Comentário: não existe diferença significativa no peso entre os grupos experimentais (p=0,43).

4.2 PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM)

Tabela 4 - Valores da média e desvio padrão da pressão arterial média (mmHg) segundo grupos e momentos

Grupos	M1 Média ± DP	M2 Média ± DP	M3 Média ± DP	Valores de p	Análise de Contrastes
GS	101,1 ± 12,9	84,4 ± 18,8	81,6 ± 17,8	0,025	M1 > M3, M2 é intermediário
GC	91,9 ± 13,7	83,5 ± 11,5	88,1 ± 12,2	0,21	M1 = M2 = M3
GP	90,2 ± 16,2	73,7 ± 16,8	77,8 ± 18,4	0,023	M1 > (M2 = M3)
GCP	103,9 ± 13,1	74,5 ± 18,1	80,5 ± 15,7	0,0007	M1 > (M2 = M3)

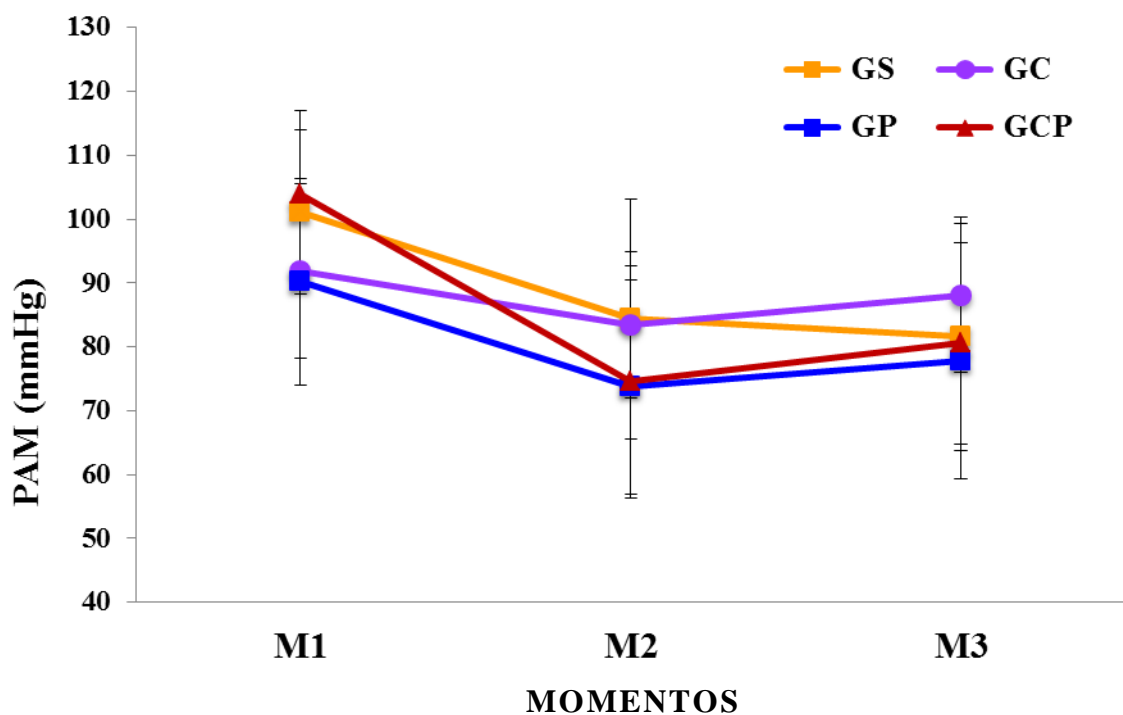


Gráfico 1 - PAM ao longo do experimento segundo grupos e momentos.

Tabela 5 – Pressão arterial média, medidas repetidas com um fator e análise de contraste entre grupos

ANOVA para medidas repetidas com um fator						
Variável	Efeito principal			Análise de contraste entre grupos		
	Grupo	Tempo	Interação	Par de momento	Valor de p	Comentários
PAM	0,37	0,0001	0,18	M1 x M2	0,11	GS = GC = GP = GCP
				M1 x M3	0,18	GS = GC = GP = GCP
				M2 x M3	0,64	GS = GC = GP = GCP

Comentários: a análise de contrastes mostrou que não existe diferença significativa na variação da PAM do M1 para M2 ($p=0,11$), do M1 para M3 ($p=0,18$) e nem do M2 para M3 ($p=0,64$) entre os grupos experimentais, ou seja, os quatro grupos evoluíram de forma semelhante. A ANOVA para medidas repetidas revelou que houve variação significativa apenas na PAM ao longo do experimento nos grupos GS ($p<0,025$), GP ($p<0,023$) e GCP ($p<0,0007$). À análise dos contrastes, de uma forma geral, identificou-se significância estatística ($p<0,05$) na queda da PAM após M1. Pela análise de contrastes, observou-se que o momento M1 foi significativamente maior que M3 no grupo GS e significativamente maior que os momentos M2 e M3 nos grupos GP e GCP. Não existem diferenças significativas ao nível de 5% entre o M2 (momento intermediário) com os momentos M1 e M3 no grupo GS.

4.3 TEMPERATURA (T)

Tabela 6 – Valores da média e desvio padrão da temperatura (°C) segundo grupos e momentos

Grupos	M1	M2	M3	Valor de p
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
GS	37,7 ± 1,0	38,2 ± 0,6	37,8 ± 0,7	0,27
GC	37,5 ± 0,7	37,9 ± 0,7	37,7 ± 0,7	0,13
GP	38,5 ± 1,0	38,2 ± 0,4	37,9 ± 0,4	0,18
GCP	37,6 ± 0,8	38,1 ± 0,7	37,6 ± 0,8	0,14

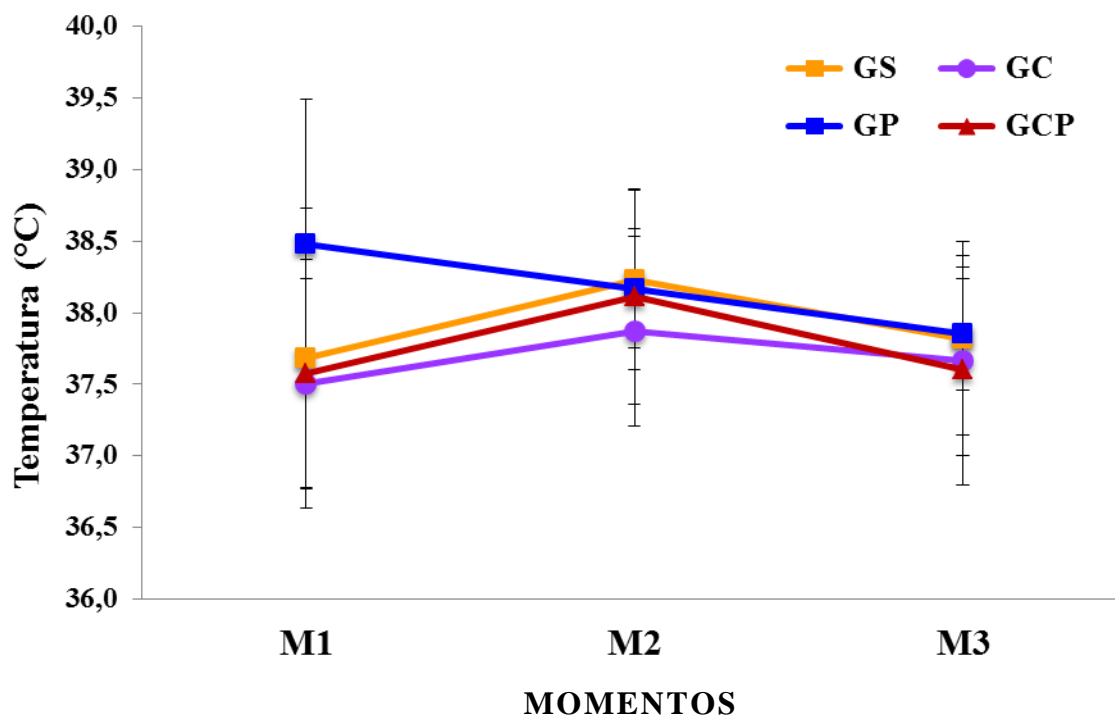


Gráfico 2 - Temperatura ao longo do experimento segundo grupos e momentos.

Comentário: não existiu variação significativa da temperatura nos quatro grupos estudados.

Tabela 7 – Temperatura, medidas repetidas com um fator e análise de contraste entre grupos

Variável	ANOVA para medidas repetidas com um fator					
	Grupo	Efeito principal		Análise de contraste entre grupos		
		Tempo	Interação	Par de momento	Valor de p	Comentários
T	0,17	0,085	0,30	M1 x M2	0,23	GS = GC = GP = GCP
				M1 x M3	0,32	GS = GC = GP = GCP
				M2 x M3	0,70	GS = GC = GP = GCP

Comentários: a análise de contrastes mostrou que não existiu diferença significativa na variação da temperatura do M1 para M2 ($p=0,23$), do M1 para M3 ($p=0,32$) e nem do M2 para M3 ($p=0,70$) entre os grupos experimentais, ou seja, os quatro grupos evoluíram de forma semelhante. Pela ANOVA para medidas repetidas com um fator, observou-se o efeito não significativo da interação para Temperatura ($p=0,30$).

