



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

Vinícius Monteiro Arantes

Avaliação do efeito do pré e pós-condicionamento em
modelo de isquemia renal transitória: estudo
comparativo experimental em ratos

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em Anestesiologia.

Orientadora: Profa Titular Norma Sueli Pinheiro Módolo

Botucatu

2016

Vinícius Monteiro Arantes

Avaliação do efeito do pré e pós-condicionamento
em modelo de isquemia renal transitória:
estudo comparativo experimental em ratos

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Anestesiologia.

Orientadora: Profa Titular Norma Sueli Pinheiro Módolo

Botucatu

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Arantes, Vinicius Monteiro.

Avaliação do efeito do pré e pós-condicionamento em modelo de isquemia renal transitória : estudo comparativo experimental em ratos / Vinicius Monteiro Arantes. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Norma Sueli Pinheiro Módolo
Capes: 40102130

1. Rins - Doenças. 2. Insuficiência renal aguda. 3. Pré-condicionamento isquêmico. 4. Pós-condicionamento isquêmico. 5. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Pré-condicionamento isquêmico; Lesão renal aguda; Pós-condicionamento isquêmico; Ratos; Rim .

Dedicatória

À minha mãe, Maria Marluce Monteiro Arantes, pelo exemplo de determinação e dedicação aos estudos, que me impulsionaram a ser um profissional cada vez mais qualificado e dedicado.

Aos meus irmãos e amigos, pelo companheirismo, incentivo e pela companhia divertida nos momentos mais amenos.

Ao meu pai, Geraldo Ferreira Arantes, e aos meus avós, por acreditarem e vivenciarem meus sonhos.

Agradecimento Especial

“A mente que se abre a uma nova idéia

jamaiz voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

À Dra Norma Sueli Pinheiro Módolo, orientadora, amiga e segunda mãe, por me ensinar ciência, ética e cidadania ao longo de nove anos de convivência. Uma amizade eterna e uma gratidão ímpar pelo carinho com que abriu as portas de sua sala e de sua vida para um aprendiz.

Agradecimentos

À Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), por ser instituição de excelência que me acolheu como discente em toda a minha formação acadêmica: graduação, especialização e pós-graduação.

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

À professora Maria Aparecida Domingues, pela colaboração na avaliação histológica.

À professora Lídia Raquel de Carvalho, pela colaboração na análise estatística.

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

À Renata T. Bueno e Renata P. Módolo, alunas de iniciação científica, pelo auxílio na realização da pesquisa.

“A vitória não pertence aos mais fortes, mas sim aos que a perseguem por mais tempo !”

Napoleão Bonaparte

Monteiro Arantes V. Avaliação do efeito do pré e pós-condicionamento em modelo de isquemia renal transitória: estudo comparativo experimental em ratos [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2016. 75p.

Resumo

Introdução: a lesão por isquemia-reperfusão (LIR) é uma importante causa de lesão renal aguda experimentada na prática clínica. A restauração da perfusão aos tecidos após um período de isquemia inicia uma cascata de inflamação associada ao acúmulo de íons, formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), disfunção endotelial e ativação imune. O condicionamento isquêmico é a aplicação de breves ciclos de interrupção seguidas de restauração do fluxo sanguíneo, tendo o objetivo de adaptar os tecidos à isquemia. Pode ser aplicado antes do estímulo principal, como pré-condicionamento (PCI), ou depois, sendo denominado pós-condicionamento (PCol).

Metodologia: estudo experimental realizado com 40 ratos wistar, divididos em cinco grupos para análise comparativa: Sham (S): laparotomia; Controle (C): laparotomia e 30 min de isquemia; Pré-condicionamento (PRE): laparotomia, PCI e 30 min de isquemia; Pré e Pós-condicionamento (PRE/POS): laparotomia, PCI, 30 min de isquemia e PCol; Pós-condicionamento (POS): laparotomia, 30 min de isquemia e PCol. A comparação entre os grupos foi realizada pela análise bioquímica sérica de creatinina, ureia, lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL) e histologia.

Resultados: apenas o grupo Sham apresentou valores estatisticamente menores dos marcadores de lesão renal e menor incidência de lesão tubular renal à histologia ($S < C = PRE = PRE/POS = POS$).

Discussão e conclusão: no presente estudo, o PCI e o PoCI, isoladamente ou em conjunto, foram incapazes de prevenir dano estrutural tubular renal. A duração do período isquêmico é um aspecto crítico nas estratégias de condicionamento. Os resultados encontrados indicam que o condicionamento pode não melhorar os desfechos, e em alguns casos pode ser prejudicial.

Palavras-chave: pré-condicionamento isquêmico; pós-condicionamento isquêmico; rim; ratos; lesão renal aguda

Monteiro Arantes V. Effects of Ischemic Preconditioning and Postconditioning in an Ischemia-Reperfusion Model: A Comparative Experimental Study in Rats. [PhD thesis]. Botucatu: Botucatu Medical School, UNESP-Univ Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2016. 75p.

Abstract

Background: Ischemia-reperfusion injury (IRI) is an unavoidable aspect of transplantation, as well as an important cause of acute kidney injury in clinical practice. Restoration of the blood supply after an ischemic period activates an inflammatory cascade associated with multiple processes, including ion accumulation, free reactive oxygen species (ROS) formation, endothelial dysfunction, and immune activation. Ischemic “conditioning” refers to the application of a brief series of ischemic periods followed by reperfusion in the setting of major ischemia. In ischemic preconditioning (IPC), the conditioning stimulus is applied before the major ischemic event, whereas in ischemic postconditioning (IPoC), it is applied after the event.

Methods: Forty Wistar rats were randomized into five groups: Sham (S): laparotomy; Control (C): laparotomy and 30 min ischemia; Preconditioning (PRE): laparotomy, IPC, and 30 min ischemia; Preconditioning and Postconditioning (PRE/POST): laparotomy, IPC, 30 min ischemia, and IPoC; Postconditioning (POST): laparotomy, 30 min ischemia, and IPoC. Serum analyses of creatinine and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) were performed, and renal histology was also examined.

Results: Severe tubular injury and increases in creatinine were observed in all groups except the S group, and no significant differences were detected between the other groups ($S < C = PRE = PRE/POST = POST$).

Conclusions: IPC and IPoC, together or separately, were unable to exert a protective effect against tubular cell injury and preserve kidney function. The duration of the ischemic period is a critical aspect of the conditioning strategy. Our results indicate that conditioning may not improve the outcome, and it may even be harmful.

Key Words: Ischemic preconditioning, Ischemic postconditioning, Kidney, Rats, Acute kidney injury.

Lista de Tabelas

Tabela 1	Interação entre os dados de sinais vitais e coletas de exames de acordo com o tempo cirúrgico.....	35
Tabela 2	Grau de lesão renal segundo Park et al.....	36
Tabela 3	Animais necessários para se obter resultados estatisticamente significantes.....	36
Tabela 4	Média e desvio-padrão referentes ao peso (em gramas) por grupo de estudo.....	38
Tabela 5	Média e desvio-padrão para a variável temperatura	39
Tabela 6	Média e desvio-padrão referentes à PAM (mmHg) segundo momento e grupo.....	41
Tabela 7	Análise longitudinal do biomarcador NGAL plasmático (ng.ml ⁻¹).....	43
Tabela 8	Análise longitudinal da Crp (mg.dl ⁻¹).....	45
Tabela 9	Análise longitudinal da Urp (mg.dl ⁻¹).....	47
Tabela 10	Frequência absoluta e percentual de LRA, segundo a classificação AKIN nos grupos de estudo.....	49
Tabela 11	Mediana, primeiro e terceiro quartis dos graus histológicos, utilizando-se a classificação de necrose tubular proposta por Park et al.....	50
Tabela 12	Características de estudos experimentais com PCI.....	58

Lista de Figuras

Figura 1	Processos biológicos associados à lesão por isquemia-reperfusão.....	14
Figura 2	Mecanismos de ação do PCI e do PCol.....	17
Figura 3	Comparação entre os critérios de RIFLE e AKIN....	22
Figura 4	Algoritmo experimental apresentando os grupos de intervenção.....	27
Figura 5	Animal sendo anestesiado na campânula.....	28
Figura 6	Aparelho de anestesia Ohmeda Excel 210 SE e vaporizador calibrado Isotec 5 Ohmeda.....	29
Figura 7	Bomba para infusão de volume no intraoperatório..	30
Figura 8	Monitor Datex Engstrom para aferição dos valores de PAM, T° e FP.....	30
Figura 9	Animal anestesiado e monitorizado, pronto para o procedimento experimental.....	33
Figura 10	Laparotomia com exposição do hilo renal esquerdo	34
Figura 11	Temperatura média (°C) referente aos tempos e momentos.....	39
Figura 12	PAM (mmHg) referente aos grupos e momentos.....	41
Figura 13	<i>Boxplot</i> para NGAL (ng.mL ⁻¹) por grupo de estudo e momento.....	43
Figura 14	<i>Boxplot</i> para Crp (mg.dL ⁻¹) por grupo de estudo e momento.....	45
Figura 15	<i>Boxplot</i> para Urp (mg.dL ⁻¹) por grupo de estudo e momento.....	47
Figura 16	Microscopia óptica representativa dos rins esquerdos corados com hematoxilina e eosina.....	51

Lista de Abreviaturas e Siglas

AKIN:	<i>Acute Kidney Injury Network</i>
AMPC:	Monofosfato cíclico de adenosina
BPM:	Batimentos por minuto
C:	Grupo controle
Crp:	Creatinina plasmática
CEP:	Célula epitelial progenitora
COX -2:	Ciclo-oxigenase 2
DP:	Desvio padrão
ELISA:	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
eNOS:	Óxido nítrico sintetase endotelial
ERO:	Espécies reativas de oxigênio
FiO ₂ :	Fração inspirada de oxigênio
FP:	Frequência de pulso
GA:	Gauges
G-PCR:	Receptor acoplado a proteína G
GST:	Glutadiona-S-trasferase
IL-18:	Interleucina 18
iNOS:	Inibidor da óxido nítrico sintetase
IRA:	Insuficiência renal aguda
K _{ATP} :	Canais de potássio ATP dependentes
KIM -1:	Molécula de lesão renal-1

LIR:	Lesão por isquemia-reperfusão
LRA:	Lesão renal aguda
PTPM:	Poros de transição da permeabilidade mitocondrial
min:	minutos
NF- κ B:	Fator nuclear kappa B
NOS:	Óxido nítrico sintetase
PAM:	Pressão arterial média
PCI:	Pré-condicionamento isquêmico
PCol:	Pós-condicionamento isquêmico
PRÉ:	Grupo do pré-condicionamento
PRÉ/PÓS:	Grupo do pré-condicionamento associado ao pós-condicionamento
PÓS:	Grupo do pós-condicionamento
RIFLE:	<i>Risk, injury, failure, loss, end-stage kidney disease</i>
RISK:	<i>Reperfusion-injury salvage kinase</i>
S:	Grupo Sham
SAFE:	<i>Survivor activating factor enhancement</i>
T°:	Temperatura
TNF α :	Fator de necrose tumoral alfa
UNESP:	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Urp:	Uréia plasmática

Sumário

Lista de Tabelas	
Lista de Figuras	
Lista de Abreviaturas e Siglas	
1. Introdução	13
1.1 Lesão por isquemia-reperusão	13
1.2 Pré-condicionamento isquêmico	15
1.3 Pós-condicionamento isquêmico	19
1.4 Lesão renal aguda	21
1.5 Biomarcadores	22
1.6 Hipótese do estudo	24
2. Objetivos	25
2.1 Primário	25
2.2 Secundário	25
3. Materiais e Métodos	26
3.1 Grupos experimentais	26
3.2 Anestesia e monitorização	28
3.3 Sequência experimental	31
3.4 Coleta de dados	34
3.4 Análise da presença de LRA	35
3.5 Análise histológica	35
3.7 Análise estatística	36
4. Resultados	38
4.1 Peso	38
4.2 Frequência de pulso	38
4.3 Temperatura	39
4.4 Pressão arterial média (PAM)	41
4.5 NGAL	43
4.6 Creatinina plasmática	45
4.7 Ureia plasmática	47
4.8 Lesão renal aguda	49
4.8 Análise histológica	50
5. Discussão	53
5.1 Modelo animal e perfil da amostra	53
5.2 Correlação entre achados bioquímicos e histológicos...	57
5.3 Algoritmo aplicado e suas interações	58
6. Considerações finais	62
7. Conclusão	63
8. Referências	64

1 Introdução

1.1 Lesão por isquemia-reperfusão

A restauração da perfusão tecidual dos órgãos após certo período de isquemia resulta em dano ao parênquima, sendo habitualmente conhecido como lesão por isquemia-reperfusão (LIR)⁽¹⁾. Esse mecanismo agressor contribui para várias afecções encontradas na prática clínica.

Ainda que a LIR relativa ao coração seja a mais pesquisada, sua relevância não se restringe à doença isquêmica cardíaca. A lesão também está presente em cada doença na qual o suprimento sanguíneo ao órgão ou ao tecido foi comprometido e posteriormente restaurado⁽²⁾.

O período crítico de isquemia depende do órgão-alvo: varia de 15min a 20min no fígado e nos rins; 2h30min no músculo esquelético; e no caso da isquemia cerebral, mais de 5min é suficiente para determinar morte neuronal⁽¹⁾.

De fato, uma ampla gama de processos lesivos está associada à LIR (Figura 1). A disponibilidade limitada de oxigênio (hipóxia), que ocorre durante o período de isquemia, ocasiona prejuízos na função da barreira endotelial celular devido à redução na atividade da adenilato ciclase e na concentração intracelular de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), com aumento concomitante na permeabilidade vascular^(3,4).

Além disso, a isquemia determina a ativação da morte celular programada, incluindo apoptose, ou seja, associada à autofagia e à necrose⁽⁵⁾. Durante esse período, também ocorrem alterações significativas no controle transcricional da expressão gênica (reprogramação transcricional), como a inibição das enzimas proil hidroxilase (PHD) sensíveis ao oxigênio, pois requerem este como um cofator. A inibição das enzimas PHD conduz à ativação de cascatas de sinalização inflamatória, que controlam a estabilidade dos fatores de transcrição de um importante mediador: o fator nuclear kappa B (NF-kB), uma proteína da família dos fatores transcriptores que está relacionada ao controle das respostas inflamatórias e da proliferação celular⁽⁶⁾.

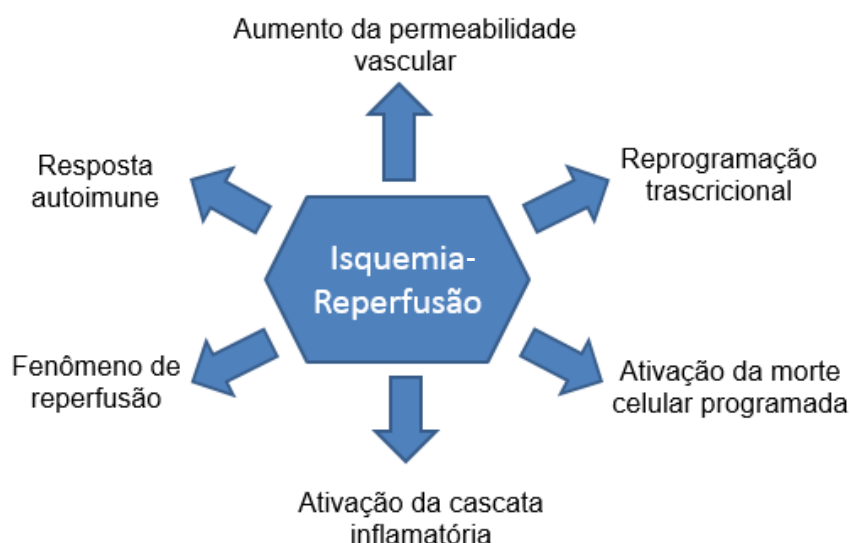


Figura 1 – Processos biológicos associados à lesão por isquemia reperfusão; Adaptado de Eltzschig et al.⁽³⁾.