4.4 CREATININA PLASMÁTICA (Crp)

Tabela 8 - Valores da média e desvio padrão da creatinina plasmática (mg.dL⁻¹), segundo grupos e momentos

Grupos	Momentos			Valor de p	Análise de contraste
	C1	C2	C3		
GS	0,430 ± 0,142	0,620 ± 0,193	0,550 ± 0,108	0,021	C1 < (C2 = C3)
GC	0,350 ± 0,053	0,520 ± 0,079	0,570 ± 0,082	0,0001	C1 < (C2 = C3)
GP	0,390 ± 0,074	0,820 ± 0,274	2,60 ± 1,67	0,0001	C1 < C2 < C3
GCP	0,418 ± 0,117	0,964 ± 0,112	3,26 ± 1,83	0,0001	C1 < C2 < C3

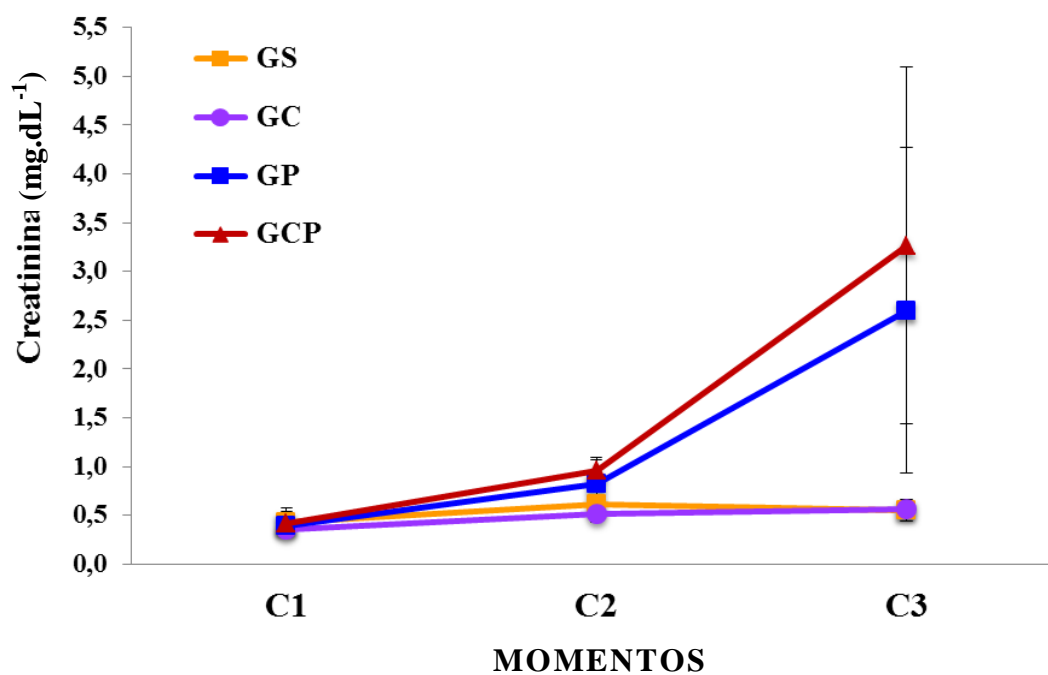


Gráfico 3 - Creatinina (mg.dL⁻¹) ao longo do experimento segundo o grupos e momentos.

Tabela 9 – Creatinina plasmática, medidas repetidas com um fator e análise de contraste entre grupos

Variável	ANOVA para medidas repetidas com um fator					
	Efeito principal			Análise de contraste entre grupos		
	Grupo	Tempo	Interação	Par de momento	Valor p	Comentários
Cr	0,0001	0,0001	0,0001	C1 x C2	0,034	(GS = GC) < GCP, GP intermediário
				C1 x C3	0,0001	(GS = GC) < (GP = GCP)
				C2 x C3	0,0001	(GS = GC) < (GP = GCP)

Comentários: a análise de contrastes mostrou diferença significativa na variação da creatinina plasmática do C1 para C2 entre os grupos experimentais ($p=0,034$). Identificou-se, ao nível de 5%, que o grupo GCP apresentou aumento significativamente maior que os grupos GS e GC. Não existem diferenças significativas entre GS, GC e GP, e nem entre GP e GCP (GP grupo intermediário); na variação do C1 para C3 entre os grupos experimentais ($p=0,0001$). Identificou-se, ao nível de 5%, que os grupos GP e GCP apresentaram aumento significativamente maior que os grupos GS e GC. Não existem diferenças significativas entre GS e GC e nem entre GP e GCP (os grupos evoluem de forma semelhante); e na variação do C2 para C3 entre os grupos experimentais ($p=0,0001$). Identificou-se, ao nível de 5%, que os grupos GP e GCP apresentaram aumento significativamente maior que os grupos GS e GC. Não existem diferenças significativas entre GS e GC e nem entre GP e GCP (os grupos evoluíram de forma semelhante).

4.5 UREIA PLASMÁTICA (Up)

Tabela 10 - Valores da média e desvio padrão da ureia (mg.dL^{-1}), segundo grupos e momentos

Grupos	Momentos			Valor de p	Análise de contraste
	C1	C2	C3		
GS	$55,0 \pm 14,8$	$63,7 \pm 16,3$	$56,3 \pm 11,6$	0,17	
GC	$50,6 \pm 3,1$	$58,0 \pm 3,9$	$60,1 \pm 8,5$	0,004	C1 < (C2 = C3)
GP	$45,4 \pm 5,3$	$60,8 \pm 7,2$	$174,5 \pm 70,1$	0,0001	C1 < C2 < C3
GCP	$46,4 \pm 5,9$	$62,9 \pm 4,2$	$206,0 \pm 76,2$	0,0001	C1 < C2 < C3

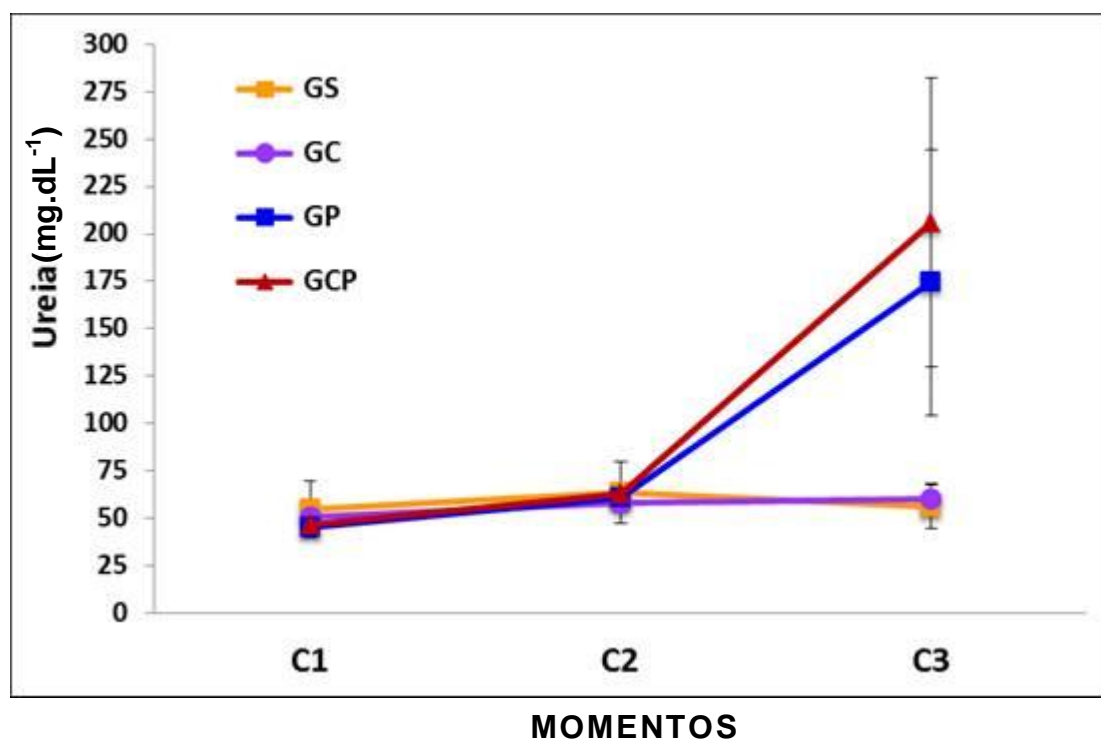


Gráfico 4 - Ureia plasmática (mg.dL^{-1}) ao longo do experimento segundo grupos e momentos.

Tabela 11 - Ureia plasmática, medidas repetidas com um fator e análise de contraste entre grupos

Variável	ANOVA para medidas repetidas com um fator					
	Efeito principal			Análise de contraste entre grupos		
	Grupo	Tempo	Interação	Par de momento	Valor p	Comentários
				C1 x C2	0,004	(GS = GC) < (GP = GCP)
Ur	0,0001	0,0001	0,0001	C1 x C3	0,0001	(GS = GC) < (GP = GCP)
				C2 x C3	0,0001	(GS = GC) < (GP = GCP)

Comentários: a análise de contrastes mostrou que existe diferença significativa na variação da Ur do C1 para C2 entre os grupos experimentais ($p=0,004$). Identificou-se, ao nível de 5%, que os grupos GP e GCP apresentaram aumento significativamente maior que os grupos GS e GC. Não existem diferenças significativas entre GS e GC e nem entre GP e GCP (os grupos evoluem de forma semelhante); na variação da ureia do C1 para C3 entre os grupos experimentais ($p=0,0001$). Identificou-se, ao nível de 5%, que os grupos GP e GCP apresentaram aumento significativamente maior que os grupos GS e GC. Não existem diferenças significativas entre GS e GC e nem entre GP e GCP (os grupos evoluem de forma semelhante); na variação da Ureia do C2 para C3 entre os grupos experimentais ($p=0,0001$). Identificou-se, ao nível de 5%, que os grupos GP e GCP apresentaram aumento significativamente maior que os grupos GS e GC. Não existem diferenças significativas entre GS e GC e nem entre GP e GCP (os grupos evoluem de forma semelhante).

4.6 LIPOCALINA ASSOCIADA À GELATINASE DOS NEUTRÓFILOS DOSADA NO PLASMA (NGALp)

Tabela 12 - Valores da média e desvio padrão da NGALp (ng.mL^{-1}), segundo grupos e momentos

Grupos	Momentos			Valor de p	Análise de contraste
	C1	C2	C3		
GS	5,8 ± 4,9	20,0 ± 23,0	217,2 ± 65,4	0,0001	C1 < C2 < C3
GC	5,3 ± 4,5	5,2 ± 2,7	226,5 ± 96,6	0,0001	(C1 = C2) < C3
GP	10,1 ± 10,4	37,7 ± 41,3	343,6 ± 50,6	0,0001	C1 < C2 < C3
GCP	20,8 ± 19,9	66,0 ± 104,9	374,0 ± 17,7	0,0001	C1 < C2 < C3

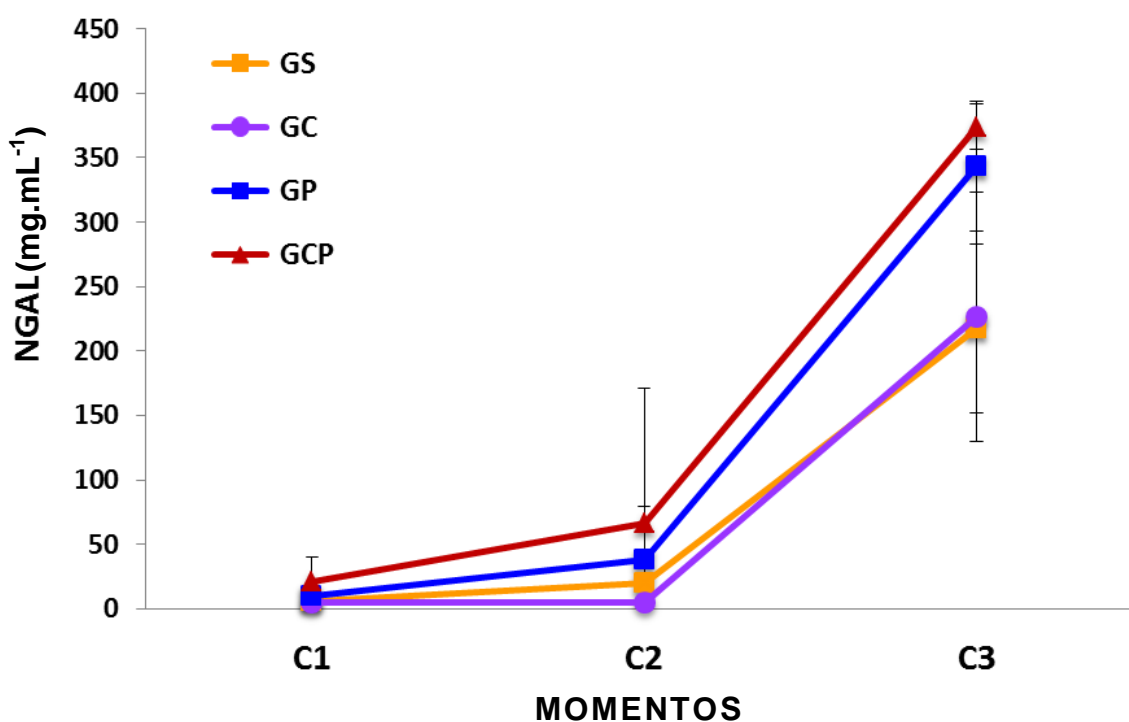


Gráfico 5 - NGALp (ng.mL^{-1}) ao longo do experimento segundo grupos e momentos.

Tabela 13 – NGALp, medidas repetidas com um fator e análise de contraste entre grupos

Variável	ANOVA para medidas repetidas com um fator					
	Efeito Principal			Análise de contraste entre grupos		
	Grupo	Tempo	Interação	Par de momento	Valor de p	Comentários
NGAL	0,0008	0,0001	0,081	C1 x C2	0,041	GC < (GS = GP = GCP)
				C1 x C3	0,54	GS = GC = GP = GCP
				C2 x C3	0,11	GS = GC = GP = GCP

Comentário: a análise de contrastes mostrou que existe diferença significativa do C1 para C2 entre os grupos experimentais ($p=0,041$). Identificou-se, ao nível de 5%, que o grupo GC apresentou aumento significativamente menor que os grupos GS, GP e GCP. Não existem diferenças significativas entre GS, GP e GCP (os grupos evoluem de forma semelhante); do C1 para C3 entre os grupos experimentais ($p=0,54$), ou seja, os quatro grupos evoluem de forma semelhante; e do C2 para C3 entre os grupos experimentais ($p=0,11$), ou seja, os quatro grupos evoluem de forma semelhante. Existe uma tendência do grupo GCP apresentar aumento maior que o grupo GC.

4.7 SÓDIO PLASMÁTICO (Nap)

Tabela 14 - Valores da média e desvio padrão do sódio plasmático (mEq.L^{-1}), segundo grupos e momentos

Grupos	Momentos			Valor de p	Análise de contraste
	C1	C2	C3		
GS	132,4 ± 3,2	130,9 ± 4,1	134,4 ± 2,2	0,091	
GC	130,1 ± 4,0	132,9 ± 1,7	133,8 ± 3,3	0,025	C1 < (C2 = C3)
GP	128,5 ± 2,8	128,2 ± 2,4	128,6 ± 1,9	0,90	
GCP	130,7 ± 3,3	129,4 ± 2,7	131,4 ± 3,6	0,32	

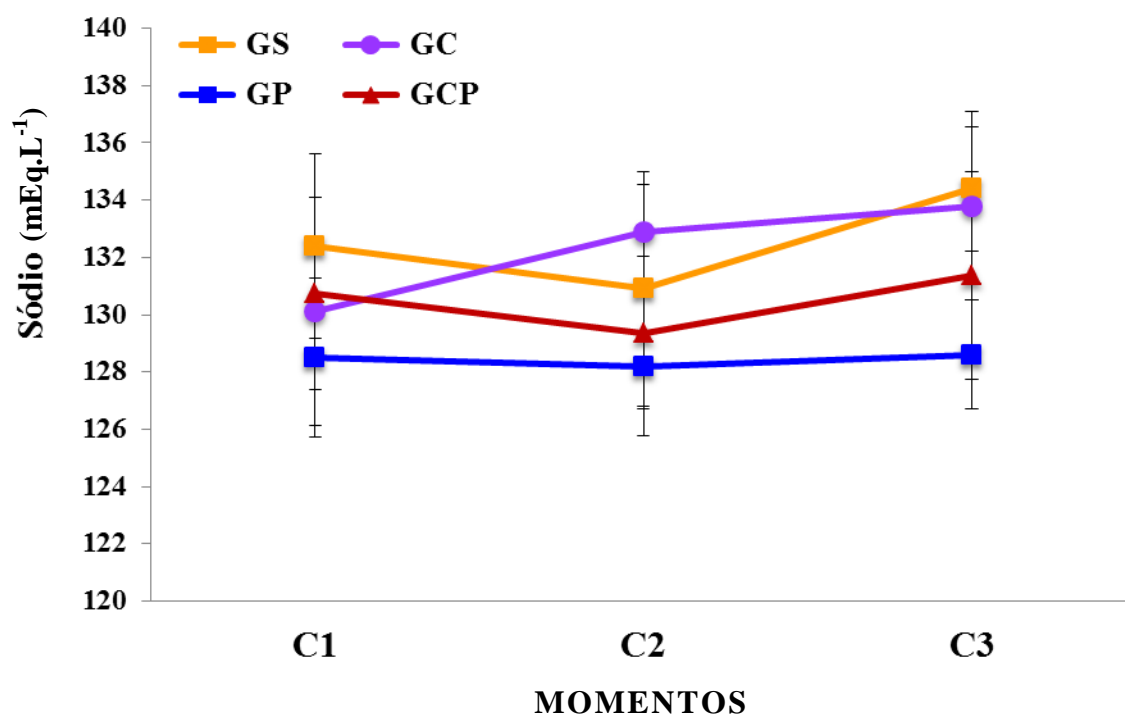


Gráfico 6 - Sódio (mEq.L^{-1}) ao longo do experimento segundo grupos e momentos.

Tabela 15 – Sódio plasmático, medidas repetidas com um fator e análise de contraste entre grupos

Variável	ANOVA para medidas repetidas com um fator					
	Efeito Principal			Análise de contraste entre grupos		
	Grupo	Tempo	Interação	Par de momento	Valor de p	Comentários
Nap	0,0001	0,014	0,13	C1 x C2	0,096	GS = GC = GP = GCP
				C1 x C3	0,21	GS = GC = GP = GCP
				C2 x C3	0,30	GS = GC = GP = GCP

Comentários: a análise de contrastes mostrou que não existe diferença significativa na variação de C1 para C2 ($p=0,096$), de C1 para C3 ($p=0,21$) e nem de C2 para C3 ($p=0,30$) entre os grupos experimentais, ou seja, os quatro grupos evoluíram de forma semelhante.

4.8 CRITÉRIOS DE RIFLE E AKIN

Tabela 16 - Evolução dos valores de creatinina do grupo GS em diferentes momentos, a variação de porcentagem entre o valor basal e os subsequentes e a classificação de RIFLE e AKIN correspondente

RATOS	CrC1	CrC2	CrC3	Var%	RIFLE a/	Var%	RIFLEb/
1	0,3	1,1	0,4	260%	L/N	33%	N/N
2	0,4	0,4	0,5	-	N/N	25%	N/N
3	0,4	0,6	0,6	50%	N/N	50%	N/N
4	0,5	0,7	0,5	40%	N/N	-	N/N
5	0,4	0,5	0,7	25%	N/N	75%	N/1
6	0,4	0,7	0,5	75%	N/1	25%	N/N
7	0,4	0,6	0,7	50%	N/1	75%	N/1
8	0,8	0,5	0,6	-75%	N/N	-50%	N/N
9	0,4	0,5	0,6	25%	N/N	50%	N/N
10	0,3	0,6	0,4	100%	N/1	33%	N/N

N - Normal, R - Risco, L - Lesão (Injury) e F - Falência; AKIN – Estágios 1,2 ou 3

Tabela 17 - Evolução dos valores de creatinina do grupo GC em diferentes momentos, a variação de porcentagem entre o valor basal e os subsequentes e a classificação de RIFLE e AKIN correspondente.

RATOS	CrC1	CrC2	CrC3	Var%	RIFLE a/	Var%	RIFLEb/
11	0,4	0,6	0,6	50%	N/ N	50%	N/ N
12	0,4	0,5	0,4	25%	N/ N	-	N/ N
13	0,3	0,4	0,6	33%	N/ N	100%	N/ 1
14	0,3	0,4	0,5	33%	N/ N	66%	N/ N
15	0,4	0,5	0,6	25%	N/ N	50%	N/ N
16	0,4	0,6	0,7	50%	N/ N	75%	N/ 1
17	0,3	0,6	0,6	100%	N/ 1	100%	N/ 1
18	0,4	0,5	0,6	25%	N/ N	50%	N/ N
19	0,3	0,5	0,5	66%	N/ N	66%	N/ N
20	0,3	0,6	0,6	100%	N/ 1	100%	N/ 1

N - Normal, R - Risco, L - Lesão (Injury) e F - Falência; AKIN – Estágios 1,2 ou 3

Tabela 18 - Evolução dos valores de creatinina do grupo GP em diferentes momentos, a variação de porcentagem entre o valor basal e os subsequentes e a classificação de RIFLE e AKIN correspondente

RATOS	CrC1	CrC2	CrC3	Var%	RIFLE a/	Var%	RIFLEb/
21	0,4	1,0	1,0	150,00	R/ 1	150,00	R/ 1
22	0,4	1,0	4,5	150,00	R/ 1	1025,00	F/ 3
23	0,4	0,8	1,1	100,00	N/ 1	175,00	R/ 1
24	0,5	0,9	4,9	80,00	N/ 1	880,00	F/ 3
25	0,5	1,0	1,8	100,00	N/ 1	260,00	L/ 2
26	0,3	0,9	0,9	200,00	L/ 2	200,00	L/ 2
27	0,4	1,0	4,8	150,00	R/ 1	1100,00	F/ 3
28	0,3	0,7	2,1	133,33	N/ 1	600,00	F/ 3
29	0,3	0,1	1,3	-66,67	N/ N	333,33	F/ 3
30	0,4	0,8	3,6	100,00	N/ 1	800,00	F/ 3

N - Normal, R - Risco, L - Lesão (Injury) e F - Falência; AKIN – Estágios 1,2 ou 3

Tabela 19 - Evolução dos valores de creatinina do grupo GCP em diferentes momentos, a variação de porcentagem entre o valor basal e os subsequentes e a classificação de RIFLE e AKIN correspondente

RATOS	CrC1	CrC2	CrC3	Var%	RIFLEa/	Var%	RIFLEb/
31	0,4	0,9	4,3	125,00	N/ 1	975,00	F/ 3
32	0,4	0,9	0,8	125,00	N/ 1	100,00	N/ N
33	0,3	1,0	4,0	233,33	L/ 2	1233,33	F/ 3
34	0,4	0,9	1,4	125,00	N/ 1	250,00	L/ 2
35	0,3	0,8	0,7	166,67	R/ 1	133,33	N/ N
36	0,5	1,2	4,8	140,00	N/ 1	860,00	F/ 3
37	0,4	0,9	4,5	125,00	N/ 1	1025,00	F/ 3
38	0,7	0,9	1,2	28,57	N/ N	71,43	N/ N
39	0,4	1,0	4,4	150,00	R/ 1	1000,00	F/ 3
40	0,5	1,0	4,2	100,00	N/ 1	740,00	F/ 3
41	0,3	1,1	5,6	266,67	L/ 2	1766,67	F/ 3

N - Normal, R - Risco, L - Lesão (Injury) e F - Falência; AKIN – Estágios 1,2 ou 3

Comentários: houve aumento do número de casos de pacientes em estágio 1 do critério AKIN em C1-C2, que não seriam considerados em risco(R) e sim normais(N) segundo o critério de RIFLE. Na variação C1-C3 do valor basal de creatinina não houve diferença no diagnóstico de casos de falência pelo RIFLE, que equivale ao estágio 3 de AKIN, respectivamente 7/10(GP) e 7/11(GCP).