Apesar da restauração eficaz do suprimento vascular, um órgão isquêmico pode não recuperar imediatamente sua perfusão. Nos rins, a disfunção microvascular das células endoteliais dos capilares peritubulares inibe a reperfusão renal pós-isquêmica⁽⁷⁾. Em seguida ao período de isquemia, os tecidos adaptam-se ao metabolismo anaeróbico.

A restauração do suprimento sanguíneo resulta em oferta de oxigênio superior à demanda, ativando os macrófagos e, conseqüentemente, gerando radicais superóxido, comumente conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO), causando estresse oxidativo. O aumento das EROs é o fator desencadeante para iniciar as alterações induzidas pela reperfusão, levando à lesão endotelial, à produção de citocinas pró-inflamatórias e, mais tardiamente, à ativação e ao recrutamento de neutrófilos⁽¹⁾.

Além disso, a lesão por reperfusão é caracterizada por respostas autoimunes, incluindo o aparecimento de anticorpos contra neoantígenos anteriormente naturais e a subsequente ativação do sistema complemento, constituindo a autoimunidade⁽⁸⁾. Apesar de a LIR tipicamente acontecer em um ambiente estéril, a ativação da resposta imune inata e adaptativa ocorre e contribui para a lesão.

Na prática clínica, a LIR é causa frequente de insuficiência renal aguda (IRA), um problema grave e comum que afeta mais de 5% dos pacientes hospitalizados, sendo estimado que sua prevalência aumente nos próximos anos⁽⁷⁾. Além de causar um aumento na mortalidade, o desenvolvimento de IRA prolonga o tempo de internação hospitalar e eleva os custos relacionados à saúde. A IRA acomete principalmente a função e a estrutura das células tubulares renais⁽⁹⁾.

A disfunção renal secundária a LIR é uma grande preocupação em pacientes anestesiados submetidos à cirurgia envolvendo o rim ou a aorta. Particularmente nas cirurgias urológicas, a LIR ainda permanece como um problema importante e que precisa ser evitado. O clampeamento do pedículo renal é necessário em algumas cirurgias complexas, como transplante renal e nefrolitotomia, e seus efeitos podem ser potencializados em vigência de lesão renal prévia ou infecção⁽¹⁰⁾. No transplante de órgãos, o objetivo é iniciar a reperfusão o mais cedo possível. O atraso no retorno ao funcionamento do rim frequentemente traz complicações ao processo, entre elas internação prolongada, rejeição aguda e possivelmente perda tardia da função do enxerto⁽¹¹⁾.

1.2 Pré-condicionamento isquêmico

Órgãos que experimentam isquemia, como a que acontece na LIR se tornam resistentes a lesões futuras, levando a introdução do conceito de “condicionamento”: que se caracteriza por uma série de períodos isquêmicos breves, seguidos por reperfusão, aplicados em um cenário em que haverá um evento isquêmico maior. Quando o “condicionamento” é prévio a esse evento, é denominado pré-condicionamento isquêmico (PCI)⁽¹²⁾.

A terminologia PCI foi utilizada pela primeira vez na pesquisa realizada por Murry et. al.⁽¹³⁾ em 1986. Os autores descreveram que houve diminuição de 75% da área de infarto miocárdico após quatro ciclos de 5min de oclusão da artéria coronária, seguidos por 5min de reperfusão antes de uma isquemia prolongada de 40min. Seguindo este estudo, Reimer et al.⁽¹⁴⁾ fizeram uma

pesquisa em cães no mesmo ano, demonstrando que quatro séries de 10min de oclusão da artéria circunflexa levava a uma perda de 61% dos estoques de ATP, valor significativamente menor que os 87% de perda encontrados em uma oclusão contínua de 40min. Dessa forma, os autores confirmaram que, ao invés de causar piora na lesão miocárdica, os episódios repetidos de breves períodos de isquemia e reperfusão resultaram em uma diminuição da mobilização das moléculas de armazenamento de energia. Desde então, essas pesquisas levaram a uma série de outras com o objetivo de elucidar os mecanismos envolvidos e transferir essas informações para a prática clínica⁽¹⁵⁾.

O benefício do PCI aparentemente não era específico ao miocárdio. Estudos demonstraram tolerância à isquemia em outros tecidos, incluindo pulmão (Li et al., 1999)⁽¹⁶⁾, fígado (Hardy et al., 1996)⁽¹⁷⁾ e rim (Cochrane et al., 1999)⁽¹⁸⁾. Nos rins, o PCI foi efetivo em reduzir a lesão renal em várias espécies animais, como camundongos⁽¹⁹⁾, ratos⁽²⁰⁾, porcos⁽²¹⁾, cães⁽²²⁾ e coelhos⁽²³⁾.

Vários mecanismos foram propostos (Figura 2) para explicar os meios pelos quais o PCI promove uma resposta protetora nos tecidos. O primeiro está associado à liberação de autacoides (incluindo adenosina, opioides e bradicinina), que se ligam aos receptores de superfície celular acoplados à proteína G (G-PCRs). A ativação dos G-PCRs leva ao início da primeira via, a das quinases de salvamento da lesão por reperfusão (*reperfusion injury salvage kinase* – RISK)⁽²⁾.

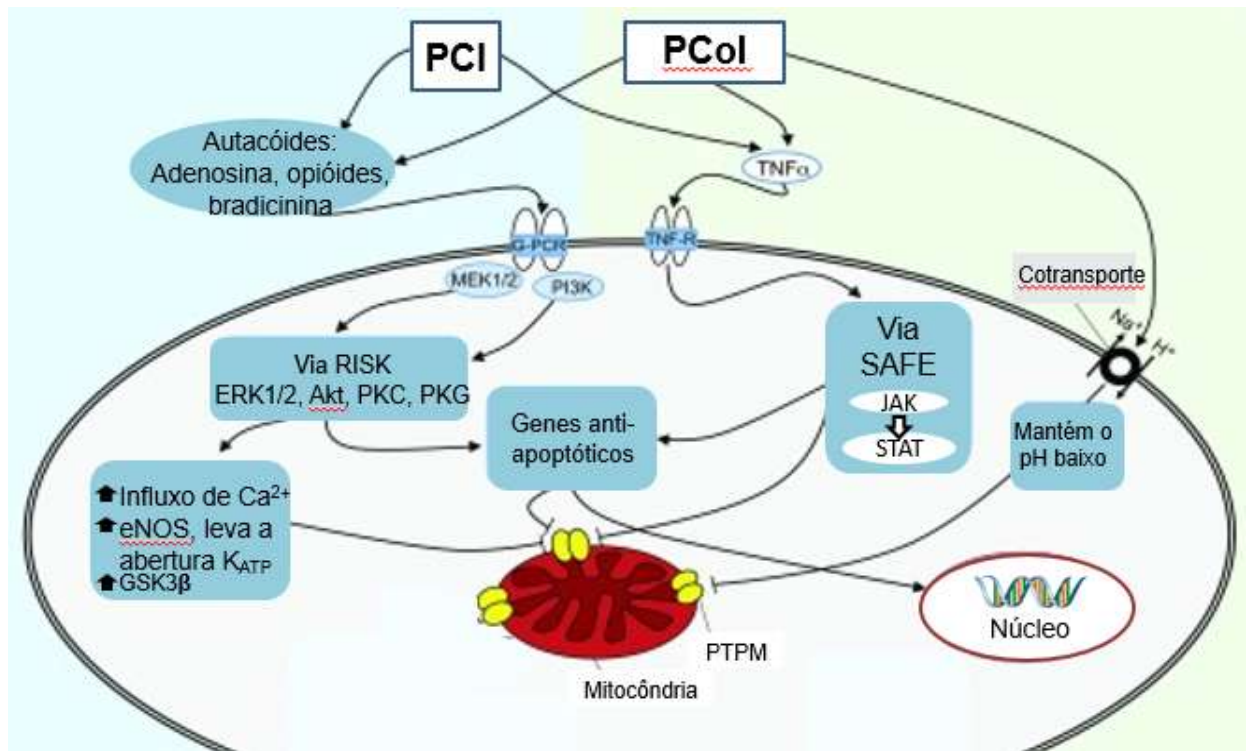


Figura 2 - Mecanismos de ação do PCI e do PCol; Adaptado de McCafferty *et al. Dis Model Mech.* 2014. Abreviaturas: Akt, proteína quinase serina/treonina; eNOS, óxido nítrico sintetase; ERK ½, quinases reguladoras de sinal extracelular; G-PCR, receptor acoplado a proteína G; GSK3β, glicogênio sintetase quinase-3β; JAK, Janus quinase; K_{ATP}, canais de potássio ATP dependentes; MEK ½, proteína quinase de mitógeno ativado; PI3K, 3-quinase fosfatidilinositol (4,5)-bifosfonado; PKG, proteína quinase dependente de GMPc; PTPM, poro de transição da permeabilidade mitocondrial; STAT3, transdutor de sinal e ativador de transcrição 3; TNFα: fator de necrose tumoral alfa; TNFR, receptor de TNF.

A via RISK é pró-salvamento, caracterizada por um conjunto de proteínas quinases antiapoptose (ERK ½, Akt e PKG) que é ativado no momento da reperfusão miocárdica⁽²⁴⁾. A ativação desta via leva à citoproteção por meio da inibição de caspases⁽²⁵⁾, da liberação de citocromo c⁽²⁶⁾, da indução de genes antiapoptóticos, do aumento na captação de cálcio, da ativação da sintetase de óxido nítrico (NOS) endotelial, da ativação de canais de potássio ATP dependentes nas mitocôndrias (K_{ATP}), entre outros.

Mais recentemente, foi descoberta uma segunda via: a de aperfeiçoamento da ativação do fator de salvamento (*survivor activating factor enhancement* – SAFE), envolvendo o fator de necrose tumoral alfa (TNFα) e a cascata JAK-STAT (uma via de sinalização para citocinas e fatores de

crescimento que estimula a proliferação celular). Foi demonstrado que esta via protege os tecidos, independentemente da via RISK^(27,28). As vias RISK e SAFE convergem e inibem a abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial (PTPM), cuja formação ocorre durante a reperfusão e deflagra o sinal para a apoptose. Essa parece ser a via comum efetora final para a proteção tecidual⁽²⁾.

Os efeitos protetores após o estímulo do PCI incluem duas fases distintas: a precoce, que se inicia imediatamente, tem duração de uma a duas horas⁽²⁹⁾, independe de síntese proteica e está associada à ativação de receptores de adenosina, canais K_{ATP} e translocação de 5'-nucleotidase da superfície da célula⁽³⁰⁾; e a tardia, que começa entre 12 e 24 horas após o estímulo inicial e persiste por vários dias⁽³¹⁾. Acredita-se que o atraso no início da fase tardia é devido à necessidade de nova síntese proteica, como ciclo-oxigenase 2 (COX-2), inibidor da sintetase de óxido nítrico (iNOS), e heme oxigenase-1, proteínas que seriam as mediadoras dos efeitos citoprotetores⁽³²⁾.

Os mecanismos conhecidos para o PCI foram descobertos quase exclusivamente a partir de estudos envolvendo o miocárdio. Considerando que o PCI parece ser um mecanismo citoprotetor ubíquo que confere proteção aos tecidos em diversos modelos diferentes de isquemia tecidual, incluindo o rim, infere-se que os mecanismos são os mesmos entre os órgãos⁽¹⁵⁾. No entanto, parece haver alguma disparidade entre os resultados obtidos no coração e no rim. Adenosina exógena aparenta ser renoprotetor, assim como no miocárdio; enquanto que, antagonistas da adenosina não parecem abolir os efeitos protetores do PCI no rim⁽³³⁻³⁵⁾. Além disso, a bradicinina e os opioides falharam em reduzir LIR renal como demonstrado no miocárdio⁽³⁶⁾. De qualquer forma, há evidências que sugerem que os mecanismos envolvidos na via RISK do miocárdio juntamente com os mediadores de PCI no coração, como iNOS⁽³⁷⁾ e heme oxigenase-1⁽³⁸⁾, também parecem estar envolvidos na renoproteção do PCI.

Patschan et al.⁽³⁹⁾, na tentativa de elucidar as alterações morfológicas teciduais envolvidas na fase tardia, demonstraram que a lesão isquêmica aguda pode mobilizar células epiteliais progenitoras (CEPs), que

transitoriamente alojam-se no baço e posteriormente acumulam-se nos rins. O PCI parece facilitar essa passagem e as CEPs podem proteger e reparar o dano aos órgãos pela diferenciação em células endoteliais, regenerando novos vasos sanguíneos, e por outros mecanismos parácrinos que estimulam a angiogênese⁽⁴⁰⁾.

Entretanto, a aplicabilidade do PCI na prática clínica vem encontrando algumas limitações. A necessidade de acesso direto ao suprimento sanguíneo do órgão de risco e a previsibilidade do evento isquêmico principal tornam o PCI aplicável apenas nos casos controlados e eletivos⁽²⁾. Com o objetivo de produzir uma alternativa a essas situações novas, algumas estratégias de condicionamento foram desenvolvidas.

1.3 Pós-condicionamento isquêmico

Em 2003, Zhao et al.⁽⁴¹⁾ estenderam o paradigma do condicionamento ao demonstrarem, por meio de um modelo miocárdico em cães, que a intervenção no ponto de reperfusão com três ciclos de 30 segundos de oclusão/reperfusão da artéria coronária poderia reduzir a área de infarto do miocárdio em 44%. Esse fenômeno foi denominado pós-condicionamento isquêmico (PCol).

Assim como o PCI, o PCol parece conferir profunda proteção tecidual entre as espécies⁽⁴²⁻⁴⁵⁾ e, ainda que a ampla maioria dos estudos tenha o coração como órgão de interesse, o PCol tem demonstrado efeito protetor em muitos outros órgãos, incluindo o rim⁽⁴⁶⁾. Quando aplicado na artéria renal, o PCol foi capaz de reduzir apoptose, lesão tubular e concentrações plasmáticas de ureia (Urp) e creatinina (Crp), além de induzir a uma redução na fibrose renal até 12 semanas após a lesão⁽⁴⁷⁾.

Os mecanismos envolvidos na proteção celular induzidos pelo PCol também foram majoritariamente estudados no coração e guardam muitas semelhanças com o PCI, inclusive utilizando vias de sinalização comuns (Figura 2). O PCol também permite a ativação das vias SAFE e RISK via autacoides, incluindo adenosina^(48,49), opioides⁽⁵⁰⁾, bradicinina⁽⁵¹⁾ e eNOS⁽⁵²⁾, o que ocasiona a inibição da abertura do PTPM, que, assim como no PCI, é considerado a via comum efetora final^(53,54).

Entretanto, um mecanismo adicional é conhecido: a interrupção da reperfusão pelo PCol atrasa a normalização do pH intracelular, diminui a sobrecarga de cálcio e inibe a explosão oxidativa encontrada na reperfusão⁽⁵⁵⁾, levando à citoproteção devido à rápida normalização do pH intracelular no ponto da reperfusão, sendo paradoxalmente prejudicial.

Existem poucos dados avaliando os mecanismos do PCol especificamente nos rins. No entanto, assim como no coração, os estudos com modelo renal demonstraram que há associação com a sinalização mediada por opioides⁽⁵⁶⁾, além da fosforilação das proteínas quinases ERK e Akt⁽⁵⁷⁾, da abertura dos canais mitocondriais K_{ATP} e da inibição da abertura do PTPM⁽⁵⁸⁾.

Zhang et al.⁽⁵⁸⁾ mensuraram o potencial de membrana mitocondrial para examinar os PTPM. Eles observaram que, após o PCol, havia um potencial de membrana mais alto se comparado aos que sofreram LIR simples. A queda do potencial de membrana após LIR está correlacionada à formação de PTPMs; portanto, poderia ser utilizada como parâmetro de dano mitocondrial. Além disso, no mesmo estudo os autores apontam o envolvimento dos K_{ATP} no PCol em modelo renal, ao observar a diminuição do efeito protetor quando um inibidor seletivo dos K_{ATP} (5-hidroxidecanoato) foi administrado.