4.9 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

A avaliação histológica dos rins direitos e dos rins esquerdos referentes aos grupos GS e GC receberam grau zero de Park et al.⁵², ou seja não houve evidência de lesão tubular em nenhum dos rins deste grupo. A classificação do grau de lesão segundo a histologia foi obtida por avaliação semiquantitativa, que varia de 0 a 5, na qual zero corresponde a ausência de lesão e cinco a lesão intensa. Sendo assim, para maior abrangência analítica, foi proposto analisar os dados sob o ponto de vista numérico.

A tabela 20 fornece a mediana de 1º e 3º quartis do grau de lesão do lado esquerdo, segundo o grupo experimental. Apenas GP e GCP que apresentam lesão têm análise estatística e o correspondente nível descritivo (p) por meio do teste de Mann-Whitney ($p=0,63$).

Tabela 20 – Mediana 1º e 3º quartis, entre colchetes, referentes à gradação dos exames histológicos segundo os grupos

Grupo	n	mediana	1º quartil / 3ºquartil
GS	10	0	[0; 0]
GC	10	0	[0; 0]
GP	10	3	[3; 5]
GCP	11	3	[3; 4]

$p=0,63$

Comentário: não há diferença significativa no grau de lesão pela histopatologia entre os grupos experimentais GP e GCP ($p=0,63$).

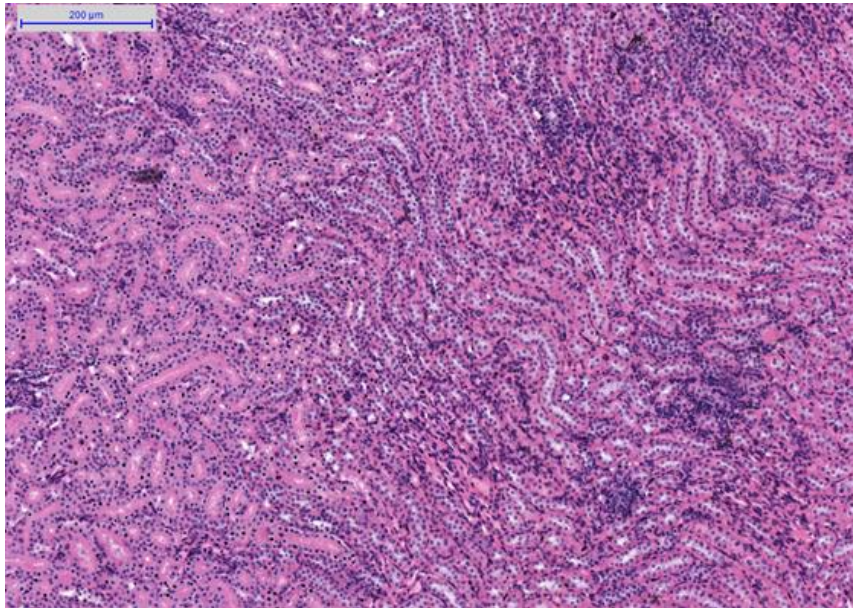


Figura 3 - Rim izquierdo - Grupo Sham (GS). Grau 0 de Park, HE (200x).

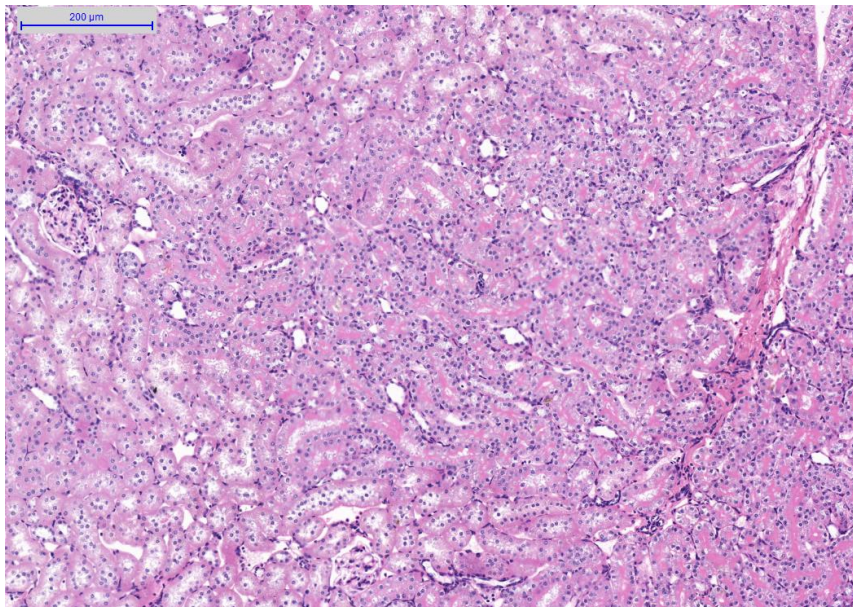


Figura 4 - Rim izquierdo – Grupo Cetamina (GC). Grau 0 de Park, HE (200x).

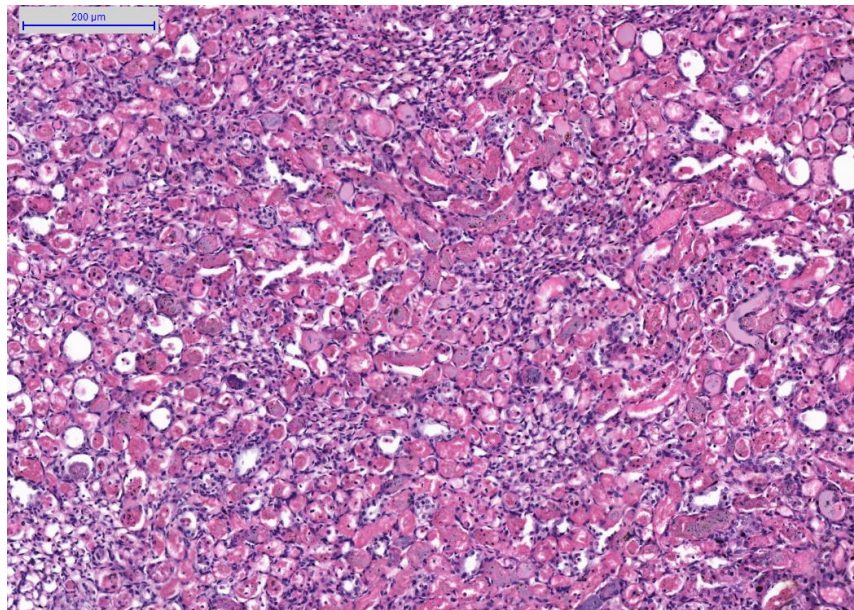


Figura 5 - Rim esquerdo – Grupo pós-condicionamento (GP). Grau 4 de Park, HE (200x).

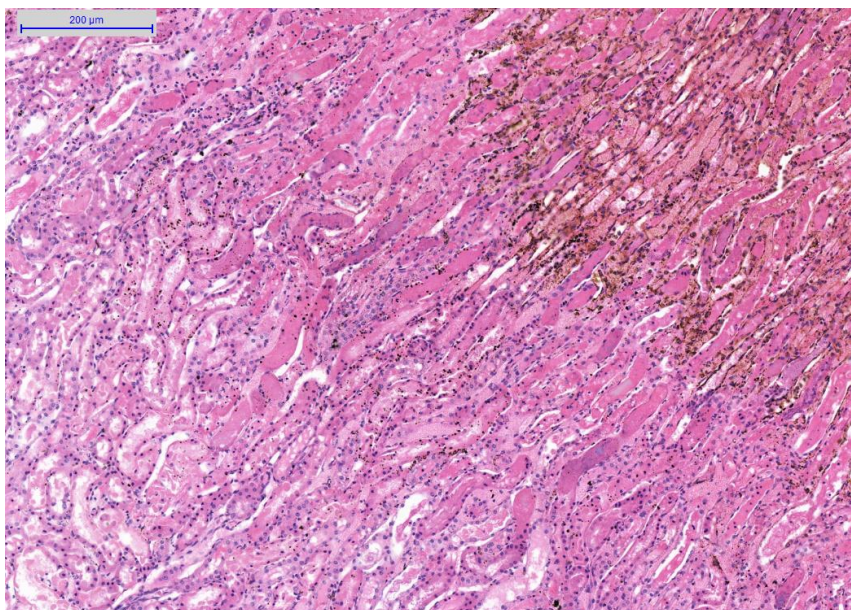


Figura 6 - Rim esquerdo – Grupo pós-condicionamento (GP), Grau 5 de Park, HE (200x).

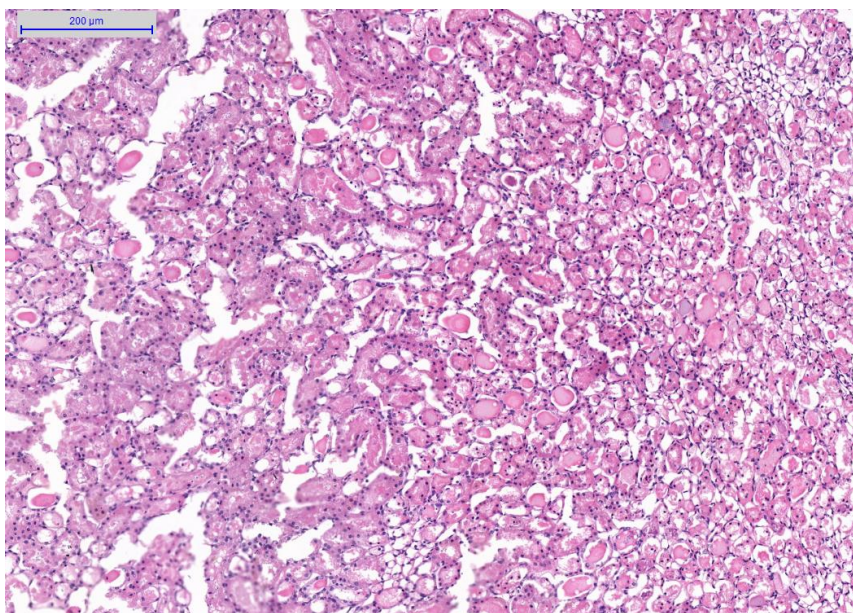


Figura 7 - Rim esquerdo – Grupo cetamina pós-condicionamento (GCP), Grau 4 de Park, HE(200x).

5 DISCUSSÃO

O modelo de isquemia-reperfusão (I/R) em ratos utilizados no experimento foi desenvolvido no Laboratório da Anestesia Experimental da UNESP, campus de Botucatu. No presente estudo foram usados ratos *Wistar* machos, sob anestesia inalatória, com os cuidados pertinentes à experimentação animal. Houve controle da pressão arterial e da temperatura, com utilização de ventilação espontânea.

Os animais provenientes do Biotério Central da UNESP- Botucatu foram selecionados de maneira aleatória. Gerados e criados em cativeiro, submetidos às mesmas condições de ambientação e alimentação, bem como controle interno de zoonoses e idade. A forma apropriada como foram distribuídos após seleção reflete-se na amostra com homogeneidade para a variável peso corporal e gênero dos animais.

O controle da temperatura foi realizado por meio de aferição contínua com uso de sensor retal, imediatamente após indução anestésica de cinco minutos. Foram disponibilizadas bolsas térmicas de gel aquecidas sobre e sob os ratos. O objetivo de manter a temperatura entre 37°C e 38°C foi alcançado, pois não houve diferença significativa entre os grupos de estudo e entre os momentos, dado que confirma a adequação do controle e viabiliza a comparação entre intervenções. A hipotermia durante isquemia-reperfusão pode conferir proteção e menor grau de lesão renal, enquanto a hipertermia pode promover maior dano⁵⁴.

A monitorização da ventilação espontânea nos ratos neste experimento permitiu a observação tanto da amplitude como da frequência respiratória na adequação da anestesia. Ainda que se questione a repercussão de aumento do tônus simpático sobre a frequência cardíaca e a pressão arterial, além da ventilação não controlada e os valores de CO₂, em ventilação controlada com pressão positiva pode haver alteração na concentração plasmática neuro-humoral e diminuição do débito cardíaco com conseqüente diminuição do fluxo

sanguíneo renal⁵⁵. Não houve diferença significativa da PAM entre os grupos. Limitações de sensibilidade do monitor prejudicaram a avaliação fidedigna da frequência de pulso carotídeo, com valores representados como > 250bpm, normais, pois podem atingir 350bpm.

A realização de nefrectomia direita como parte do modelo experimental teve a intenção de impedir mecanismo compensatório contralateral. A isquemia transitória do rim esquerdo foi executada com clipe temporário microvascular para clameamento arterial atraumático. A integridade vascular foi necessária para continuidade dos ciclos breves de reperfusão (pós-condicionamento) antes da adequada liberação plena do fluxo sanguíneo.

O estudo avaliou a função e histologia renais de ratos submetidos a estímulo com potencial para determinar pré-condicionamento, anestesia com isoflurano, e também submetidos a dois estímulos, que têm comportamento testado quanto à proteção renal – o pós-condicionamento isquêmico e a utilização de cetamina S(+) em doses subanestésicas. Neste modelo em ratos, não houve benefício da utilização da dose subanestésica de cetamina S(+) na proteção renal da lesão de isquemia e reperfusão. A evolução da lesão renal foi semelhante nos grupos em que foi utilizado pós-condicionamento isquêmico (GP e GCP), com progressivo aumento das variáveis funcionais (C1<C2<C3) e lesão histológica que confirmou tal evidência. Na ANOVA um fator, apenas as variáveis creatinina e ureia revelaram efeito interação ($p<0,0001$). Ou seja, ureia e creatinina confirmaram GP e GCP como grupos semelhantes. O NGAL, considerado como biomarcador mais sensível, não atingiu significância estatística.

A cetamina S(+) em dose subanestésica e o pós-condicionamento isquêmico poderiam atuar inibitoriamente sobre mecanismos causais, como estresse oxidativo e peroxidação lipídica - propostos para a lesão de isquemia-reperfusão^{56,57}. Alguns estudos mostram resultados favoráveis à realização do pós-condicionamento isquêmico renal, com melhora de parâmetros funcionais e/ou histológicos em diferentes modelos animais⁵⁸⁻⁶⁰. Porém, há relato de falha em demonstrar bom resultado no pós-condicionamento renal⁶¹. Os fatores

condicionantes do pós-condicionamento renal, que parecem ser os mesmos do modelo de isquemia e reperfusão com pré-condicionamento²⁷, necessitam ainda de mais pesquisas na literatura que os analise comparativamente e elucidem questões sobre mecanismos de lesão específicos. Contudo, difícil considerar que aspectos de desenvolvimento do tipo de protocolo e modelos animais diferentes na análise não diferenciem por si só a janela de proteção precoce ou tardia e interfiram no local do pós-condicionamento, cujo resultado favorável ou não é tido como consequência.

A atividade simpaticomimética renal aumentada ocasiona hipofluxo sanguíneo nos rins por meio de mediação α -adrenérgica e aumento de liberação de renina por influência β -adrenérgica direta, ou interação com a mácula densa tubular renal e com o mecanismo reflexo barorreceptor. Embora a vasoconstrição persistente seja relacionada com a diminuição da taxa de filtração glomerular e cause repercussão sobre os túbulos renais, pode não explicar todo o tipo de dano ocasionado. A fisiopatogenia da LRA evoluiu com o estudo que contempla interações existentes entre o ambiente microvascular (glomerular e medular) e o tubular. Há diferenças marcantes no fluxo sanguíneo regional com 85% dos néfrons localizados no córtex, o que torna a região medular mais sensível à lesão isquêmica. A hipóxia medular por sua vez compromete o sistema de contracorrente na alça de Henle, componente crítico para a habilidade renal de conservar ou excretar sal e água, mas há evidência de regulação parácrina de DO_2 na medula, que é ainda pouco conhecida⁶². Após isquemia há simultaneidade de eventos deflagrados a partir de componente vascular que pode ser perpetuado por mediadores inflamatórios glomerulares e tubulares. É postulado efeito sinérgico entre substâncias que modulam o tônus vascular pós-isquêmico com vasoconstrição renal, como angiotensina II, endotelina-A, tromboxano A_2 , leucotrienos, adenosina e a atividade nervosa simpática, enquanto outras fazem vasodilatação, entre as quais, óxido nítrico (NO), acetilcolina, bradicinina e PGE_2 ¹⁵. A disfunção endotelial promove alterações consideradas como ainda mais importantes que a vasoconstrição pré-glomerular. O dano endotelial da célula muscular lisa gera

inflamação local e inibição da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), além de obstrução vascular por ativação e adesão leucocitária. O NO tem ação vasodilatadora e inibidora da endotelina A, mas a endotelina B parece ter ação protetora tardia⁶³. Há baixa extração de O₂ para manutenção do metabolismo em túbulos corticais proximais e sabe-se que a região medular tem hipóxia maior, com NTA mais evidente. Em regime de fluxo sanguíneo deficitário, a hipóxia gera desestruturação anatômica medular, perda de polaridade e descamação celular, obstrução tubular, apoptose e necrose.

O receptor da adenosina já foi relacionado com a mediação de efeito pré-condicionante isquêmico⁶⁴, ainda que a adenosina tivesse sido implicada com ação vasoconstritora renal. A utilização de cetamina sugeriu efeitos anti-inflamatórios protetores na sepse, mediados pela liberação de adenosina que agiria por meio do receptor A2A, com diminuição de níveis de IL-6 e TNF- α ⁶⁵. Hansen et al., ao estudarem o comportamento da adenosina, descobriram que o aumento difuso da adenosina no rim promove vasodilatação resultante da geração de NO mediada por receptores A2A. Entretanto, o aumento seletivo da adenosina proximal às arteríolas aferentes causaria vasoconstrição persistente por predomínio de receptores A1A. Então, a adenosina só teria ação vasoconstritora ao interagir com receptores A1A da arteríola aferente, sem afetar simultaneamente os receptores renais A2A, existentes em grande quantidade⁶⁶. A atividade da cetamina S(+) em dose subanestésica poderia influenciar de forma muito particular este contexto, no qual a dinâmica celular local é preponderante.

O NMDA é um receptor ionotrópico do neurotransmissor excitatório glutamato e sua ativação leva ao influxo de cálcio intracelular, sendo essencial a subunidade NR1 do receptor para a atividade do canal. Em 2008, Yang et al observaram melhora da disfunção renal após isquemia-reperfusão em ratos, com a utilização prévia de um antagonista do receptor NMDA, o ácido D-2-amino-5-fosfopentanoico (D-AP-5)⁶⁷. Receptores NMDA foram identificados em células do trato urogenital masculino e dos rins, mas especula-se ainda sobre sua atividade na microvasculatura glomerular, com provável papel no

feedback tubuloglomerular. Pandir et al.⁶⁸ sugeriram efeito benéfico da modulação de sítios alostéricos do receptor NMDA para a diminuição da LRA Na NTA promovida pela gentamicina, na qual foi encontrada hiperexpressão de receptor-NMDA, outro antagonista, o MK-801, também promoveu proteção renal⁶⁹. O tipo de modulação que o efeito sistêmico dos antagonistas dos receptores NMDA exerce sobre o tônus adrenérgico glomerular ainda não é plenamente entendido. O risco do efeito vasoconstritor sobre o glomérulo torna-se menor com o uso de doses subanestésicas da cetamina S(+), que têm menor ação simpaticomimética, ainda assim no estudo optou-se pela não realização de *bolus* do fármaco e administração apenas em infusão contínua.