O surgimento do PCol como uma alternativa ao PCI foi muito conveniente. A possibilidade de realizar uma intervenção no início da reperfusão tornou a abordagem mais controlável e clinicamente aplicável⁽¹¹⁾. Porém essa técnica ainda não foi incorporada à prática clínica por algumas razões: ausência de um algoritmo definido, grande variação de espécies animais utilizadas nas pesquisas, ausência de interação com comorbidades ao utilizar animais saudáveis e impossibilidade de testar a isquemia fria (presente durante transplantes renais de doador cadáver). Talvez a análise dos estudos experimentais seja a chave para o sucesso da transposição clínica dos bons resultados. Para tal, é necessário avaliar e comparar de que forma o PCI e o PCol comportam-se em um cenário de lesão renal aguda (LRA).

1.4 Lesão renal aguda

A LRA é caracterizada como uma redução abrupta da função renal. É uma enfermidade multifatorial de incidência variável, dependendo dos critérios utilizados para sua definição⁽⁵⁹⁾. No cenário hospitalar, muitas vezes está associada à LIR, principalmente no período perioperatório. A taxa de mortalidade permanece entre 20% e 40% para todos os casos de LRA⁽⁶⁰⁾. A redução dessas taxas tem sido destacada não apenas pelos avanços conquistados na terapêutica medicamentosa, intervencionista e em terapias renais substitutivas⁽⁶¹⁾, mas também pela padronização do conceito de LRA.

A partir de um consenso sobre a definição de LRA, proposto por um grupo de trabalho multinacional de Iniciativa de Qualidade de Diálise Aguda (ADQI) em 2004, Bellomo et al.⁽⁶²⁾ estabeleceram os critérios de classificação RIFLE, um acrônimo em inglês para *risk, injury, failure, loss, end-stage kidney disease*. Este consenso definiu a LRA baseando-se nos valores de Crp e/ou débito urinário, além de universalizar e padronizar os critérios diagnósticos. Assim, pela primeira vez foram estratificados os graus de comprometimento renal (Figura 3).

Em 2007, o grupo multidisciplinar AKIN (*Acute Kidney Injury Network*)⁽⁶³⁾ publicou uma atualização destes critérios com o objetivo de tornar o diagnóstico mais precoce e, conseqüentemente, antecipar as medidas de recuperação. Essa classificação também é fundamentada em critérios baseados no fluxo urinário e na creatinina sérica e são utilizadas para a identificação do estágio de comprometimento da função renal. As modificações propostas incluem: a) a remoção dos critérios de prognóstico e a designação dos critérios de gravidade como estágios 1, 2 e 3; b) a ampliação da categoria *Risk*, do RIFLE, a fim de incluir um aumento na Crp de no mínimo 0,3 mg.dL⁻¹. As duas classificações estão descritas na figura 3.

RIFLE		Acute Kidney Injury Network	
	Creatinina/RFG		Débito Urinário (DU)
<u>R</u> isk	Aumento Cr > 50% ou RFG diminui > 25%	Estágio 1	Aumento Cr > 50% ou ≥ 0,3mg/dL
<u>I</u> njury	Aumento Cr > 100% ou RFG diminui > 50%	Estágio 2	Aumento Cr > 100%
<u>F</u> ailure	Aumento Cr > 200% ou RFG diminui > 75% ou Cr ≥ 4mg/dL (com aumento agudo ≥ 0,5mg/dL)	Estágio 3	Aumento Cr > 200% ou Cr ≥ 4mg/dL (com aumento agudo ≥ 0,5mg/dL)
<u>L</u> oss	Lesão renal aguda persistente=perda completa de função renal > 4 semanas		
<u>E</u> SKD	Doença renal terminal		
			Pacientes que recebem terapia de reposição renal (TRR) apresentam critérios para estágio 3, independente do estágio que se encontravam no início da TRR

Figura 3 - Comparação entre os critérios de RIFLE e AKIN; Adaptado de Bellomo *et al.* 2004(63) e Mehta *et al.* 2007(64) Risk - Risco; Injury - Dano; Failure - Falência; Loss - Perda; ESKD - Doença renal terminal; Cr – Creatinina

1.5 Biomarcadores

A Crp e o débito urinário são comumente utilizados para indicar disfunção renal, apesar das limitações conhecidas. A Crp é uma substância endógena e a dosagem de sua concentração plasmática é utilizada como uma forma indireta de aferir a adequação da filtração glomerular. Ela é produto do metabolismo da creatina e da fosfocreatina no músculo esquelético, porém seus níveis podem sofrer alteração pela ingestão de determinados alimentos, apresentando produção e liberação no sangue variáveis. Em pacientes com função renal estável, os valores plasmáticos da creatinina são quase constantes, com variação de cerca de 8%⁽⁶⁴⁾.

A Crp também é o biomarcador mais utilizado e o padrão ouro para diagnóstico de alteração funcional renal. Entretanto, é considerado pouco sensível no início da lesão renal aguda, pois o aumento dos níveis séricos de Crp é observado quando ocorre lesão dos néfrons funcionantes. O tempo necessário para que isso ocorra varia entre 24 e 72 horas⁽⁶⁵⁾. Além disso, a Crp

pode sofrer interferência de vários fatores, como: idade, sexo, massa e metabolismo muscular e grau de hidratação. A utilização da dosagem de Crp como marcador da função renal exige medidas seriadas e sua elevação não é critério isolado para a LRA, mas está associada à alta mortalidade, ao declínio funcional, ao aumento de custo de tratamento e à hospitalização prolongada⁽⁶⁴⁻⁶⁶⁾.

A limitação na utilização da Crp como biomarcador em algumas situações na prática clínica motivou a busca e a validação de novos marcadores mais sensíveis e capazes de diagnosticar a lesão renal aguda mais precocemente, sendo os principais a interleucina 18 (IL-18), a molécula de lesão renal-1 (KIM-1), a glutadiona-S-transferase (GST) e a lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL).

A NGAL, o biomarcador mais promissor entre os citados, pertence à família das lipocalinas, que possui mais de 20 pequenas proteínas que são definidas baseando-se em suas estruturas tridimensionais e são caracterizadas por oito cadeias β que formam um β barril com um cálice anexado. A NGAL é constituída de uma cadeia única de polipeptídeos com 178 aminoácidos e possui uma massa molecular calculada de 22kDa, que aumenta para 25kDa com a glicosilação⁽⁶⁷⁾.

Em condições fisiológicas, o mRNA da NGAL é expresso em vários tecidos, incluindo rim, medula óssea, próstata, útero, glândula salivar, estômago, cólon, pulmões e fígado^(67,68). Os níveis normais em adultos saudáveis variam entre 50 e 90 ng.mL⁻¹. Ela é hiperproduzida pelos tecidos citados em resposta a diversas condições inflamatórias, com aumento significativo nos níveis de expressão local e sistêmico.

A NGAL circulante é filtrada pelo glomérulo e reabsorvida no túbulo proximal⁽⁶⁹⁾. Em condições de lesão epitelial ocorre uma elevação de seus valores, sendo de aproximadamente dez vezes no plasma e 100 vezes na urina, associado a valores elevados de creatinina⁽⁷⁰⁾. A NGAL é secretada em baixas concentrações pela alça ascendente do túbulo renal e os níveis urinários normais são muito baixos (<5ng.mL⁻¹)⁽⁶⁹⁾.

Em uma revisão sistemática de 2009, os autores concluíram que a NGAL parece ser uma ferramenta prognóstica útil em relação ao início da terapia de

reposição renal, porém com algumas limitações em relação à morte intra-hospitalar⁽⁷⁰⁾. Acredita-se que a dosagem de NGAL pelo método de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) identifica seu aumento antes mesmo do desenvolvimento de LRA, sendo, então, a NGAL plasmática e urinária um biomarcador sensível, específico e altamente preditivo de LRA.

1.6 Hipótese do estudo

O PCI e o PCol são métodos que podem proporcionar proteção renal em modelos de isquemia-reperfusão, podendo ser utilizados isoladamente ou associados.

2 Objetivos

2.1 Primário

Avaliar o efeito do PCI e do PCol, isoladamente ou em conjunto, após lesão renal aguda em ratos submetidos à isquemia renal sob anestesia geral inalatória.

2.2 Secundário

Relacionar as dosagens do marcador renal precoce (NGAL) e os tardios (Urp e Crp) com o critério de AKIN e à análise histológica dos rins.

3 Materiais e Métodos

Após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu (Protocolo 1013/2013), foi realizado um estudo experimental unicêntrico, controlado, randomizado e sem conflito de interesses na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) do *campus* de Botucatu da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP).

Foram incluídos 40 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) adultos, machos e com maturidade de desenvolvimento equivalentes, que foram fornecidos pelo Biotério Central do *campus* de Botucatu da UNESP. Os animais apresentavam pesos entre 350g e 500g e foram mantidos em cativeiro sob as mesmas condições ambientais e nutricionais.

3.1 Grupos experimentais

Os animais foram numerados e distribuídos aleatoriamente em cinco grupos experimentais por meio de sorteio protegido por envelope pardo selado. Os grupos estão descritos a seguir e esquematizados na figura 4.

- **Grupo S** (Sham - n=8): indução anestésica com isoflurano a 3% e manutenção com isoflurano na concentração inspirada de 1,5% a 2%. Foram realizadas laparotomia e nefrectomia direita.
- **Grupo C** (Controle - n=8): indução anestésica com isoflurano a 3% e manutenção com isoflurano na concentração inspirada de 1,5% a 2%. Foram realizadas laparotomia e nefrectomia direita; em seguida, submeteu-se o rim esquerdo a 30 minutos de isquemia, seguida de reperfusão final.
- **Grupo PRÉ** (PCI - n=8): indução anestésica com isoflurano a 3% e manutenção com isoflurano na concentração inspirada de 1,5% a 2%. Foram realizadas laparotomia e nefrectomia direita; em seguida, PCI 3x5' (três ciclos de isquemia de 5min, com intervalos de 5min de

reperfusão). Após este processo, submeteu-se o rim esquerdo à isquemia de 30min, seguida de reperfusão final.

- **Grupo PRÉ/PÓS** (PCI+PCOI - n=8): indução anestésica com isoflurano a 3% e manutenção com isoflurano na concentração inspirada de 1,5% a 2%. Foram realizadas laparotomia e nefrectomia direita, posteriormente aplicando a seguinte sequência: PCI 3x5' do rim esquerdo, 30min de isquemia, PCOI 3x5' e reperfusão final.
- **Grupo PÓS** (PoCI - n=8): indução anestésica com isoflurano a 3% e manutenção com isoflurano na concentração inspirada de 1,5% a 2%. Foram realizadas laparotomia e nefrectomia direita, isquemia de 30min do rim esquerdo e PoCI 3x5' seguida de reperfusão final.

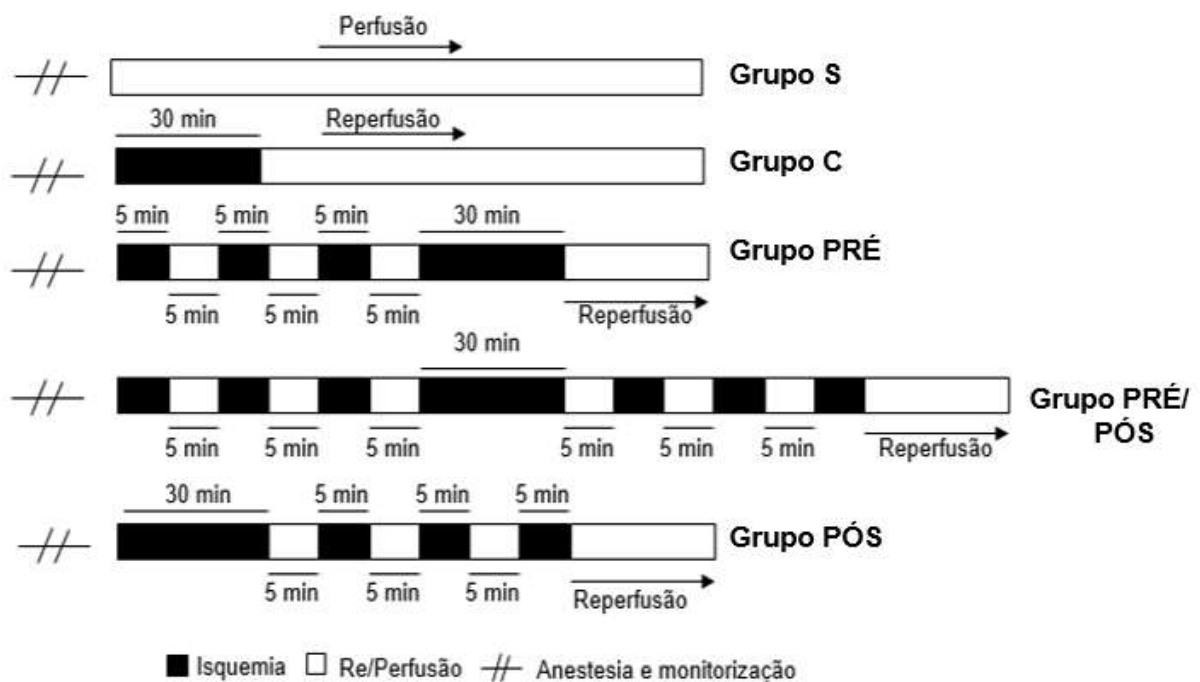


Figura 4 - Algoritmo experimental apresentando os grupos de intervenção. Abreviaturas: C, controle; PRÉ, pré-condicionamento; PRÉ/PÓS, pré mais pós condicionamento, PÓS, pós-condicionamento; S, Sham.

3.2 Anestesia e monitorização

Os animais foram colocados em uma campânula (Figura 5) com um fluxo dilucional de $2\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, composto por $0,8\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ de oxigênio e $1,2\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ de ar comprimido para vaporizar Isoflurano a 3% (vaporizador calibrado Isotec 5 Ohmeda) até hipnose suficiente para manipulação dos ratos. Havia um sistema de eliminação de gases no recipiente que não permitia o acúmulo de dióxido de carbono. O tempo de indução foi de aproximadamente 5min.



Figura 5 - Animal sendo anestesiado na campânula. A entrada do fluxo de gases ocorre pela parte superior do objeto.

Após o animal estar adormecido e em plano anestésico, foi colocado em uma plataforma rígida. Em seguida, foi adaptada uma máscara facial ao focinho do animal para a manutenção anestésica em ventilação espontânea, com fração inspirada de oxigênio (FiO_2) de 0,4 e isoflurano na concentração de 1,5% a 2% acoplado a um aparelho de anestesia Ohmeda Excel 210 SE (Figura 6).



Figura 6 - Aparelho de anestesia Ohmeda Excel 210 SE e vaporizador calibrado Isotec 5 Ohmeda.

Foi instalado um sensor para a medida da temperatura retal (T°). Os animais foram mantidos sobre e cobertos com bolsas térmicas (bolsa térmica gel - *Body Care* - Mercur®) preaquecidas para a manutenção da temperatura entre 36°C e 38°C .

Após estabilização hemodinâmica e plano anestésico adequado, foi realizado dissecação e cateterismo da veia jugular interna direita para infusão da solução de Ringer lactato $5\text{mL.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ utilizando a bomba de infusão ANNE (Abbott Laboratories®, Abbott Park, USA) (Figura 7) com o objetivo de repor perdas volêmicas e manter estabilidade hemodinâmica. Dissecação e cateterismo da artéria carótida esquerda para monitorização da pressão arterial e coleta de amostras de sangue. Os dados de pressão arterial média (PAM) e frequência de pulso (FP) obtidos pela cateterização arterial foram aferidos por meio do monitor Datex Engstrom (Figura 8).



Figura 7 - Bomba para infusão de volume no intraoperatório, modelo ANNE (Abbott laboratories, Abbott Park, USA)



Figura 8 - Monitor Datex Engstrom para aferição dos valores de PAM, T° e FP.