A creatinina é o biomarcador mais empregado na prática clínica, ainda que a NGAL apresente maior sensibilidade para detecção precoce da LRA¹⁴. Apesar das limitações que peso, massa e hidratação, entre outros fatores, exercem sobre a creatinina, os resultados foram compatíveis com a agressão isquêmica em protocolo de 24 horas, nos grupos em que houve isquemia-reperfusão. Serviddio et al.⁵⁹ revelaram em seguimento de 48 horas, valores menores de creatinina no grupo-controle e no grupo de pós-condicionamento. Algum benefício talvez fosse observado com maior seguimento, que permitisse diferenciar os grupos com pós-condicionamento. Neste estudo, o dano histológico renal apresentou correlação significativa com os níveis plasmáticos de ureia e creatinina. Entretanto, mesmo nos grupos não submetidos à isquemia (GS e GC) houve dano funcional, observado pelo aumento da NGAL, praticamente inalterado entre C1-C2 (GC), mas com semelhanças para os demais grupos. O aumento da NGAL também é visto como secundário a comorbidades e à inflamação sistêmica, que procedimentos cirúrgicos realizados podem ocasionar. Este papel além da discriminação apenas moderada da LRA pelo biomarcador pode por vezes gerar desapontamento^{14,70}. A análise da NGAL pode suscitar a ideia de que lesões funcionais foram parcialmente protegidas exatamente enquanto a cetamina era infundida (GC). Houve significância estatística da NGAL ($p=0,041$) no pareamento C1xC2 durante análise de contraste entre grupos, o que tornou $GC < (GS=GP=GCP)$.

Mesmo sem emprego de intervenções quando da coleta em C1, quando comparados os grupos, os valores de NGAL (ng/mL^{-1}) já são maiores nos grupos com pós-condicionamento isquêmico. Em C2, a NGAL tem aumento discreto em GC e um pouco mais elevado em GS. Entretanto, em GP e GCP o aumento é mais que o dobro (Tabela 13). Esta alteração pode sinalizar prejuízo funcional que a NGAL, como descrito na literatura, tem capacidade de antecipar nos grupos que evoluíram com lesão, aqueles expostos ao pós-condicionamento e que no momento C2 não foram apontados com precocidade por ureia e creatinina. A proporção aguardada para o aumento nos biomarcadores relativo a cada grupo, aqueles dois grupos submetidos à laparotomia com nefrectomia com posterior I/R com pós-condicionamento e outros dois sem I/R, é difícil de definir. A NGAL plasmática reflete a resposta da célula tubular renal ao estresse, aumenta dentro de uma hora após lesão, tem grande variabilidade nos valores basais entre os pacientes e níveis aumentados são altamente preditivos de LRA no pós-operatório¹³. Em GC a variável sódio teve significância estatística ($p=0,025$) quanto ao efeito tempo $C1 < (C2=C3)$, mas na análise de contraste entre grupos evoluiu de forma semelhante.

Os critérios de RIFLE e AKIN foram concebidos com o objetivo de padronizar o diagnóstico de LRA, mas sobretudo classificar a lesão na perspectiva de implementação precoce de tratamento e possível reversão. Inicialmente, o critério de RIFLE inova quando define por consenso três graus de gravidade (risco, lesão e insuficiência) e dois desfechos clínicos (a perda de função e a doença terminal), correlacionados com aumento da creatinina e diminuição ou piora do débito urinário. O critério de AKIN emprega os mesmos parâmetros iniciais do RIFLE para estratificação do diagnóstico, com estágios representando o caráter disfuncional evolutivo.

A amostragem para avaliação categórica (qualitativa) obtido com a utilização dos critérios de RIFLE e AKIN em todos os grupos exigiria uma maior casuística talvez para tratamento estatístico. A simples observação evolutiva (C1-C2) classifica LRA em estágio 1 em três animais de GS, enquanto dois são

identificados em GC. Porém ao adotarmos a mesma análise para o valor basal da creatinina C1-C3, o dobro dos ratos estaria em estágio 1 em GC na comparação com GS. O critério de RIFLE não mostra LRA em nenhum dos ratos de GS e GC. O acréscimo de $0,3 \text{ mg.dL}^{-1}$ poderia ao invés de antecipar, criar um falso-positivo para a LRA. Os grupos que apresentaram lesão funcional e histológica (GP e GCP) ao serem avaliados segundo tais critérios não tiveram diferença nítida entre eles, a não ser pela classificação diferenciada por meio do aumento de $0,3 \text{ mg.dL}^{-1}$ de creatinina (AKIN) em relação ao valor basal no estágio 1, ao invés do valor da variação da porcentagem(150%) de C1 para C2. Desta forma, houve aumento do número de casos de pacientes em estágio 1 do critério AKIN em C1-C2, que não seriam considerados em risco (R) e sim normais (N) segundo o critério de RIFLE. Na variação C1-C3 do valor basal de creatinina não houve diferença no diagnóstico de casos de falência pelo RIFLE, que equivale ao estágio 3 de AKIN, respectivamente 7/10 (GP) e 7/11 (GCP).

A análise histológica revelou que 100% dos casos submetidos ao modelo de I/R com pós-condicionamento (GP e GCP) apresentaram lesão histológica (Tabela 21) com graus variados e que a cetamina não promoveu proteção. Contudo, não houve diferença significativa no grau de lesão pela histologia entre os dois grupos.

A maior parte dos estudos em murinos trata do enfoque da LRA após isquemia quente bilateral⁷¹. A evolução para NTA e infiltrado inflamatório intersticial é característica nas primeiras 24 horas após reperfusão. A duração da isquemia exerce papel marcante na gravidade da LRA tanto funcional quanto histológica. Apesar de diferentes modelos animais serem utilizados, os experimentos diferenciam-se com relação ao tempo de isquemia de artéria renal (25 a 30 minutos, com aumento do tempo para acelerar padrão de lesão), mas variam quanto à reperfusão para análise – 24 a 72 horas. Nos protocolos para pós-condicionamento isquêmico, além da variação nos ciclos - três como descrito originalmente por Zhao²⁸ ou seis como no estudo de Jiang et al.⁶⁰, há protocolos com duração de ciclos que podem variar de segundos a minutos.

Serviddio et al.⁵⁹ fizeram clampeamento de todo pedículo vascular renal e utilizaram antes de reperfusão completa, tempos crescentes de 3, 6 e 12 minutos para reperfusão, com tempos fixos de 5 minutos para reoclusão. Foram utilizados no presente estudo três ciclos com tempos de isquemia e reperfusão iguais (2 minutos), com clampeamento apenas da artéria renal após identificação. A avaliação do peso dos animais, do controle da temperatura, da pressão arterial e da hidratação foram adequados no modelo e os grupos tiveram comportamento homogêneo.

Outro ponto a ser considerado é a ausência de um grupo experimental no qual apenas a I/R tivesse sido realizada, sem o pós-condicionamento isquêmico, apenas com isquemia por 30 minutos e reperfusão plena posterior. Numa tentativa de avaliar comparativamente os resultados com os dois grupos em que foi executado o pós-condicionamento isquêmico, o que permitiria observar se existem diferenças com os grupos GP e GCP. Ou mesmo servir de grupo alternativo à administração de baixa dose de cetamina S(+).

Os mecanismos envolvidos com o pré-condicionamento farmacológico e o pós-condicionamento isquêmico necessitam de pesquisas experimentais que validem resultados e aumentem a compreensão sobre os modelos de intervenção. Reflexões sobre os resultados advêm da tentativa de encontrar: o algoritmo ideal, o controle da intervenção de maneira segura e reprodutibilidade favorável que permita extrapolação para a prática clínica. Limitações existiram no estudo, relacionadas em parte a dificuldade de observação dos parâmetros funcionais em intervalo de tempo maior de seguimento.

A cetamina S(+) subanestésica não acrescentou efeito benéfico ao modelo de pós-condicionamento, mas, tampouco, foi responsável por piores escores de lesão. O próprio efeito do pós-condicionamento foi incapaz de impedir grave dano estrutural tubular. A distinção evolutiva entre dano funcional e dano estrutural definitivo e como antecipar e interromper este processo complexo permanece alvo de pesquisas.

6 CONCLUSÃO

Nas condições metodológicas agudas deste experimento, a cetamina S(+) em dose subanestésica não protegeu o rim da lesão causada pela I/R com pós-condicionamento.

Houve lesão funcional comprovada por aumento da uréia, creatinina nos grupos GP e GCP

O biomarcador NGAL não foi discriminativo.

Não houve diferença no grau de lesão histológica entre os grupos GP e GCP.

Os critérios de RIFLE e AKIN confirmaram a lesão renal evolutiva dos grupos GP e GCP.

7 REFERÊNCIAS

1. Jones DR, Lee HT. Surgery in the patient with renal dysfunction. *Med Clin North Am* 2009;93(5):1083-1093.
2. Moore E, Bellomo R, Nichol A. Biomarkers of acute kidney injury in anesthesia, intensive care and major surgery: from the bench to clinical research to clinical practice. *Minerva Anestesiol* 2010;76(6):425-440.
3. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, et al. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* 2004;8(4):R204-212.
4. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 2007;11(2):R31.
5. Bagshaw SM, George C, Bellomo R. A comparison of the RIFLE and AKIN criteria for acute kidney injury in critically ill patients. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23(5):1569-1574.
6. Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. The changing epidemiology of acute renal failure. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006;2(7):364-377.
7. Joannidis M, Druml W, Forni LG, et al. Prevention of acute kidney injury and protection of renal function in the intensive care unit. Expert opinion of the Working Group for Nephrology, ESICM. *Intensive Care Med* 2010;36(3):392-411.
8. Cruz DN, Bolgan I, Perazella MA, et al. North East Italian Prospective Hospital Renal Outcome Survey on Acute Kidney Injury (NEiPHROS-AKI): targeting the problem with the RIFLE Criteria. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2(3):418-425.
9. Thakar CV, Arrigain S, Worley S, et al. A clinical score to predict acute renal failure after cardiac surgery. *J Am Soc Nephrol* 2005;16(1):162-168.
10. Vanmassenhove J, Vanholder R, Nagler E, et al. Urinary and serum biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury: an in-depth review of the literature. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28(2):254-273.
11. Supavekin S, Zhang W, Kucherlapati R, et al. Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int* 2003;63(5):1714-1724.

12. Mori K, Lee HT, Rapoport D, et al. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest* 2005;115(3):610-621.
13. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* 2005;365(9466):1231-1238.
14. Siew ED. Blind men and elephants and the biological markers of AKI. *J Am Soc Nephrol* 2011;22(9):1578-1580.
15. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(8):2199-2210.
16. Webb ST, Allen JSD. Perioperative renal protection. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain* 2008;8(5):176-180.
17. Akcay A, Nguyen Q, Edelstein CL. Mediators of Inflammation in Acute Kidney Injury. *Mediators of Inflammation* 2009;2009.
18. Kinsey GR, Li L, Okusa MD. Inflammation in acute kidney injury. *Nephron Exp Nephrol* 2008;109(4):e102-107.
19. Bajwa A, Kinsey GR, Okusa MD. Immune mechanisms and novel pharmacological therapies of acute kidney injury. *Curr Drug Targets* 2009;10(12):1196-1204.
20. Sutton TA, Mang HE, Campos SB, et al. Injury of the renal microvascular endothelium alters barrier function after ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285(2):F191-198.
21. Linas S, Whittenburg D, Repine JE. Nitric oxide prevents neutrophil-mediated acute renal failure. *Am J Physiol* 1997;272(1 Pt 2):F48-54.
22. Sheridan AM, Bonventre JV. Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000;9(4):427-434.
23. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74(5):1124-1136.
24. Ko JS, Gwak MS, Kim GS, et al. The protective effect of ischemic preconditioning against hepatic ischemic-reperfusion injury under isoflurane anesthesia in rats. *Transplant Proc* 2013;45(5):1704-1707.
25. Mackay KB, Stiefel TH, Foster AC. Ischemic preconditioning reduces infarct volume after subdural hematoma in the rat. *Brain Res* 2002;930(1-2):200-205.

REFERÊNCIAS

26. Taha MO, Miranda-Ferreira R, Chang AC, et al. Effect of ischemic preconditioning on injuries caused by ischemia and reperfusion in rat intestine. *Transplant Proc* 2012;44(8):2304-2308.
27. Wever KE, Menting TP, Rovers M, et al. Ischemic preconditioning in the animal kidney, a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2012;7(2):e32296.
28. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285(2):H579-588.
29. Lee HT, Ota-Setlik A, Fu Y, et al. Differential protective effects of volatile anesthetics against renal ischemia-reperfusion injury in vivo. *Anesthesiology* 2004;101(6):1313-1324.
30. Guye ML, Mc Gregor B, Weil G, et al. [Ischaemic and pharmacologic preconditioning: desflurane reduces renal reperfusion injury in rabbits]. *Ann Fr Anesth Reanim* 2010;29(7-8):518-523.
31. Julier K, da Silva R, Garcia C, et al. Preconditioning by sevoflurane decreases biochemical markers for myocardial and renal dysfunction in coronary artery bypass graft surgery: a double-blinded, placebo-controlled, multicenter study. *Anesthesiology* 2003;98(6):1315-1327.
32. Wever KE, Masereeuw R, Wagener FA, et al. Humoral signalling compounds in remote ischaemic preconditioning of the kidney, a role for the opioid receptor. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28(7):1721-1732.
33. Wong GT, Huang Z, Ji S, et al. Remifentanyl reduces the release of biochemical markers of myocardial damage after coronary artery bypass surgery: a randomized trial. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2010;24(5):790-796.
34. Leesar MA, Stoddard MF, Dawn B, et al. Delayed preconditioning-mimetic action of nitroglycerin in patients undergoing coronary angioplasty. *Circulation* 2001;103(24):2935-2941.
35. Moore E, Bellomo R. Erythropoietin (EPO) in acute kidney injury. *Ann Intensive Care* 2011;1(1):3.
36. Patel NS, Kerr-Peterson HL, Brines M, et al. Delayed administration of pyroglutamate helix B surface peptide (pHBSP), a novel nonerythropoietic analog of erythropoietin, attenuates acute kidney injury. *Mol Med* 2012;18:719-727.
37. Grenz A, Osswald H, Eckle T, et al. The reno-vascular A2B adenosine receptor protects the kidney from ischemia. *PLoS Med* 2008;5(6):e137.

38. Kumar S, Allen DA, Kieswich JE, et al. Dexamethasone ameliorates renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2009;20(11):2412-2425.
39. Alderliesten M, de Graauw M, Oldenampsen J, et al. Extracellular signal-regulated kinase activation during renal ischemia/reperfusion mediates focal adhesion dissolution and renal injury. *Am J Pathol* 2007;171(2):452-462.
40. Pai A, Heining M. Ketamine. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain* 2007;7(2):59-63.
41. Domino EF. Taming the ketamine tiger. 1965. *Anesthesiology* 2010;113(3):678-684.
42. Takenaka I, Ogata M, Koga K, et al. Ketamine suppresses endotoxin-induced tumor necrosis factor alpha production in mice. *Anesthesiology* 1994;80(2):402-408.
43. Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, et al. Ketamine suppresses proinflammatory cytokine production in human whole blood in vitro. *Anesth Analg* 1999;89(3):665-669.
44. Himmelseher S, Durieux ME. Ketamine for perioperative pain management. *Anesthesiology* 2005;102(1):211-220.
45. Roytblat L, Talmor D, Rachinsky M, et al. Ketamine attenuates the interleukin-6 response after cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg* 1998;87(2):266-271.
46. Beilin B, Rusabrov Y, Shapira Y, et al. Low-dose ketamine affects immune responses in humans during the early postoperative period. *Br J Anaesth* 2007;99(4):522-527.
47. Welters ID, Feurer MK, Preiss V, et al. Continuous S-(+)-ketamine administration during elective coronary artery bypass graft surgery attenuates pro-inflammatory cytokine response during and after cardiopulmonary bypass. *Br J Anaesth* 2011;106(2):172-179.
48. Molojavyi A, Preckel B, Comfere T, et al. Effects of ketamine and its isomers on ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Anesthesiology* 2001;94(4):623-629; discussion 625A-626A.
49. Mullenheim J, Frassdorf J, Preckel B, et al. Ketamine, but not S-(+)-ketamine, blocks ischemic preconditioning in rabbit hearts in vivo. *Anesthesiology* 2001;94(4):630-636.
50. Rusafa Neto E, Vianna PT, Viero RM, et al. Influence of S-(+)-ketamine analgesia in renal intraoperative ischemia: histological study in rats. *Acta Cir Bras* 2006;21(4):242-246.

REFERÊNCIAS

51. Center of drug evaluation and research. Guidance for Industry - Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. In: Services USDoHaH, Administration FaD, (CDER) CfDEaR, (eds): Food and Drug Administration; 2005.
52. Dobashi K, Singh I, Orak JK, et al. Combination therapy of N-acetylcysteine, sodium nitroprusside and phosphoramidon attenuates ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *Mol Cell Biochem* 2002;240(1-2):9-17.
53. Park Y, Hirose R, Dang K, et al. Increased severity of renal ischemia-reperfusion injury with venous clamping compared to arterial clamping in a rat model. *Surgery* 2008;143(2):243-251.
54. Delbridge MS, Shrestha BM, Raftery AT, et al. The effect of body temperature in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 2007;39(10):2983-2985.
55. Koyner JL, Murray PT. Mechanical ventilation and lung-kidney interactions. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3(2):562-570.
56. Ergun Y, Oksuz H, Atli Y, et al. Ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle: comparison of the effects of subanesthetic doses of ketamine, propofol, and etomidate. *J Surg Res* 2010;159(1):e1-e10.
57. Yun Y, Duan WG, Chen P, et al. Ischemic postconditioning modified renal oxidative stress and lipid peroxidation caused by ischemic reperfusion injury in rats. *Transplant Proc* 2009;41(9):3597-3602.
58. Jiang B, Liu X, Chen H, et al. Ischemic postconditioning attenuates renal ischemic/reperfusion injury in mongrel dogs. *Urology* 2010;76(6):1519 e1511-1517.
59. Serviddio G, Romano AD, Gesualdo L, et al. Postconditioning is an effective strategy to reduce renal ischaemia/reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23(5):1504-1512.
60. Szwarc I, Soullier S, Gayraud N, et al. Ischemic postconditioning prevents ischemic acute renal failure. *Transplant Proc* 2007;39(8):2554-2556.
61. Zhuang S, Lu B, Pang M. Postconditioning Does Not Improve Renal Function or Attenuate Tubular Damage in Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Kidney Injury in Mice. *The Open Pathol J* 2009;3:18-21.
62. Pallone TL, Zhang Z, Rhinehart K. Physiology of the renal medullary microcirculation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;284(2):F253-266.

63. Nishida M, Ieshima M, Konishi F, et al. Role of endothelin B receptor in the pathogenesis of ischemic acute renal failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002;40(4):586-593.
64. Lee HT, Gallos G, Nasr SH, et al. A1 adenosine receptor activation inhibits inflammation, necrosis, and apoptosis after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(1):102-111.
65. Mazar J, Rogachev B, Shaked G, et al. Involvement of adenosine in the antiinflammatory action of ketamine. *Anesthesiology* 2005;102(6):1174-1181.
66. Hansen PB, Hashimoto S, Oppermann M, et al. Vasoconstrictor and vasodilator effects of adenosine in the mouse kidney due to preferential activation of A1 or A2 adenosine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;315(3):1150-1157.
67. Yang CC, Chien CT, Wu MH, et al. NMDA receptor blocker ameliorates ischemia-reperfusion-induced renal dysfunction in rat kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;294(6):F1433-1440.
68. Pundir M, Arora S, Kaur T, et al. Effect of modulating the allosteric sites of N-methyl-D-aspartate receptors in ischemia-reperfusion induced acute kidney injury. *J Surg Res* 2013;183(2):668-677.
69. Leung JC, Marphis T, Craver RD, et al. Altered NMDA receptor expression in renal toxicity: Protection with a receptor antagonist. *Kidney Int* 2004;66(1):167-176.
70. Macedo E, Mehta RL. Biomarkers for acute kidney injury: combining the new silver with the old gold. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28(5):1064-1067.
71. Kennedy SE, Erlich JH. Murine renal ischaemia-reperfusion injury. *Nephrology (Carlton)* 2008;13(5):390-396.