3.3 Sequência experimental

Na véspera do experimento, os animais foram transportados do biotério e acondicionados em gaiolas metabólicas com água e alimentos *ad libitum*. Então, a sequência experimental foi realizada na seguinte ordem cronológica:

- 1) os animais foram pesados imediatamente antes do início do procedimento;
- 2) todos os cálculos relativos às infusões de volume e às doses das medicações foram feitos e preparadas;
- 3) os animais foram alocados em uma campânula para anestesia inalatória com fluxo de $2\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ contendo vapor de isoflurano, oxigênio e ar comprimido por 5min, até hipnose adequada;
- 4) os animais foram transferidos para uma mesa operatória rígida com ganchos laterais para a fixação das patas dianteiras e traseiras. Foi acoplada uma máscara facial ao focinho do animal, que foi mantido em anestesia inalatória com FiO_2 de 0,4 e isoflurano na concentração de 1,5% a 2%, sob ventilação espontânea (Figura 9);
- 5) o termômetro retal foi inserido e as bolsas térmicas gel, posicionadas, sendo previamente aquecidas para manter a temperatura do animal entre 36°C e 38°C ;
- 6) o pesquisador realizou infiltração subcutânea de Bupivacaína a 0,125% na dose de $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ na região cervical e mediana do abdômen;
- 7) uma incisão cervical mediana foi realizada e, sob visão direta, a punção da veia jugular interna direita com *venocath* 24 GA foi feita para infusão contínua de solução de Ringer lactato $5\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Em seguida, foi realizada a punção da artéria carótida esquerda com *venocath* 24 GA, para a monitorização cardiovascular e a coleta de amostras sanguíneas. Após cada coleta de 1,5 ml de sangue arterial, 4,5 ml de Ringer lactato foi repostado por via venosa;

- 8) uma laparotomia mediana foi realizada em todos os grupos, seguida de nefrectomia direita, a fim de evitar a compensação da função renal pelo rim não isquemiado (Figura 10);
- 9) o hilo foi dissecado para a exposição da artéria renal esquerda e foi realizado PCI com três ciclos de 5min de isquemia seguidos de 5 min de reperfusão (3x5') pela colocação de clampe vascular atraumático (*Schwartz clip* – Rs-5452, Roboz Surgical Instrument Co. Inc.®, Gaithersburg, MD, USA), ocluindo a luz da artéria renal correspondente (grupos PRÉ e PRÉ/PÓS);
- 10) a artéria renal esquerda passou por oclusão durante 30min utilizando a mesma técnica de clampeamento anterior (grupos C, PRÉ, PRÉ/PÓS, PÓS);
- 11) o PCol foi realizado com algoritmo 3x5' seguida de reperfusão final (grupos PRÉ/PÓS e PÓS);
- 12) a avaliação da estabilidade hemodinâmica e a coleta final de amostras de sangue foram realizadas;
- 13) a laparotomia foi fechada em único plano, sendo a pele pincelada com solução antisséptica; cloridrato de tramadol subcutâneo na dose de $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ foi administrado como analgesia pós-operatória;
- 14) os cateteres venoso e arterial foram retirados e a veia jugular e a artéria carótida passaram por ligadura, em seguida, fechamento da incisão cervical;
- 15) o anestésico inalatório foi interrompido;
- 16) os animais foram recuperados da anestesia, mantidos aquecidos com alimento e água *ad libitum* em ambiente controlado;
- 17) os animais foram novamente anestesiados sob a mesma técnica anterior 24 horas após o final do experimento;
- 18) uma nova laparotomia mediana foi realizada. O rim esquerdo foi retirado para exame histológico;

- 19) as amostras sanguíneas foram coletadas por punção intracardíaca e, ao final, o animal foi sacrificado com administração de 250 mg de tiopental sódico por essa mesma via.



Figura 9 - Animal anestesiado e monitorizado, pronto para o início do procedimento experimental. Observa-se: máscara facial acoplada ao focinho do animal, cateter arterial na artéria carótida esquerda acoplado a um dispositivo de conexão em 3 vias para coleta de exames, cateter venoso na veia jugular interna direita, bolsa térmica gel superior e inferior para manutenção da temperatura.

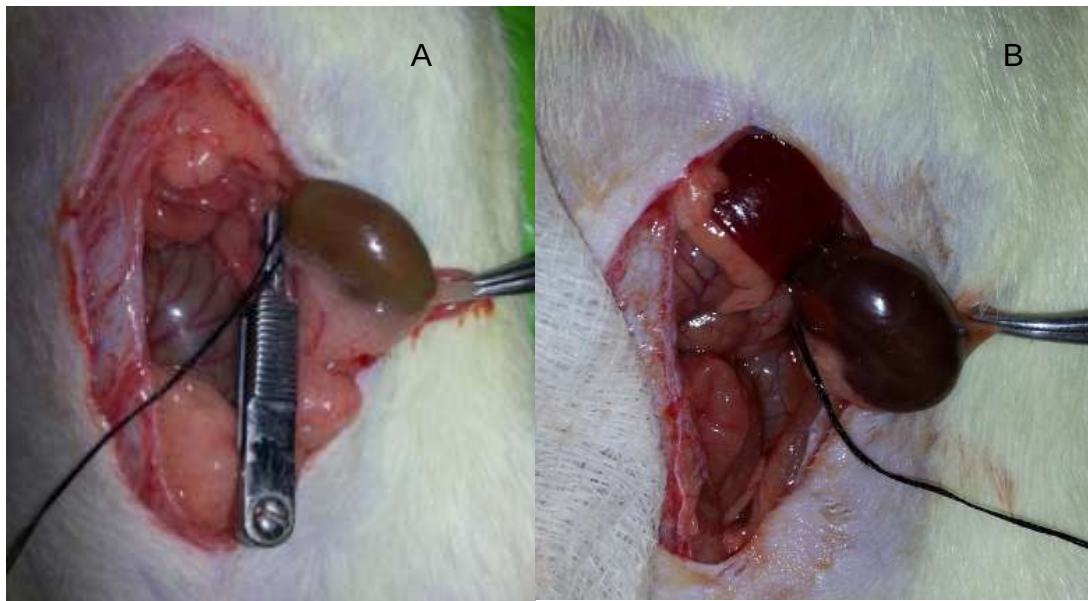


Figura 10 - Laparotomia com exposição do hilo renal esquerdo. A) rim esquerdo durante período de isquemia B) rim esquerdo após reperusão. É visível a alteração macroscópica de coloração, o rim isquemiado apresenta-se pálido e amarronzado, enquanto o rim reperfundido é vermelho escuro.

3.4 Coleta de dados

Os atributos T°, FP e PAM foram estudados em quatro tempos cirúrgicos (T):

- T1: 5min após a cateterização da artéria carótida esquerda;
- T2: 1min após nefrectomia direita;
- T3: 30min após nefrectomia direita no grupo S e nos outros grupos 5min após liberação do clampe da artéria renal esquerda para isquemia maior que 30min do rim esquerdo;
- T4: final do experimento.

A concentração plasmática de NGAL, Urp e Crp foi estudada em três momentos:

- M1: logo após a cateterização arterial;
- M2: final do procedimento;
- M3: 24 horas após o procedimento.

Para as dosagens de Urp e Crp foram utilizados reagentes da marca EBRAM e o equipamento para análise foi o COBAS MIRA PLUS. Para a dosagem de NGAL foi utilizada a metodologia ELISA (teste imunoenzimático que permite a detecção quantitativa). Os *kits* utilizados foram padrão da BioPorto Diagnosis A/S, da Dinamarca.

Tabela 1 - Interação entre os dados de sinais vitais e coletas de exames de acordo com o tempo cirúrgico

Tempo x Momento	Referência	PAM, T° e FP	Ur, Cr e NGAL
T1 = M1	Após cateterização arterial	Sim	Sim
T2	Após nefrectomia direita	Sim	Não
T3	Após isquemia maior (30min)	Sim	Não
T4 = M2	Final do procedimento	Sim	Sim
M3	24h após o procedimento	Não	Sim

Abreviaturas: Cr, creatinina; FP, frequência de pulso; NGAL, lipocalina associada a gelatinase de neutrófilos; PAM, pressão arterial média; Ur, ureia

3.4 Análise da presença de LRA

Para avaliação da presença de lesão renal aguda foi utilizada a classificação AKIN⁽⁶³⁾. Havia poucas diferenças na comparação com a classificação RIFLE, mas na classificação AKIN, a categoria *Risk* da classificação RIFLE foi ampliada para incluir um aumento na creatinina sérica de no mínimo 0,3 mg.dL⁻¹; portanto, mais abrangente. Vale ressaltar que a classificação de AKIN foi utilizada apenas pela análise da creatinina, pela impossibilidade de se medir o débito urinário.

3.5 Análise histológica

Ambos os rins de cada animal foram submetidos à análise histológica. Cada órgão foi seccionado longitudinalmente e fixado com solução de Dubosq (6 mL de formaldeído a 40%, 12 mL de álcool absoluto, 1,5 mL de ácido acético e 8 mL de ácido pícrico) por 48 horas. Após este período os rins foram mantidos em solução de álcool 70%.

As lâminas foram preparadas e coradas com hematoxilina e eosina e examinadas sob diversos aumentos de microscopia óptica. Os rins foram identificados por números e o patologista que fez a análise histológica não tinha conhecimento sobre a qual grupo experimental pertencia a peça do anatomopatológico. O grau de lesão renal foi classificado segundo a classificação de Park et al.⁽⁷¹⁾ apresentada na tabela 2.

Tabela 2 - Grau de lesão renal segundo Park et al.⁽⁷¹⁾

Grau	Tipo	% de Lesão (área de necrose)
0	Sem lesão	-
1	Lesão leve	<10%
2	Moderada	10 a 25%
3	Moderada a Grave	25 a 50%
4	Grave	50 a 75%
5	Muito Grave	>75%

3.6 Análise estatística

A estimativa do tamanho amostral foi utilizada como referência uma pesquisa realizada por Eckelman et al.⁽⁷²⁾ com o objetivo de quantificar o número de animais necessários para estudos experimentais. Para uma diferença de 20% entre os grupos controle e tratado e um coeficiente de variabilidade biológica de 20%, um N=8 é suficiente para detectar uma significância de $p < 0,05$. Os dados estão sumarizados na tabela 3.

Tabela 3 - Animais necessários para se obter resultados estatisticamente significantes. Adaptado de Eckelman et al.⁽⁷²⁾

Diferença de % entre os grupos controle e tratado	% de CV* devido a variabilidade biológica	Número de animais	Significância ($p < 0,05$)
20	20	2-7	Não significativa
20	20	8	Significante
20	15	5	Significante
25	20	5	Significância limítrofe
30	20	5	Significante
25	15	5	Significante

*CV, coeficiente de variação

Para a comparação entre os grupos e a avaliação da variável peso foi utilizada a análise de variância, enquanto para as variáveis temperatura e PAM foi utilizada a análise de perfil.

Em relação aos valores de Urp, Crp, NGAL plasmática e classificação de graus histológicos, os resultados apresentaram distribuição não normal. Portanto, foram realizados os testes de Kruskal-Wallis e de Friedman. Na avaliação da classificação AKIN⁽⁶³⁾ foi utilizado o teste de qui-quadrado. A análise foi realizada usando o *software* SAS 6.11 (SAS Institute Inc.®, Cary, NC). O nível de significância foi estabelecido como $p < 0,05$.

4 Resultados

4.1 Peso

Tabela 4 - Média e desvio-padrão referentes ao peso (gramas) segundo grupo

Grupo	Média	Comparação	DP
S	400,0	B	45,0
C	451,3	AB	43,9
PRÉ	391,3	B	27,5
PRÉ/PÓS	401,3	B	48,5
PÓS	472,5	A	36,9
P	<0,001		

ANOVA

DP: Desvio padrão

Comentários: em relação a variável peso, todos os animais apresentaram pesos entre 350 e 500 gramas, dentro da meta estipulada na metodologia. Entretanto o grupo PÓS apresentou média de peso estatisticamente superior em relação aos grupos S, PRÉ, PRÉ/PÓS e o grupo C apresentou valor intermediário.

4.2 Frequência de pulso

A frequência cardíaca normal de um rato é superior à humana devido ao seu alto metabolismo. Goyal et al.⁽⁷³⁾ relataram uma frequência cardíaca normal média de 390 batimentos por minuto (BPM) com um desvio-padrão de 42 BPM. A frequência de pulso apresentada pelo animais durante todos os momentos foi maior que 250 BPM, limite superior que o próprio monitor consegue mensurar. Devido a esse fato, não foi possível realizar a análise estatística dessa variável.

4.3 Temperatura

Tabela 5 - Média e desvio padrão para a variável temperatura (°C)

Grupo	Momento			
	T1 (DP)	T2 (DP)	T3 (DP)	T4 (DP)
S	36,6 (0,8)	36,9 (1,1)	36,9 (1,1)	38,0 (1,4)
C	36,8 (0,7)	37,8 (0,8)	37,8 (0,8)	37,7 (0,7)
PRÉ	36,5 (0,5)	37,3 (1,2)	37,9 (0,8)	37,8 (0,9)
PRÉ/PÓS	36,9 (1,4)	37,1 (1,6)	37,9 (1,4)	37,7 (0,7)
PÓS	36,2 (0,6)	37,6 (1,0)	37,6 (1,0)	37,6 (0,6)
Média geral de momento	36,6 (0,9)	37,3 (1,2)	37,6 (1,0)	37,7 (0,9)
Efeito Principal				
	Grupo	Tempo	Interação	
Valor de p	0,88	< 0,0001	0,028	

ANOVA para medidas repetidas

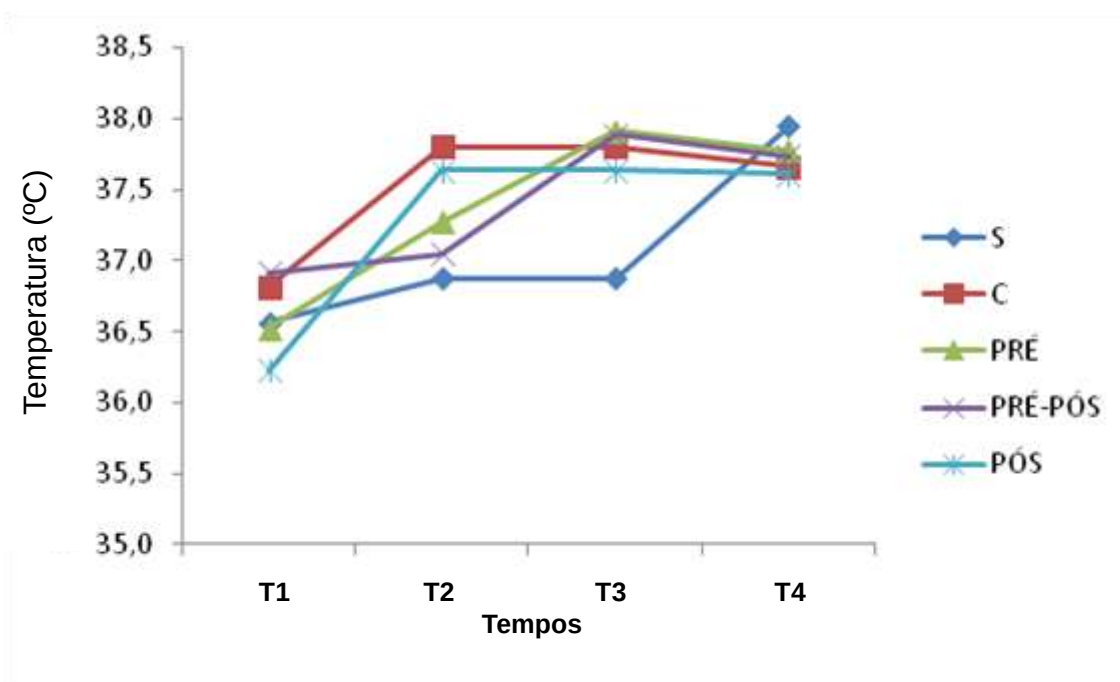


Figura 11 - Temperatura média (°C) referente aos tempos e momentos.

Comentários: os animais foram mantidos aquecidos com temperatura dentro da meta estipulada na metodologia (entre 36°C e 38°C). Não houve diferença estatística entre os grupos (Tabela 5) com um valor de $p=0,88$ para efeito de grupo. Mas há um aumento na temperatura em todos os grupos estudados com o decorrer do procedimento, demonstrado pelo valor de $p < 0,0001$ para efeito de tempo e $p=0,028$ para interação grupo *versus* tempo.

O grupo S começou com média intermediária; nos tempos 2 e 3 ocorreram as menores médias e no último tempo houve uma recuperação. Os demais grupos ficaram oscilando seus valores entre os tempos com padrão muito semelhante. Esta tendência pode ser observada na figura 11.