APÊNDICE

Tabela 21 - Resultados dos exames histológicos dos rins direito e esquerdo dos grupos

	Ratos	Histologia			
		Direita		Esquerda	
		Lâmina	Escore	Lâmina	Escore
Grupo GS	1	1795/12	0	1796/12	0
	2	1797/12	0	1798/12	0
	3	1799/12	0	1800/12	0
	4	1801/12	0	1802/12	0
	5	1803/12	0	1804/12	0
	6	1805/12	0	1806/12	0
	7	1807/12	0	1808/12	0
	8	1809/12	0	1810/12	0
	9	1811/12	0	1812/12	0
	10	1813/12	0	1814/12	0
Grupo GC	11	1815/12	0	1816/12	0
	12	1817/12	0	1818/12	0
	13	1819/12	0	1820/12	0
	14	1821/12	0	1822/12	0
	15	1823/12	0	1824/12	0
	16	1825/12	0	1826/12	0
	17	1827/12	0	1828/12	0
	18	1829/12	0	1830/12	0
	19	1831/12	0	1832/12	0
	20	1833/12	0	1834/12	0
Grupo GP	21	1835/12	0	1836/12	1
	22	1837/12	0	1838/12	3
	23	1839/12	0	1840/12	2
	24	1841/12	0	1842/12	4
	25	1843/12	0	1844/12	1
	26	1845/12	0	1846/12	2
	27	1847/12	0	1848/12	4
	28	1849/12	0	1850/12	3
	29	1851/12	0	1852/12	3
	30	1853/12	0	1854/12	5
Grupo GCP	31	1855/12	0	1856/12	3
	32	1857/12	0	1858/12	1
	33	1859/12	0	1860/12	4
	34	1861/12	0	1862/12	3
	35	1863/12	0	1864/12	1
	36	1865/12	0	1866/12	3
	37	1867/12	0	1868/12	4
	38	1869/12	0	1870/12	2
	39	1871/12	0	1872/12	4
	40	1873/12	0	1874/12	4
	41	1875/12	0	1876/12	4

Tabela 22 - Peso (g), temperatura (°C), pressão arterial sistólica (mmHg), pressão arterial diastólica (mmHg) e pressão arterial média (mmHg) dos animais estudados nos diferentes momentos

Ratos	Peso	Temperatura (°C)			Pressão arterial sistólica			Pressão arterial diastólica			Pressão arterial média			
		M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3	
Grupo GS	1	500	36,0	39,2	38,3	127	84	87	117	29	31	120	47	50
	2	380	37,7	37,8	37,1	103	100	97	73	63	62	83	75	74
	3	380	38,5	38,6	38,9	137	138	127	99	100	72	112	113	90
	4	380	38,0	38,3	37,5	110	112	128	70	74	88	83	87	101
	5	300	38,7	37,4	36,9	140	125	131	102	91	91	115	102	104
	6	380	37,4	38,5	38,1	116	111	97	83	72	50	94	85	66
	7	490	36,0	37,3	37,1	115	128	114	80	88	76	92	101	89
	8	360	39,0	37,9	37,6	120	105	110	100	51	75	107	69	87
	9	470	37,2	39,0	38,5	124	98	91	89	70	48	101	79	62
	10	370	38,3	38,3	38,2	121	113	116	95	73	81	104	86	93
Grupo GC	11	500	36,0	37,0	36,4	133	107	114	97	75	82	109	86	93
	12	380	37,1	37,3	37,5	98	99	102	73	62	64	81	74	77
	13	370	37,9	37,9	38,5	103	102	116	83	80	92	90	87	100
	14	360	38,0	37,1	37,2	105	90	87	79	57	58	88	68	68
	15	480	37,3	37,2	36,9	92	97	114	57	54	79	69	68	91
	16	470	37,5	38,6	38,2	129	116	110	96	80	73	107	92	85
	17	450	37,5	38,4	37,9	99	106	127	64	73	90	76	84	102
	18	380	37,4	38,3	38,1	124	125	135	94	83	90	104	97	105
	19	480	37,4	38,2	37,7	117	124	102	94	90	66	102	101	78
	20	480	38,9	38,7	38,2	115	105	108	82	64	69	93	78	82
Grupo GP	21	420	38,1	37,6	37,9	123	110	130	79	65	75	94	80	93
	22	500	39,5	38,5	38,1	132	133	116	98	88	63	109	103	81
	23	410	39,6	38,5	37,5	102	104	115	62	57	72	75	74	86
	24	350	39,4	38,7	37,5	102	105	94	80	54	43	87	71	60
	25	410	37,1	38,3	38,5	78	79	78	45	33	28	56	48	45
	26	460	37,9	37,8	38,4	135	130	139	86	69	85	102	89	103
	27	420	37,0	38,7	37,9	118	104	88	87	70	44	97	81	59
	28	380	38,8	37,7	37,4	112	115	112	63	61	60	79	79	77
	29	430	37,9	37,9	37,8	123	90	127	96	45	82	105	60	97
	30	360	39,5	38,0	37,5	118	85	110	88	36	60	98	52	77
Grupo GCP	31	440	37,1	38,5	37,4	128	116	125	104	76	78	112	89	94
	32	330	38,5	37,2	37,8	107	89	93	90	40	56	96	56	68
	33	450	38,2	38,0	36,2	119	125	109	98	78	65	105	94	80
	34	490	36,5	38,2	36,7	100	94	102	74	51	60	83	65	74
	35	430	36,4	36,7	37,6	117	125	127	89	89	87	98	101	100
	36	420	38,8	38,7	38,1	111	85	96	88	34	51	96	51	66
	37	430	37,1	38,2	36,8	129	98	107	101	35	59	110	56	75
	38	440	37,7	37,3	37,4	110	112	126	75	82	90	87	92	102
	39	440	37,3	39,1	38,5	137	96	114	99	46	69	112	63	84
	40	490	37,4	38,8	38,5	139	96	126	115	51	75	123	66	92
	41	390	38,3	38,5	38,6	133	110	78	115	75	37	121	87	51

Tabela 23 - Variáveis bioquímicas (creatinina, NGAL, sódio e ureia,) dos animais estudados nos diferentes momentos de coleta

Ratos	Creatinina (mg.dL ⁻¹)			NGAL (ng.mL ⁻¹)			Sódio (mEq.L ⁻¹)			Ureia (mg.dL ⁻¹)			
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	
Grupo GS	1	0,3	1,1	0,4	5,06	69,65	209,46	132	136	133	44	62	43
	2	0,4	0,4	0,5	5,38	5,17	233,42	133	131	133	49	52	55
	3	0,4	0,6	0,6	4,64	24,77	171,12	126	131	139	67	75	44
	4	0,5	0,7	0,5	19,34	51,15	287,86	134	136	135	84	101	78
	5	0,4	0,5	0,7	3,23	6,03	222,01	132	122	132	48	65	45
	6	0,4	0,7	0,5	7,05	11,39	312,06	132	133	133	56	75	60
	7	0,4	0,6	0,7	2,94	4,64	214,33	134	133	133	45	54	47
	8	0,8	0,5	0,6	4,33	20,55	261,78	131	129	134	73	48	64
	9	0,4	0,5	0,6	3,52	3,13	178,54	131	129	137	40	53	61
	10	0,3	0,6	0,4	2,56	3,23	81,18	139	129	135	44	52	66
Grupo GC	11	0,4	0,6	0,6	5,60	3,13	269,72	127	133	134	50	60	62
	12	0,4	0,5	0,4	5,49	4,64	334,74	131	133	129	52	56	76
	13	0,3	0,4	0,6	2,19	3,42	174,39	123	132	134	44	56	69
	14	0,3	0,4	0,5	0,36	0,56	0,88	127	130	135	54	68	57
	15	0,4	0,5	0,6	7,26	7,83	277,06	130	132	133	51	57	55
	16	0,4	0,6	0,7	2,01	2,84	144,95	134	133	130	50	57	54
	17	0,3	0,6	0,6	6,36	8,29	270,26	135	135	139	51	59	56
	18	0,4	0,5	0,6	3,42	8,76	235,38	127	133	133	54	58	61
	19	0,3	0,5	0,5	16,45	5,49	272,40	134	136	132	47	55	65
	20	0,3	0,6	0,6	3,62	6,78	285,37	133	132	139	53	54	46
Grupo GP	21	0,4	1,0	1,0	14,14	52,35	284,72	129	129	131	50	66	134
	22	0,4	1,0	4,5	1,32	5,17	288,12	126	130	130	48	61	220
	23	0,4	0,8	1,1	3,03	11,15	296,71	127	125	128	56	75	156
	24	0,5	0,9	4,9	6,36	18,94	395,49	123	129	128	46	60	281
	25	0,5	1,0	1,8	6,10	10,91	276,92	130	129	129	41	53	83
	26	0,3	0,9	0,9	14,90	99,08	369,96	129	131	130	40	59	84
	27	0,4	1,0	4,8	7,60	25,18	399,18	132	130	130	39	49	211
	28	0,3	0,7	2,1	5,28	14,01	359,18	131	128	129	47	64	174
	29	0,3	0,1	1,3	4,85	16,32	386,85	131	128	125	46	57	132
	30	0,4	0,8	3,6	37,08	123,60	378,98	127	123	126	41	64	270
Grupo GCP	31	0,4	0,9	4,3	23,66	98,90	377,98	127	128	133	41	56	262
	32	0,4	0,9	0,8	4,93	25,33	361,39	132	126	131	45	66	102
	33	0,3	1,0	4,0	4,78	16,85	365,44	138	125	136	38	61	241
	34	0,4	0,9	1,4	2,63	15,67	381,79	134	132	136	49	70	148
	35	0,3	0,8	0,7	45,18	58,11	395,55	129	128	132	40	60	90
	36	0,5	1,2	4,8	31,53	50,46	385,46	130	134	132	47	64	255
	37	0,4	0,9	4,5	9,86	9,97	378,66	131	130	125	41	60	289
	38	0,7	0,9	1,2	9,23	372,28	345,87	133	130	133	51	64	112
	39	0,4	1,0	4,4	26,41	12,93	376,68	129	131	133	50	64	264
	40	0,5	1,0	4,2	64,20	39,50	399,12	128	131	127	57	68	237
	41	0,3	1,1	5,6	5,91	25,64	345,98	127	128	127	51	59	266

Protocolo da coleta de dados do experimento

QUATRO GRUPOS

Grupo S – Isoflurano + Nefrectomia direita

Grupo C - Isoflurano +Cetamina S(+) em infusão contínua + Nefrectomia direita

Grupo P – Isoflurano + Nefrectomia direita + Pós-condicionamento em ciclos I-R (2'2')

Grupo CP – Isoflurano + Cetamina S(+) em infusão contínua + Nefrectomia direita + Pós-condicionamento em ciclos I-R (2'2')

Data _____ Rato n° _____ Grupo _____ Peso _____

- 1) Indução Inalatória – Isoflurano 4% Oxigênio 100%
- 2) Infiltração de bupivacaína 0,125%
- 3) Incisão transversa (cervical)
- 4) Cateterização jugular/ carótida/ temperatura retal
- 5) Início de hidratação RL 3mL.Kg⁻¹.h⁻¹
- 6) Estabilização
- 7) Monitorização (M1)
PAS PAD PAM T FC
- 8) C1 – Coleta de 2mL de sangue (Uréia, creatinina, NGAL, sódio) com *bolus* 4mL RL
- 9) Início de infusão contínua de Cetamina S(+) 1,25mg.kg.h⁻¹ (grupos C e CP)
- 10) Infiltração de bupivacaína 0,125% (2mL/kg – analgesia)
- 11) Laparotomia e nefrectomia direita
- 12) Clampeamento renal por 30 minutos (grupos P e CP)
- 13) Monitorização (Novos dados) (M2)
PAS PAD PAM T FC
- 14) Desclampeamento em 3 ciclos de reperfusão de 2 minutos (solta/clampeia).
Depois reperfusão plena
- 15) Dados de monitorização (M3)
PAS PAD PAM T FC
- 16) C2 - Coleta de 2mL de sangue (após reperfusão de 30 minutos) + *bolus* RL
- 17) Retirada dos acessos venoso e arterial. Fechamento cervical
- 18) Acordar o rato
- 19) Dia seguinte (24h após) – Indução
- 20) C3- Última coleta
- 21) Sacrifício