4.4 Pressão arterial média (PAM)

Tabela 6 - Média e desvio-padrão referentes à PAM (mmHg) segundo momento e grupo

Grupo	Tempo				Média geral de grupo
	T1 (DP)	T2 (DP)	T3 (DP)	T4 (DP)	
S	101,6 (17,1)	91,3 (7,7)	91,3 (7,7)	91,1 (17,7)	93,8 (13,6)
C	118,1 (10,6)	77,3 (10,6)	76,8 (10,6)	80,5 (16,4)	88,2 (21,2)
PRÉ	107,0 (8,3)	87,0 (20,5)	79,9 (21,3)	90,9 (15,1)	91,2 (19,2)
PRÉ/PÓS	97,6 (17,8)	87,4 (10,6)	80,3 (13,2)	101,9 (6,5)	91,8 (14,8)
PÓS	111,9 (17,1)	57,1 (17,6)	57,1 (17,6)	74,8 (27,2)	75,2 (29,8)
Média geral	107,3 (15,8)	80,0 (18,4)	77,1 (18,0)	87,8 (19,4)	
Efeito					
	Grupo	Tempo	Grupo x tempo		
Valor de p	p = 0,009	p < 0,0001	p = 0,008		

Análise de perfil;
DP: Desvio padrão

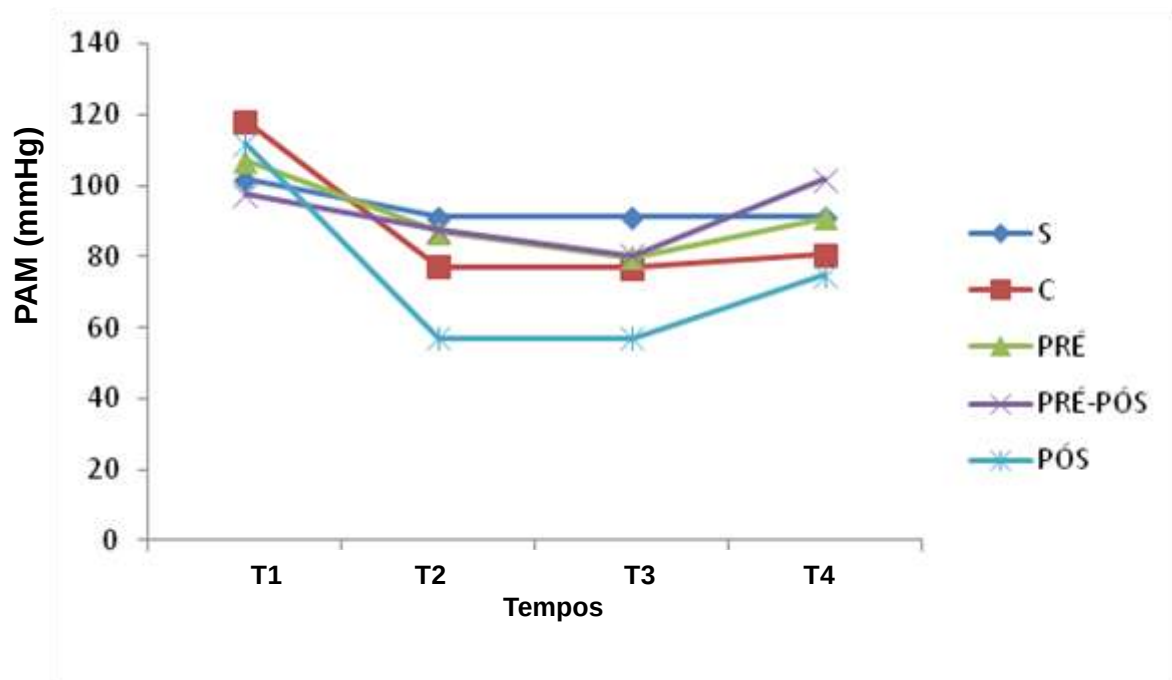


Figura 12 - PAM (mmHg) referente aos grupos e momentos.

Comentários: a PAM foi aferida continuamente e seus valores analisados em quatro tempos. Pela análise longitudinal entre os grupos observa-se que houve variação significativa de seus valores, com efeito de grupo ($p=0,009$), tempo ($p<0,0001$) e da interação grupo *versus* tempo ($p=0,008$), conforme ilustra a tabela 6. Pela análise gráfica da figura 12 podemos visualizar que o grupo PÓS foi responsável por esta inconformidade.

Esse grupo, no início do experimento, apresentou média intermediária; nos tempos T2 e T3 apresentou menores médias; e no tempo T4 volta a se aproximar dos outros grupos. É importante ressaltar que o período que compreende o intervalo de tempo entre T2 e T3 ocorre a isquemia maior de 30min e, portanto, em todos os grupos, exceto o S, a artéria renal esquerda está clampeada.

4.5 Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos plasmática (NGAL)

Tabela 7 - Análise Longitudinal do biomarcador NGAL (ng.mL⁻¹)

Grupo	Momento			p	Contraste
	M1	M2	M3		
	Med [1/3Q]	Med [1/3Q]	Med [1/3Q]		
S	14,00 [12,0;15,0]	12,00 [11,0;18,0]	343,00 [316,0;360,0]	0,008	(M1=M2)<M3
C	29,53 [9,3;77,9]	52,08 [21,0;64,4]	368,25 [359,7;382,8]	<0,001	(M1=M2)<M3
PRE	17,44 [9,8;25,6]	51,79 [36,3;109,7]	390,90 [362,5;399,7]	<0,001	M1<M2<M3
PRE/POS	16,54 [9,5;26,1]	97,15 [50,8;116,8]	387,55 [371,2;399,2]	<0,001	M1<M2<M3
POS	30,46 [24,0;51,6]	69,86 [29,6;95,9]	382,27 [355,3;393,8]	<0,001	(M1=M2)<M3
Valor de p	0,19	0,08	0,06		

Teste de Kruskal-Wallis

Med: mediana; 1/3Q: 1° e 3° quartis

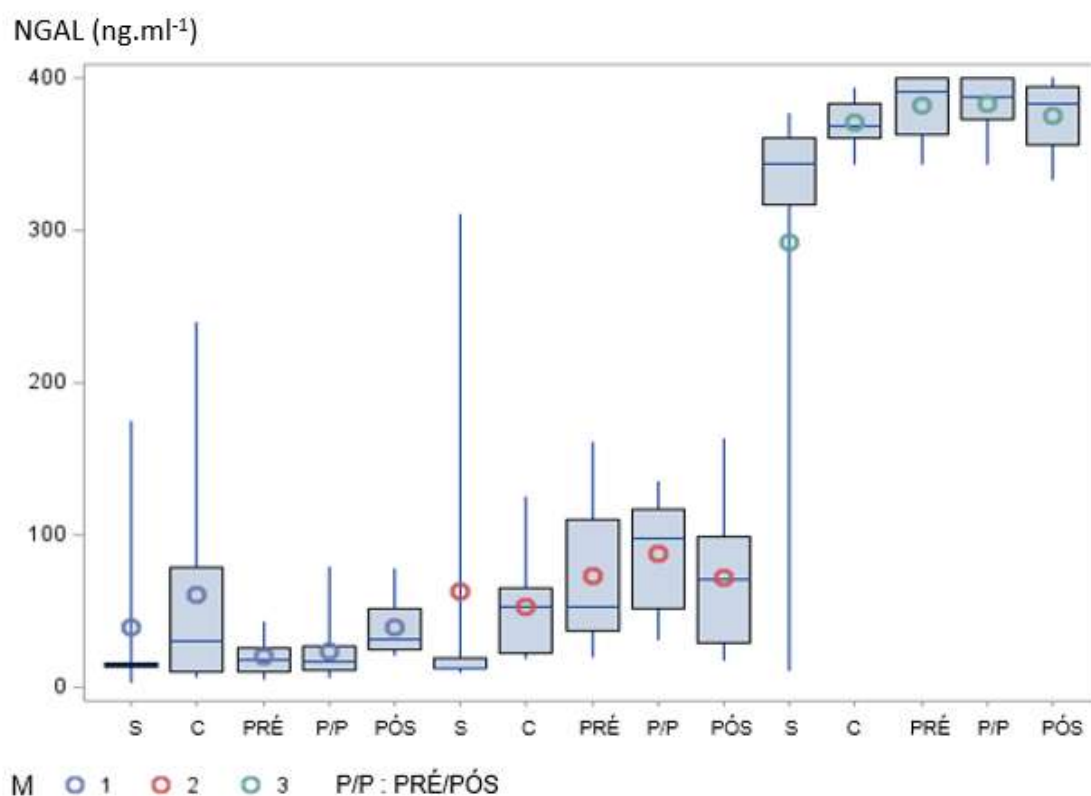


Figura 13 - Boxplot para NGAL (ng.mL⁻¹) por grupo de estudo e momento.

Comentários: para a análise do biomarcador NGAL, por sua distribuição não normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Na tabela 7 pode-se observar que há um aumento progressivo dos valores de NGAL com o decorrer do procedimento em todos os grupos. Nos grupos S, C e PÓS, os valores encontrados nos momentos M1 e M2 são estatisticamente semelhantes entre si e diferem do valor encontrando no momento M3.

Nos grupos PRÉ e PRÉ/PÓS há um aumento progressivo dos valores de NGAL entre os momentos. Em relação à análise entre os grupos, em nenhum momento houve diferença entre eles, com valores de p nos momentos M1, M2 e M3 respectivamente de 0,19; 0,08 e 0,06. Ou seja, os cinco grupos evoluíram de forma semelhante.

4.6 Creatinina plasmática

Tabela 8 - Análise Longitudinal da Crp (mg.dl⁻¹).

Grupo	Momento			p	Contraste por grupo
	M1	M2	M3		
	Med [1/3Q]	Med [1/3Q]	Med [1/3Q]		
S	0,40 [0,35;0,50]	0,40 [0,40;0,50]	0,60 [0,50;0,60]	0,008	(M1=M2)<M3
C	0,45 [0,40;0,50]	0,80 [0,80;0,88]	3,40 [1,35;5,20]	<0,001	M1<M3 (M2 inter)
PRE	0,40 [0,40;0,40]	0,85 [0,80;0,90]	2,30 [1,45;4,20]	<0,001	M1<M3 (M2 inter)
PRE/POS	0,40 [0,40;0,60]	0,95 [0,90;1,05]	3,25 [1,85;4,55]	0,002	M1<M3 (M2 inter)
POS	0,45 [0,40;0,50]	0,90 [0,90;0,90]	4,10 [2,50;4,45]	<0,001	M1<M3 (M2 inter)
Valor de p	0,6	<0,001	<0,001		
Contraste entre os grupos	Todos Iguais	S<(PRÉ/POS=PÓS)C e PRÉ não diferem	S<(C=PRÉ=PRÉ/PÓS=PÓS)		

Análise por teste de Kruskal-Wallis

Med: mediana; 1/3Q: 1° e 3° quartis; inter: valor intermediário entre M1 e M3

Creatinina plasmática (mg.dl⁻¹)

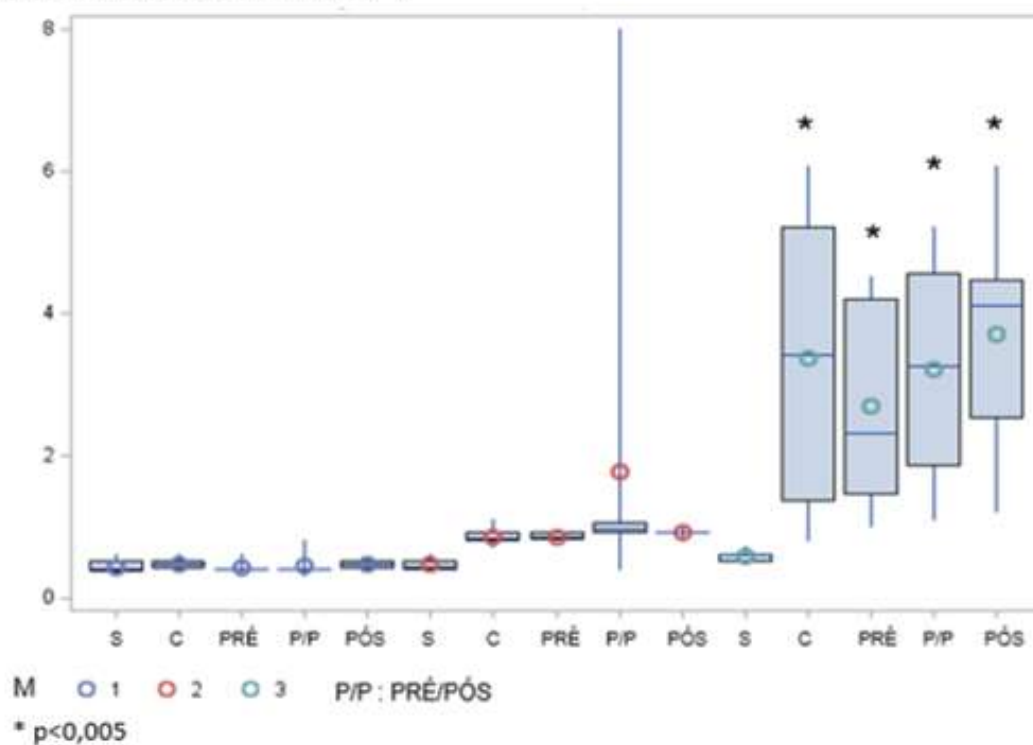


Figura 14 - Boxplot para Crp (mg.dl⁻¹) por grupo de estudo e momento.

Comentários: para a análise dos valores de Crp também foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. A Crp basal (tabela 8), coletada no início do procedimento, não se mostrou diferente entre os grupos, mostrando homogeneidade de função renal na distribuição dos animais ($p = 0,6$). Ao analisar o contraste dentro de cada grupo foi encontrado que: no grupo S, os valores de creatinina nos momentos M1 e M2 foram estatisticamente semelhantes e ambos diferiram dos valores encontrados no momento M3 ($p = 0,008$); nos outros grupos, o valor da creatinina foi estatisticamente menor no momento M1, intermediário no momento M2 e maior no momento M3 ($p < 0,001$).

Comparando os grupos em cada momento, pode-se observar que: no momento M1 todos os grupos apresentaram valores de creatinina semelhantes ao nível de significância de 5%. No momento M2 (final do procedimento), o grupo S apresentou valores de creatinina estatisticamente menores que os grupos PÓS e PRÉ/PÓS, enquanto o grupo C e PRÉ apresentaram valores intermediários, não diferindo estatisticamente de nenhum dos outros grupos ($p < 0,001$). No momento M3, o grupo S apresentou valores de creatinina significativamente menores que todos os outros grupos ($p < 0,001$).

4.7 Ureia plasmática

Tabela 9 - Análise longitudinal da Urp (mg.dL⁻¹)

Grupo	Momento			p	Contraste por grupo
	M1	M2	M3		
	Med [1/3Q]	Med [1/3Q]	Med [1/3Q]		
S	38,5 [36,5;44,5]	40,5 [37,0;45,0]	52,5 [47,5;53,5]	0,005	(M1=M2) < M3
C	38,5 [34,5;41,0]	48,0 [39,0;49,8]	161 [87,0;200]	<0,001	M1<M3 (M2 inter)
PRE	39,5 [37,0;45,0]	53,0 [49,0;57,0]	143 [128;195]	<0,001	M1<M3 (M2 inter)
PRE/POS	42,5 [37,5;45,5]	52,5 [50,5;59,5]	181 [154;209]	0,002	M1<M3 (M2 inter)
POS	40,0 [37,5;42,5]	47,0 [43,8;48,5]	175 [143;193]	<0,001	M1<M3 (M2 inter)
Valor de p	0,85	0,002	<0,001		
Contraste entre os grupos	Todos Iguais	S<(PRÉ=PRÉ/PÓS) C e PÓS não diferem	S<(C=PRÉ=P RÉ/PÓS=PÓS)		

Análise por teste de Kruskal-Wallis

Med: mediana; 1/3Q: 1º e 3º quartis; inter: valor intermediário entre M1 e M3

Ureia plasmática (mg.dL⁻¹)

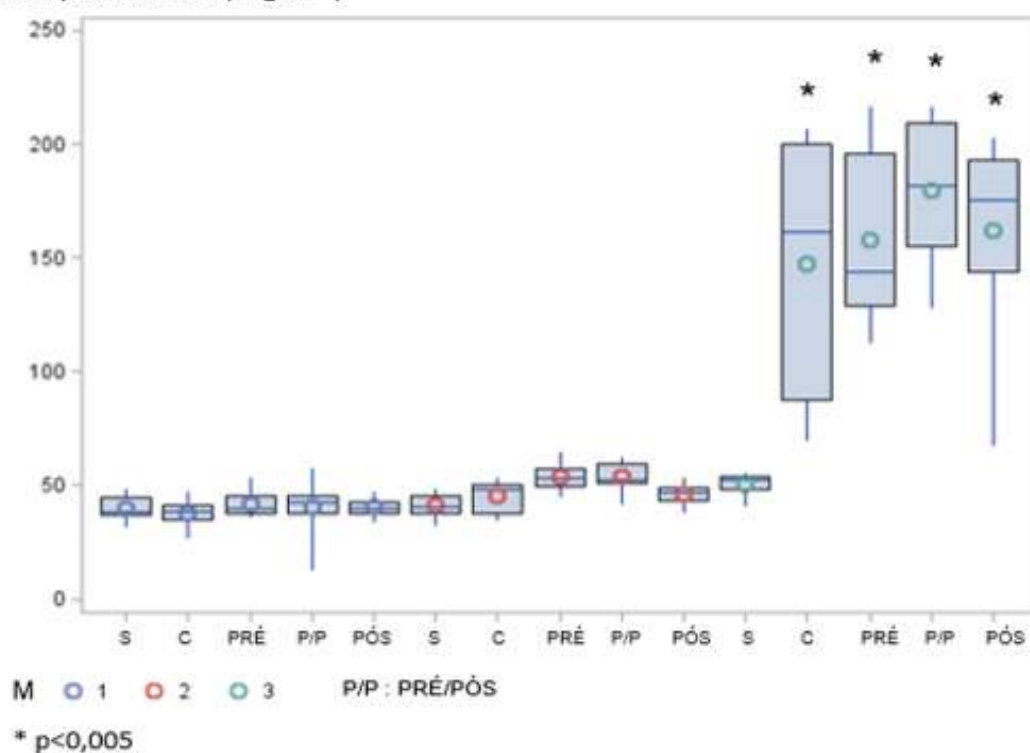


Figura 15 - Boxplot para Urp (mg.dL⁻¹) por grupo de estudo e momento.

Comentários: assim como a Crp, a Urp também é um biomarcador de lesão renal mais tardio. Para a análise de seus valores também foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. A Urp basal (tabela 9), coletada no início do procedimento, não se mostrou diferente entre os grupos, mostrando homogeneidade de função renal na distribuição dos animais ($p = 0,85$). Ao analisar o contraste dentro de cada grupo encontrou-se que: no grupo S, os valores de Urp nos momentos M1 e M2 foram estatisticamente semelhantes e ambos diferiram dos valores encontrados no momento M3 ($p = 0,005$); nos outros grupos, o valor da creatinina foi estatisticamente menor no momento M1, intermediário no momento M2 e maior no momento M3 ($p < 0,001$).

Realizando a comparação entre os grupos em cada momento, pode-se observar que: no momento M1 todos os grupos apresentaram valores de Urp semelhantes ao nível de significância de 5%. No momento M2 (final do procedimento), o grupo S apresentou valores de Urp estatisticamente menores que os grupos PRÉ e PRÉ/PÓS, enquanto o grupo C e PÓS apresentaram valores intermediários, não diferindo estatisticamente de nenhum dos outros grupos ($p < 0,001$). No momento M3, o grupo S apresentou valores de Urp significativamente menores que todos os outros grupos ($p < 0,001$).

4.8 Lesão renal aguda

Tabela 10 - Frequência absoluta e percentual de LRA segundo a classificação AKIN nos grupos de estudo

Lesão Renal Aguda (AKIN 2 ou 3)		
Grupo	Frequência	Percentual
S	0	0 %
C	7	87,5 %
PRÉ	8	100 %
PRÉ/PÓS	8	100 %
PÓS	8	100 %
P	<0,001	

Teste de qui-quadrado

Comentários: para a avaliação da presença de LRA ao final do experimento, foi utilizada como referência a classificação AKIN (63). De acordo com o protocolo desta classificação, a LRA corresponde ao estágio 2. Entretanto, como o estágio 3 compreende uma lesão mais avançada que a LRA, foram agrupados os estágios 2 e 3 para medidas de comparação. Na tabela 10 estão sumarizados os resultados encontrados. Todos os grupos apresentaram incidência estatisticamente maior dos estágios 2 e 3 em relação ao grupo S e não diferiram entre si ($p < 0,001$).

4.9 Análise histológica

Tabela 11 - Mediana, 1° e 3° quartil dos graus histológicos utilizando-se a classificação de necrose tubular proposta por Park et al.⁽⁷¹⁾

Grupo	Análise Histológica	
	Mediana	1/3Q
S	0,0	0,0 – 0,0
C	3,0	2,0 – 4,0
PRÉ	3,5	3,0 – 4,5
PRÉ/PÓS	5,0	3,5 – 5,0
PÓS	5,0	2,5 – 5,0
P	<0,001	

Teste de Kruskal-Wallis
1/3Q: 1° e 3° quartis

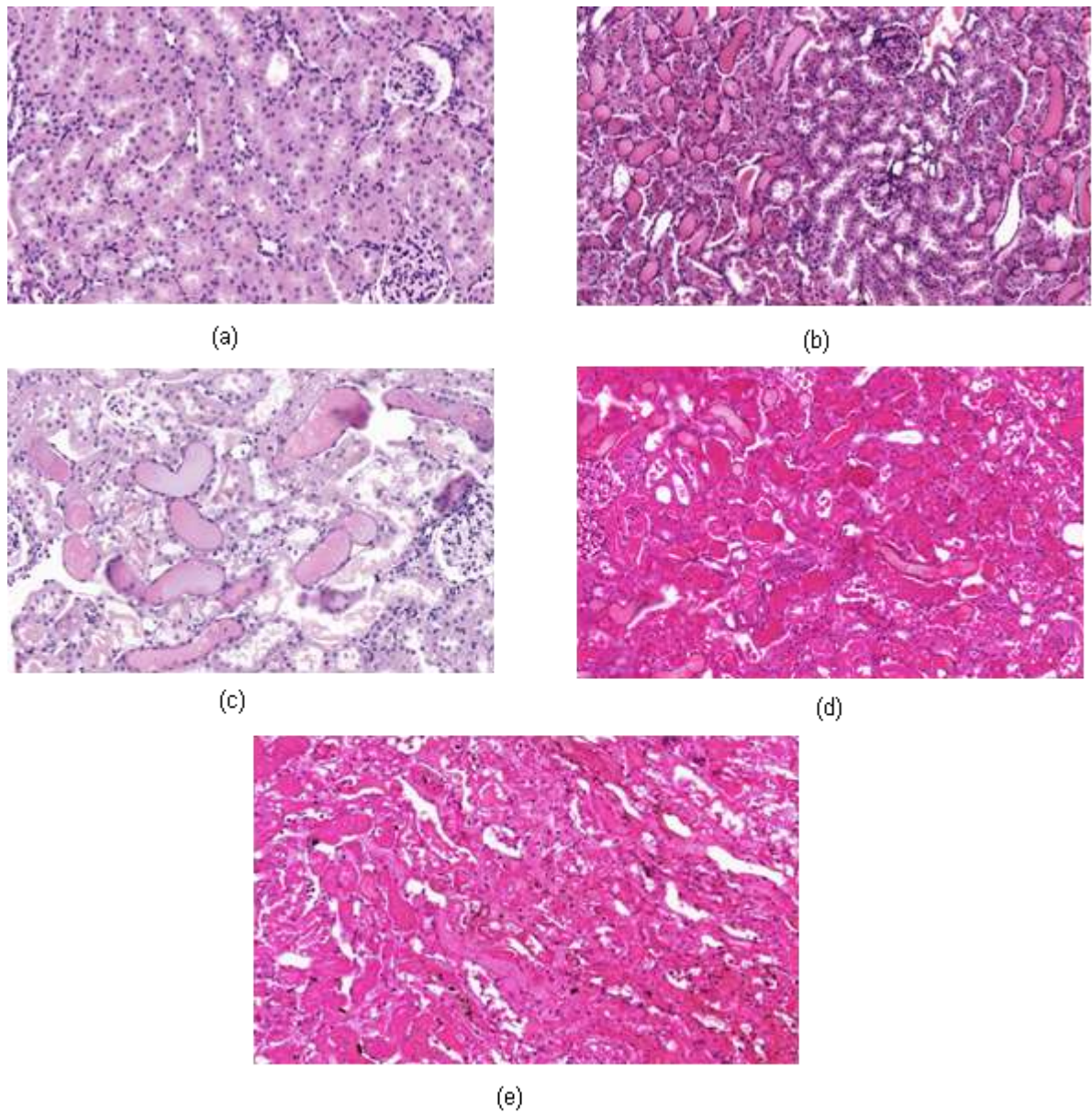


Figura 16 - Microscopia óptica representativa dos rins esquerdos corados com hematoxilina e eosina (magnificação 200x). (a) rim esquerdo grupo S, grau 0: sem lesão; (b) rim esquerdo grupo C, grau 3: moderada a grave; (c) rim esquerdo grupo PRE, grau 4: grave; (d) rim esquerdo grupo PRE/POS, grau 5: grave a muito grave; (e) rim esquerdo grupo POS, grau 5: grave a muito grave.

Comentários: a análise histológica seguindo os critérios de Park et al.⁽⁷¹⁾ demonstrou que todos os 40 rins direitos apresentaram-se normais com grau de lesão 0, mesmo resultado encontrado nos rins esquerdos do grupo S, resultado estatisticamente diferente ($p < 0,001$) em comparação aos outros grupos (C, PRÉ, PRÉ/PÓS e PÓS), que apresentaram medianas de 3 a 5, demonstrando grau de lesão moderada a muito grave e não diferindo entre si. A análise desses resultados está sintetizada na tabela 11.

Os seguintes critérios foram utilizados para determinar necrose das células tubulares por microscopia óptica: núcleos picnóticos, cariorréxis (fragmentação do núcleo picnótico) e ruptura das membranas celulares, promovendo uma perda da arquitetura tubular⁽⁷¹⁾. A figura 16 apresenta imagens de microscopia óptica correspondentes a cada grupo de estudo em seus mais variados graus de lesão. Essas alterações podem ser observadas, pois todos os grupos, exceto o S, apresentaram pelo menos um grau de necrose tubular moderado.

5 Discussão

5.1 Modelo animal e perfil da amostra

A metodologia experimental utilizada na presente pesquisa foi desenvolvida pelo Laboratório Experimental em Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). É um modelo consolidado, já utilizado para estudos de proteção renal em mais de 1.000 ratos *Wistar*. Os animais provenientes do Biotério Central da UNESP – *campus* de Botucatu foram gerados e mantidos em cativeiro, sendo submetidos às mesmas condições de ambientação e alimentação. Receberam controle interno de zoonoses e apresentavam tempos de vida e maturidade semelhantes.

Os animais da amostra eram todos machos e foram selecionados de maneira aleatória. O gênero padrão utilizado nos estudos com isquemia é o masculino, pois a diferença de gênero tem efeitos significativos tanto na tolerância à isquemia quanto em resposta a estratégias de condicionamento. Os estrogênios estão associados a vários efeitos benéficos no contexto de tolerância à isquemia miocárdica, que podem confundir alguns resultados: eles ativam os canais K_{ATP} em modelos caninos de isquemia miocárdica⁽⁷⁴⁾, reduzem a sobrecarga de cálcio durante a isquemia em ratos⁽⁷⁵⁾, aumentam a produção de óxido nítrico em cães⁽⁷⁶⁾, reduzem a apoptose nos miócitos⁽⁷⁷⁾, dentre outros. No entanto, em pesquisa mais recente, Ebrahimi et al. (2012)⁽⁷⁸⁾ reportaram que a diferença de gênero em ratos não teve nenhum impacto na habilidade dos rins de reduzir o dano renal em resposta ao PCI.

Os grupos estudados não apresentaram uma distribuição de peso homogênea. O grupo PÓS apresentou uma média de peso estatisticamente maior em relação aos outros grupos. Entretanto, esta variação não compromete a validade dos resultados encontrados, pois os ratos apresentavam mesma idade e maturidade semelhantes. Todos os cálculos de dose das medicações e hidratação foram realizados por quilogramas de peso e na análise dos valores basais de creatinina não houve diferença entre os

grupos estudados. Portanto, eles apresentavam função renal preservada e equivalente.

O tempo de isquemia influencia diretamente os níveis de creatinina plasmática e o grau de lesão. Assim, 25min de isquemia arterial dobram os valores basais e 45min resultam em um aumento de sete a oito vezes nos níveis plasmáticos de creatinina, com grau de necrose significativa (>75%) ⁽⁷¹⁾. O tempo de 30min foi utilizado por causar lesões renais isquêmicas moderadas, uma vez que a necrose maciça teria impedido a realização de exame histológico relevante⁽⁷⁹⁾.

A isquemia renal temporária foi executada com *clamp* microvascular atraumático, garantindo a integridade vascular e subsequente reperusão adequada após a sua retirada, com liberação do fluxo arterial. O restabelecimento da perfusão foi confirmado pela mudança da coloração do rim de marrom claro (pálido) para vermelho escuro (cianose) em mosaico e retorno progressivo para a coloração e para os aspectos iniciais, possibilitando uma avaliação macroscópica adequada do comportamento do fluxo sanguíneo pela artéria renal.

Também foi realizada nefrectomia direita para que não houvesse compensação pelo rim contralateral. Em trabalhos anteriores já foi demonstrado que a nefrectomia unilateral determina uma recuperação mais rápida da falência renal, menor lesão isquêmica e maior produção de fatores humorais, que estimulam a recuperação renal compensatória^(79, 80).

A manutenção da temperatura em modelos de LIR renais é importante, porque a hipotermia protege o órgão e a hipertermia intensifica o grau de lesão. Sabe-se que a intensidade da lesão funcional, medida pela Crp, apresenta uma correlação positiva com a temperatura corporal e que o dano estrutural, observado na histologia, apresenta piora com o aumento da temperatura corporal durante o período de isquemia. Ambos os efeitos já foram demonstrados em modelo experimental prévio⁽⁸¹⁾. Os efeitos da variação da temperatura na gravidade da lesão renal após período isquêmico também foram observados por Delbridge et al.⁽⁸²⁾, que demonstraram que a temperatura

do animal durante a fase isquêmica também afeta significativamente a gravidade da lesão.

Vários fatores podem alterar a temperatura durante o experimento. As soluções administradas são frias e outros fatores promovem rápida perda de calor como: abertura da cavidade abdominal, respiração sem reinalação, não umidificação e à falta de aquecimento do ar. A manutenção da temperatura foi realizada com o posicionamento de bolsas térmicas sob e sobre o animal e o controle da temperatura foi contínuo por sensor retal.

Os ratos possuem um metabolismo muito acelerado e, assim como uma alta frequência cardíaca, apresentam temperaturas normais acima dos valores em seres humanos. A meta estipulada de temperatura neste estudo, entre 36°C e 38°C, foi determinada a partir de pesquisa anterior⁽⁸¹⁾ sobre a relação da temperatura com alterações na isquemia renal em ratos. O estudo classificou como hipotermia temperaturas menores que 93°F (33,88°C) e como hipertermia temperaturas maiores que 101°F (38,33°C). No presente estudo, os valores de temperatura não apresentaram diferenças estatisticamente relevantes entre os grupos; entretanto, houve efeito de momento com o aumento da temperatura com o decorrer do procedimento, o que era esperado devido às medidas implantadas para evitar a hipotermia. Contudo, os valores de temperatura mantiveram-se dentro da meta estipulada e foram considerados normais.

Em um modelo de isquemia renal, a estabilidade hemodinâmica também é muito importante. Embora o monitor utilizado não tenha sido capaz de aferir a frequência de pulso exata dos animais, o objetivo de detectar bradicardias significativas (FP < 250 BPM) pode ser avaliado. Neste estudo, nenhum dos ratos apresentou bradicardia.

Na literatura já foi descrito que a liberação aumentada de noradrenalina nos terminais nervosos induzida pela ativação dos nervos simpáticos renais é um possível fator causal no desenvolvimento e piora da LRA⁽⁸³⁾. Além disso, a lesão vascular mediada por agentes oxidantes e citocinas podem alterar as propriedades básicas da função vascular. O aumento no tônus vascular intrínseco renal reduz a filtração glomerular, ocasiona um aumento da

sensibilidade a estímulos vasoconstritores e altera a capacidade de autorregulação, o que deixa o rim vulnerável à lesão isquêmica recorrente⁽⁸⁴⁾.

Neste estudo, a PAM sofreu efeitos de grupo e de momento. Na análise comparativa, o grupo PÓS apresentou PAM menor nos tempos T2 e T3 e recuperou seus valores em T4. Pode-se verificar que o tempo T2, que representa o final da nefrectomia direita no grupo PÓS, corresponde ao início da isquemia maior, de 30min, pois neste grupo não há PCI. Já o tempo T3 corresponde ao final da isquemia maior; ou seja, durante este período, a artéria renal esquerda está clampeada e, portanto, as variações nos valores de PAM não corresponderiam a alterações na perfusão do rim em estudo e, conseqüentemente, não seriam responsáveis por alterações na função renal e piora da lesão renal aguda. Em todos os outros grupos e momentos, os valores pressóricos mantiveram-se dentro do limite de autorregulação de perfusão renal.

Os anestésicos voláteis são administrados à maioria dos pacientes submetidos a anestesia geral e são uma parte integrante do período perioperatório. Em adição às suas propriedades analgésicas e anestésicas, os anestésicos voláteis halogenados atualmente utilizados são bem conhecidos por terem propriedades não anestésicas potentes⁽⁸⁵⁾. Vários estudos mostram que os anestésicos voláteis têm efeitos protetores profundos sobre o rim por atenuar a necrose tubular renal e diminuir os efeitos nefrotóxicos da infiltração de leucócitos e produção de citocinas⁽⁸⁶⁾. Pesquisas demonstraram que o Isoflurano ou Sevoflurano utilizados durante a isquemia e 3 horas após a reperfusão diminuíram a creatinina plasmática pela metade, com melhora acentuada na histologia renal e marcadores de inflamação^(87,88).

A utilização dos halogenados na anestesia dos animais é necessária, visto que esta técnica anestésica permite a manipulação dos animais em ventilação espontânea e a indução anestésica com menor fator de estresse. Todos os animais, independente do grupo de estudo, foram submetidos a mesma técnica anestésica e, portanto, ainda que o Isoflurano apresente propriedades nefroprotetoras todos os grupos foram submetidos as mesmas condições.

5.2 Correlação entre resultados bioquímicos e histológicos

A escolha de três biomarcadores de lesão renal, um precoce (NGAL) e dois mais tardios (Crp e Urp) teve como objetivo aumentar a sensibilidade do experimento, porque seus valores séricos são diretamente proporcionais ao aumento da lesão renal. O tempo de isquemia influencia diretamente os níveis séricos de creatinina e o declínio da função renal. Foi determinado o período de isquemia de 30min por já ter sido utilizado em outros estudos experimentais que promoveram isquemia renal moderada⁽⁸⁹⁻⁹¹⁾.

Os valores de NGAL apresentaram aumento progressivo em todos os grupos, e não foram discriminativos em relação à isquemia. A nefrectomia realizada à direita é considerada uma cirurgia de grande porte. Esse tipo de procedimento submete as cobaias a um estresse cirúrgico grande, com consequente ativação intensa do sistema nervoso simpático e determinando grande resposta inflamatória sistêmica. Essas alterações, associadas à perda de fluidos no transoperatório, podem ter contribuído para a elevação dos biomarcadores precoces sem dano estrutural ou alteração da função renal⁽⁹²⁾.

Os valores de Urp e Crp tiveram comportamentos muito semelhantes no decorrer das análises. Os resultados encontrados no início do procedimento demonstraram que todos os grupos apresentaram homogeneidade com relação à função renal basal, pois no momento M1 não houve diferença estatística entre os grupos. Entretanto, com o decorrer do procedimento foram se tornando discriminativos. O grupo S apresentou pequeno aumento dos níveis de Crp 24 horas após o procedimento, sendo que esses valores foram estatisticamente menores em relação aos outros grupos. Os grupos C, PRÉ, PRÉ/PÓS e PÓS apresentaram aumento progressivo dos níveis de Crp, mais acentuado também no momento M3, mas não diferiram entre si. Esses resultados foram confirmados pela ausência de LRA (estágio 2 de AKIN) no grupo S, em contraste com a alta incidência (acima de 87,5%) nos outros grupos. A classificação AKIN⁽⁶³⁾, portanto, foi capaz de demonstrar que o aumento leve dos valores de Crp no grupo S não foi suficiente para ser classificado como LRA nestes animais.

Com relação à análise histológica é importante ressaltar que todos os rins direitos dos animais apresentaram-se normais na microscopia óptica, funcionando como controle do rim contralateral e aumentando a confiabilidade dos resultados. Todos os rins esquerdos do grupo S também se apresentaram normais, com grau de necrose tubular, segundo Park et al.⁽⁷¹⁾, igual a 0, valores estatisticamente menores que os grupos C, PRÉ, PRÉ/PÓS e PÓS, que apresentaram medianas entre 3 e 5 e não diferiram entre si.

Com exceção dos valores de NGAL plasmático, os resultados bioquímicos foram compatíveis com os histológicos em demonstrar a falha da hipótese. A compatibilidade fortaleceu tanto as evidências de normalidade dos rins no início do procedimento quanto a diferenciação do grupo S em relação aos outros grupos de estudo, que, mesmo submetidos a diferentes intervenções, evoluíram da mesma forma no período avaliado.

5.3 Algoritmo aplicado e suas interações

A escolha do algoritmo para compor o protocolo de PCI e PCol foi determinada a partir de uma revisão bibliográfica de estudos experimentais com o objetivo de utilizar um método já anteriormente aplicado e com bons resultados em relação à eficácia^(18,89-91,932-95). O protocolo, já descrito na metodologia, possui três ciclos de 5min de isquemia com 5 min de reperfusão, seguido por isquemia maior de 30min e já havia sido utilizado em outras pesquisas com PCI, cujas características podem ser visualizadas na tabela 12.

Tabela 12 - Características de estudos experimentais com PCI

Autor, Ano	Espécie	Gênero	Ciclos (número)	T PCI (min)	Int rep (min)	Isq maior (min)
Cochrane, 1999 (18)	Rato	M	3	2	5	45
Ogawa, 2000 (89)	Rato	M	3	5	5	30
Kadkhodace, 2004 (90)	Rato	M	3	5	5	30
Chander, 2005 (93)	Rato	M	3	2	5	45
Joo, 2006 (91)	Camund.	?	4	5	5	30
Song, 2007 (94)	Rato	M	3	8	5	45
Timsit, 2008 (95)	Rato	?	3	5	5	60

Abreviaturas: Camund., camundongo; M, masculino; T PCI, tempo de isquemia do PCI, Int rep, intervalo de reperfusão; Isq Maior, tempo de isquemia maior.

Como o objetivo do trabalho era realizar uma comparação entre o PCI e o PCol, foi utilizado o mesmo protocolo, com número e duração idênticos dos ciclos. A janela de proteção corresponde ao período entre o fim das intervenções do PCI e o início da isquemia maior, podendo ser classificada em dois tipos: precoce (menor que 24 horas) ou tardia (maior que 24 horas). A janela utilizada no presente estudo foi a precoce, com 5min de intervalo aplicado. A escolha desse método foi motivada pela intenção de realizar o procedimento em um ato cirúrgico único e homogeneizar os grupos nas mesmas condições, já que a premissa do PCol é a aplicação do método no instante da reperfusão.

Em 1999, Cochrane et al.⁽¹⁸⁾ foram os pioneiros a investigar o efeito do PCI na função renal. Os autores demonstraram que três ciclos de 2min de isquemia, separados por intervalos de 5min de reperfusão, levaram a uma redução nos níveis séricos de Crp 24 horas depois, assim como lesão menos grave à histologia. Desde então, vários protocolos experimentais foram utilizados, tendo de um a cinco ciclos de isquemia com duração de 2min a 30min e intervalos de reperfusão variáveis⁽⁹⁶⁾.

Revisão sistemática de 2012⁽⁹⁶⁾ analisou 58 estudos experimentais com PCI, identificados através de pesquisa no PubMed e no Embase com o objetivo de detectar fatores que poderiam modificar os efeitos do PCI na LRA. Este estudo demonstrou que: a) a janela de proteção tardia (>24 horas) foi mais efetiva em reduzir a Crp, com uma diferença média padronizada de 2,43 e intervalo de confiança precoce x tardio de [1,29; 3,57]; b) a grande variabilidade de espécies estudadas e os diferentes protocolos utilizados modificaram a eficácia do PCI; c) o viés de publicação com estudos negativos sub-representados na literatura possivelmente poderia superestimar o tamanho dos efeitos.

Bo et al.⁽⁹⁷⁾ demonstraram que os efeitos protetores do PCI incluem duas fases distintas: uma precoce, que dura de 2 a 3 horas, na qual o mecanismo está associado à inibição do fator de necrose tumoral (TNF-alfa) e uma tardia, que começa de 12 a 24 horas após o insulto inicial, promovida pelo recrutamento de células progenitoras. A fase tardia estendeu-se com valores de

creatinina significativamente menores em relação ao controle até sete dias depois. Como a avaliação final do estudo foi precoce (24 horas), a fase tardia dos grupos não pode ser avaliada na sua totalidade como fator de comparação.

A transposição clínica dos estudos experimentais com o PCI vem apresentando alguns obstáculos. A necessidade de acesso direto ao suprimento sanguíneo do órgão de risco torna a técnica aplicável apenas em casos eletivos e controlados. Estudos clínicos têm falhado em demonstrar o benefício da técnica de PCI. A grande variedade de protocolos utilizados pode ser uma das razões para este insucesso, mostrando que, em alguns casos, o estímulo pode ter sido submáximo ou aplicado incorretamente⁽⁹⁶⁾.

O PCol é uma técnica mais recente, aplicada pela primeira vez por Zhao et al.⁽⁴¹⁾ em 2003, apresentando como principal vantagem, em relação a outras técnicas de condicionamento, a capacidade de ser realizada no tempo da reperfusão e não necessitar que o episódio isquêmico seja predito.

O melhor modelo animal para o PCol também é controverso. O PCol renal foi realizado pela primeira vez por Jiang et al.⁽⁴⁶⁾ em 2010 em estudo experimental com cães, comparando três algoritmos diferentes: seis ciclos de 15 segundos, seis ciclos de 30 segundos e três ciclos de 60 segundos. Foram encontradas diferenças significativas entre os três algoritmos. O grupo de seis ciclos de 15 segundos foi mais efetivo em diminuir a lesão renal aguda, demonstrando que um período mais curto de isquemia poderia ser benéfico.

Estudos mais recentes têm sugerido que períodos de isquemia mais curtos podem ser favoráveis ao aplicar um modelo de PCol. Van den Akker et al. 2013⁽¹¹⁾ revisaram 13 estudos experimentais com LIR e PCol, com diferentes modelos *in vivo*, demonstrando melhora na função e histologia renais em 11 deles, enquanto dois não apresentaram benefícios. A maioria apresenta tempo de reoclusão e reperfusão de 10 a 60 segundos. Tempo maior foi utilizado como protocolo no presente estudo (5min), o qual foi definido com o objetivo de comparação com o PCI, necessitando ser o mesmo formato. Essa diferença é uma possível explicação para os efeitos não protetores encontrados na análise estabelecida.

A duração do episódio isquêmico parece ser crítica no sucesso das estratégias de condicionamento isquêmico. Se o período isquêmico for muito prolongado, pode haver pouco tecido a ser salvo, enquanto um período muito curto ocasionará um dano muito pequeno (2). Manintveld et al.⁽⁹⁸⁾ utilizaram três algoritmos de PCol em modelo de isquemia miocárdica em ratos: PCol com três ciclos, sendo um de 5 segundos, um de 15 segundos e outro de 30 segundos de isquemia com igual intervalo de reperfusão e aplicaram em diferentes cenários de isquemia maior. Os autores demonstraram que o PCol diminuiu a área de infarto quando a isquemia maior era de 45min ou 60min, foi indiferente nos casos de 90min ou 120min e agravou a área de infarto quando era de 15min ou 30 min. Essas evidências demonstram que o tipo de estratégia a ser utilizada pode não melhorar o desfecho e, em alguns casos, pode ser prejudicial.

Assim como o PCI, a transposição clínica dos resultados experimentais com PCol vem encontrando algumas dificuldades. Ao extrapolar os resultados produzidos em modelos animais, é importante lembrar que os animais utilizados geralmente são jovens, derivados de linhagens puras, com a mesma idade, sob as mesmas condições ambientais e nutricionais e sem comorbidades. Os primeiros passos para que isto aconteça estão sendo realizados e, embora o estudo pioneiro desenvolvido por van den Akker et al. em 2013⁽⁹⁹⁾ aplicando o PCol em 20 pacientes submetidos a transplante renal doador cadáver não tenha encontrado benefícios, eles demonstraram que a técnica é factível e aparentemente segura.

A análise das características e dos resultados dos estudos experimentais com PCI e PCol pode ser a chave para a aplicabilidade futura dos métodos de condicionamento. A interação protocolo *versus* espécie animal ainda é um desafio, sendo que o número e a duração dos ciclos devem ser definidos e individualizados para que se possa alcançar um desfecho positivo.

6 Considerações Finais

Em relação ao modelo animal, outros grupos de PCI poderiam ter sido incluídos no estudo. A inclusão de um grupo no qual 24 horas antes da isquemia maior fosse realizado nefrectomia direita e PCI poderia possibilitar a avaliação da janela tardia e eliminar o estresse cirúrgico do procedimento como fator de viés para biomarcadores precoces.

A duração do episódio isquêmico maior parece ser crítica no sucesso das estratégias de condicionamento isquêmico e as diferenças entre os protocolos aplicados para PCI e PCoI dificulta a comparação entre estas técnicas, pois apresentam características diferentes.

Tanto a Crp quanto a Urp demonstraram ser biomarcadores mais discriminativos em relação ao diagnóstico de LRA e seus valores foram compatíveis com os resultados encontrados na análise histológica.

7 Conclusão

A comparação entre o efeito do PCI e do PCol mostra que no modelo utilizado no estudo não houve proteção na função nem na histologia renais dos animais, seja em aplicação isolada, seja em conjunto.

A análise histológica foi correlacionada com os resultados da dosagem de Urp, Crp e a classificação de AKIN.

O biomarcador NGAL não foi discriminativo e a elevação de seus valores no grupo S demonstra que ele foi incapaz de diferenciar os grupos submetidos à isquemia.

8 Referências

1. Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Amara MA, Seifalian AM, Davidson BR. Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion Injury- a review. *J Surg Res*. 2008 Dec;150(2):304-30.
2. McCafferty K, Forbes S, Thiemermann C, Yaqoob MM. The challenge of translating ischemic conditioning from animal models to humans: the role of comorbidities. *Dis Model Mech*. 2014 Dec;7(12):1321-33.
3. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion-from mechanism to translation. *Nat Med*. 2011 Nov;17(11):1391-401.
4. Ogawa S, Gerlach H, Esposito C, Pasagian-Macaulay A, Brett J, Stern D. Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium. Increased monolayer permeability and induction of procoagulant properties. *J Clin Invest*. 1990 Apr;85:1090–1098.
5. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med*. 2009 Oct;361(16):1570– 1583.
6. Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med*. 2011 Feb; 364(7):656–665.
7. Bo CJ, Chen B, Jia RP, Zhu JG, Cao P, Liu H, et al. Effects of ischemic preconditioning in the late phase on homing of endothelial progenitor cells in renal ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc*. 2013 Mar;45(2):511-6.
8. Carroll MC, Holers VM. Innate autoimmunity. *Adv Immunol*. 2005; 86:137–157.
9. Kheterpal S, Tremper KK, Englesbe MJ, O'Reilly M, Shanks AM, Fetterman DM, et al. Predictors of postoperative acute renal failure after noncardiac surgery in patients with previously normal renal function. *Anesthesiology*. 2007 Dec;107(6):892-902.

10. Obal D, Dettwiler S, Favoccia C, Scharbatke H, Preckel B, Schlack W. The influence of mitochondrial K_{atp} -channels in the cardioprotection of preconditioning and posconditioning by sevoflurane in the rat in vivo. *Anesth Analg*. 2005 Nov;101(5):1252-60.
11. van den Akker EK, Manintveld OC, Hesselink DA, de Bruin RW, Ijzermans JN, Dor FJ. Protection against renal ischemia-reperfusion injury by ischemic postconditioning. *Transplantation*. 2013 Jun;95(11):1299-305.
12. Jang HS, Kim JI, Kim J, Park JW, Park KM. Angiotensin II removes kidney resistance conferred by ischemic preconditioning. *Biomed Res Int*. 2014 Aug;2014:602149. PubMed; PMID 25243156.
13. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986 Nov;74(5):1124-36.
14. Reimer KA, Murry CE, Yamasawa I, Hill ML, Jennings RB. Four brief periods of myocardial ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis. *Am J Physiol*. 1986 Dec;251(6 Pt 2):H1306-15.
15. McCafferty K, Byrne C, Yaqoob MM. Ischaemic conditioning strategies for the nephrologist: a promise lost in translation? *Nephrol Dial Transplant*. 2014 Oct;29(10):1827-40.
16. Li G, Chen S, Lu E, Hu T. Protective effects of ischemic preconditioning on lung ischemia reperfusion injury: an in-vivo rabbit study. *Thorac Cardiovasc Surg*. 1999 Feb;47(1):38-41.
17. Hardy KJ, McClure DN, Subwongcharoen S. Ischaemic preconditioning of the liver: a preliminary study. *Aust N Z J Surg*. 1996 Oct;66(10):707-10.
18. Cochrane J, Williams BT, Banerjee A, Harken AH, Burke TJ, Cairns CB, et al. Ischemic preconditioning attenuates functional, metabolic, and morphologic injury from ischemic acute renal failure in the rat. *Ren Fail*. 1999 Mar;21(2):135-45.

19. Joo JD, Kim M, D'Agati VD, Lee HT. Ischemic preconditioning provides both acute and delayed protection against renal ischemia and reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Nov;17:3115-3123.
20. Jefayri MK, Grace PA, Mathie RT. Attenuation of reperfusion injury by renal ischaemic preconditioning: the role of nitric oxide. *BJU Int*. 2000 Jun;85:1007-1013.
21. Hernandez DJ, Roberts WB, Miles-Thomas J, Magheli A, Saha S, Schaeffer EM, et al. Can ischemic preconditioning ameliorate renal ischemia-reperfusion injury in a single-kidney porcine model? *J Endourol*. 2008 Nov;22:2531-2536.
22. Salehipour M, Khezri A, Monabbati A, Jalaeian H, Kroup M, Azizi V, et al. Ischemic preconditioning protects the dog kidney from ischemia-reperfusion injury. *Urol Int* 2007;79:328-331.
23. Guye ML, Mc Gregor B, Weil G, Arnal F, Piriou V. Ischaemic and pharmacologic preconditioning: desflurane reduces renal reperfusion injury in rabbits. *Ann Fr Anesth Reanim*. 2010 Jul-Aug;29:518-523.
24. Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest*. 1994 Oct;94:1621-1628.
25. Terada K, Kaziro Y, Satoh T. Analysis of Ras-dependent signals that prevent caspase-3 activation and apoptosis induced by cytokine deprivation in hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jan;267:449-455.
26. Kennedy SG, Kandel ES, Cross TK, Hay N. Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Mol Cell Biol*. 1999 Aug;19:5800-5810.

27. Lecour S. Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: does it go beyond the RISK pathway? *J Mol Cell Cardiol.* 2009 Jul;47:32-40. PubMed; PMID: 19344728.
28. Hattori R, Maulik N, Otani H, Zhu L, Cordis G, Engelman RM, et al. Role of STAT3 in ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol.* 2001 Nov;33:1929-1936.
29. Lawson CS, Downey JM. Preconditioning: state of the art myocardial protection. *Cardiovasc Res.* 1993 Apr;27:542-550.
30. Miura T, Tsuchida A. Adenosine and preconditioning revisited. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999 Feb;26(2):92-9.
31. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* Sep. 1993;88:1264-1272.
32. Hausenloy DJ, Yellon DM. The second window of preconditioning (SWOP) where are we now? *Cardiovasc Drugs Ther.* 2010 Jun;24:235-254.
33. Solenkova NV, Solodushko V, Cohen MV, Downey JM. Endogenous adenosine protects preconditioned heart during early minutes of reperfusion by activating Akt. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006 Jan;290:H441-H449.
34. Lee HT, Emala CW. Protective effects of renal ischemic preconditioning and adenosine pretreatment: role of A(1) and A(3) receptors. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000 Mar;278:F380-F387.
35. Sugino H, Shimada H, Tsuchimoto K. Role of adenosine in renal protection induced by a brief episode of ischemic preconditioning in rats. *Jpn J Pharmacol.* 2001 Oct;87:134-142.

36. Lee HT, Emala CW. Protein kinase C and G(i/o) proteins are involved in adenosine- and ischemic preconditioning-mediated renal protection. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Feb;12:233-240.
37. Ogawa T, Nussler AK, Tuzuner E, Neuhaus P, Kaminishi M, Mimura Y, et al. Contribution of nitric oxide to the protective effects of ischemic preconditioning in ischemia-reperfused rat kidneys. *J Lab Clin Med*. 2001 Jul;138:50-58.
38. He X, Xu X, Fan M, Chen X, Sun X, Luo G, et al. Preconditioning with hyperbaric oxygen induces tolerance against renal ischemia-reperfusion injury via increased expression of heme oxygenase-1. *J Surg Res*. 2011 Oct;170:e271-e277.
39. Patschan D, Krupincza K, Patschan S, Zhang Z, Hamby C, Goligorsky MS. Dynamics of mobilization and homing of endothelial progenitor cells after acute renal ischemia: modulation by ischemic preconditioning. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Jul;291(1):F176-85.
40. Barcelos LS, Duplaa C, Kränkel N, Graiani G, Invernici G, Katare R, et al. Human CD133+ progenitor cells promote the healing of diabetic ischemic ulcers by paracrine stimulation of angiogenesis and activation of Wnt signaling. *Circ Res*. 2009 May 8;104(9):1095-102.
41. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Aug;285(2):H579-88.
42. Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, Wang NP, Corvera JS, Halkos ME, et al. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res*. 2004 Apr;62(1):74-85.

43. Gritsopoulos G, Iliodromitis EK, Zoga A, Farmakis D, Demerouti E, Papalois A, et al. Remote postconditioning is more potent than classic postconditioning in reducing the infarct size in anesthetized rabbits. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2009 Jun;23(3):193-8.
44. Fujita M, Asanuma H, Hirata A, Wakeno M, Takahama H, Sasaki H, et al. Prolonged transient acidosis during early reperfusion contributes to the cardioprotective effects of postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Apr;292(4):H2004-8.
45. Zhao JL, Yang YJ, You SJ, Cui CJ, Gao RL. Different effects of postconditioning on myocardial no-reflow in the normal and hypercholesterolemic mini-swines. *Microvasc Res.* 2007 Mar;73(2):137-42.
46. Jiang B, Liu X, Chen H, Liu D, Kuang Y, Xing B, et al. Ischemic postconditioning attenuates renal ischemic/reperfusion injury in mongrel dogs. *Urology.* 2010 Dec;76(6):1519. PubMed; PMID: 20970171.
47. Weng X, Shen H, Kuang Y, Liu X, Chen Z, Zhu H, et al. Ischemic postconditioning inhibits the renal fibrosis induced by ischemia-reperfusion injury in rats. *Urology* 2012 Aug;80:484.e1-7 . PubMed; PMID: 22578919.
48. Kin H, Zatta AJ, Lofye MT, Amerson BS, Halkos ME, Kerendi F, et al. Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine. *Cardiovasc Res.* 2005 Jul;67:124-133.
49. Burley DS, Baxter GF. Pharmacological targets revealed by myocardial postconditioning. *Curr Opin Pharmacol.* 2009 Apr;9:177-188.
50. Zatta AJ, Kin H, Yoshishige D, Jiang R, Wang N, Reeves JG, et al. Evidence that cardioprotection by postconditioning involves preservation of myocardial opioid content and selective opioid receptor activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 Mar;294(3):H1444-51.

51. Penna C, Mancardi D, Rastaldo R, Losano G, Pagliaro P. Intermittent activation of bradykinin B2 receptors and mitochondrial KATP channels trigger cardiac postconditioning through redox signaling. *Cardiovasc Res*. 2007 Jul;75:168-177.
52. Yang XM, Proctor JB, Cui L, Krieg T, Downey JM, Cohen MV. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Sep;44:1103-1110.
53. Weinbrenner C, Liu GS, Downey JM, Cohen MV. Cyclosporine A limits myocardial infarct size even when administered after onset of ischemia. *Cardiovasc Res*. 1998 Jul;38:678-684.
54. Argaud L, Gateau-Roesch O, Raissy O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation*. 2005 Jan;111:194-197.
55. Sun HY, Wang NP, Kerendi F, Halkos M, Kin H, Guyton RA, et al. Postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Apr;288:H1900-8.
56. Jiang XQ, Ni J, Yang P, Huang W, Li HF. Protective effects of morphine postconditioning on renal tissue against acute hypoxic-reoxygenation injury in rabbit. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2012 Jan;43:38-40.
57. Chen H, Xing B, Liu X, Zhan B, Zhou J, Zhu H, et al. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after renal ischemia/reperfusion injury in rat. *Transpl Int* 2008 Apr;21:364-371.
58. Zhang WL, Zhao YL, Liu XM, Chen J, Zhang D. Protective role of mitochondrial K-ATP channel and mitochondrial membrane transport pore in rat kidney ischemic postconditioning. *Chin Med J (Engl)*. 2011 Jul;124:2191-2195.

59. Chang CH, Lin CY, Tian YC, Jenq CC, Chang MY, Chen YC, et al. Acute kidney injury classification: comparison of AKIN and RIFLE criteria. *Shock*. 2010 Mar;33(3):247-52.
60. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA*. 2005 Aug; 294:813-8.
61. Pisoni R, Wille KM, Tolwani AJ. The epidemiology of severe acute kidney injury: from BEST to PICARD, in acute kidney injury: new concepts. *Nephron Clin Pract*. 2008; 109: c188-91.
62. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P; Acute Dialysis Quality Initiative Workgroup. 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 Aug; 8:R204-12.
63. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, et al; Acute Kidney Injury Network. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care*. 2007;11:R31. PubMed; PMID: 17331245.
64. Traynor J, Mactier R, Geddes CC, Fox JG. How to measure renal function in clinical practice. *BMJ*. 2006 Oct;333(7571):733-7.
65. Herget-Rosenthal S, Marggraf G, Husing J, Goring F, Pietruck F, Janssen O, et al. Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int*. 2004 Sep;66(3):1115-22.
66. Coca SG, Yalavarthy R, Concato J, Parikh CR. Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: a systematic review. *Kidney Int*. 2008 May;73(9):1008-16.
67. Makris K, Kafkas N. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in acute kidney injury. *Adv Clin Chem*. 2012;58:141-91.

68. Nguyen MT, Devarajan P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Pediatr Nephrol*. 2008 Dec;23(12):2151-7.
69. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet*. 2005 Apr;365(9466):1231-8.
70. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis*. 2009 Dec;54(6):1012-24.
71. Park Y, Hirose R, Dang K, Xu F, Behrends M, Tan V, et al. Increased severity of renal ischemia-reperfusion injury with venous clamping compared to arterial clamping in rat model. *Surgery*. 2008 Feb;143(2):243-51.
72. Eckelman WC, Kilbourn MR, Joyal JL, Labiris R, Valliant JF. Justifying the number of animals for each experiment. *Nucl Med Biol*. 2007 Apr;34(3):229-32.
73. Goyal SN, Sharma C, Mahajan UB, Patil CR, Agrawal YO, Kumari S. Protective Effects of Cardamom in Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Rats. *Int J Mol Sci*. 2015 Nov;16(11):27457-69.
74. Lee TM, Su SF, Tsai CC, Lee YT, Tsai CH. Cardioprotective effects of 17 beta-estradiol produced by activation of mitochondrial ATP-sensitive K(+) Channels in canine hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 2000 Jul;32(7):1147-58.
75. Sugishita K, Su Z, Li F, Philipson KD, Barry WH. Gender influences [Ca(2+)]_i during metabolic inhibition in myocytes overexpressing the Na(+)-Ca(2+) exchanger. *Circulation*. 2001 Oct;104(17):2101-6.
76. Node K, Kitakaze M, Kosaka H, Minamino T, Funaya H, Hori M. Amelioration of ischemia- and reperfusion-induced myocardial injury by 17beta-estradiol: role of nitric oxide and calcium-activated potassium channels. *Circulation*. 1997 Sep;96(6):1953-63.

77. Pelzer T, Schumann M, Neumann M, deJager T, Stimpel M, Serfling E, et al. 17beta-estradiol prevents programmed cell death in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Feb;268(1):192-200.
78. Ebrahimi SM, Aboutaleb N, Nobakht M. Consequences of ischemic preconditioning of kidney: comparing between male and female rats. *Iran J Basic Med Sci*. 2012 Nov;15(6):1148-53.
79. Modolo NS, Castiglia YM, Ganem EM, Braz JR, Vianna PT, Vane LA. Acute renal ischemia model in dogs: effects of metoprolol. *Ren Fail*. 2001 Jan;23(1):1-10.
80. Dobashi K, Singh I, Orak JK, Asayama K, Singh AK. Combination therapy of N-acetylcysteine, sodium nitroprusside and phosphoramidon attenuates ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *Mol Cell Biochem*. 2002 Nov;240(1-2):9-17
81. Zager RA, Altschuld R. Body temperature: an important determinant of severity of ischemic renal injury. *Am J Physiol*. 1986 Jul;251(1 Pt 2):F87-93.
82. Delbridge MS, Shrestha BM, Raftery AT, El Nahas AM, Haylor JL. The effect of body temperature in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc*. 2007 Dec;39(10):2983-5.
83. Fujii T, Kurata H, Takaoka M, Muraoka T, Fujisawa Y, Shokoji T, et al. The role of renal sympathetic nervous system in the pathogenesis of ischemic acute renal failure. *Eur J Pharmacol*. 2003 Nov;481(2-3):241-8.
84. Conger J . Hemodynamic factors in acute renal failure. *Adv Ren Replace Ther*. 1997 ;4(2 Suppl 1):25-37.
85. Pagel PS, Kampine JP, Schmeling WT, Warltier DC. Comparison of the systemic and coronary hemodynamic actions of desflurane, isoflurane, halothane, and enflurane in the chronically instrumented dog. *Anesthesiology*. 1991 Mar;74(3):539-51.

86. Lee HT, Ota-Setlik A, Fu Y, Nasr SH, Emala CW. Differential protective effects of volatile anesthetics against renal ischemia-reperfusion injury in vivo. *Anesthesiology*. 2004 Dec;101(6):1313-24.
87. Obal D, Rascher K, Favoccia C, Dettwiler S, Schlack W. Post-conditioning by a short administration of desflurane reduced renal reperfusion injury after differing of ischaemia times in rats. *Br J Anaesth*. 2006 Dec;97(6):783-91.
88. Hashiguchi H, Morooka H, Miyoshi H, Matsumoto M, Koji T, Sumikawa K. Isoflurane protects renal function against ischemia and reperfusion through inhibition of protein kinases, JNK and ERK. *Anesth Analg*. 2005 Dec;101(6):1584-9.
89. Ogawa T, Mimura Y, Hiki N, Kanauchi H, Kaminishi M. Ischaemic preconditioning ameliorates functional disturbance and impaired renal perfusion in rat ischaemia-reperfused kidneys. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000 Dec;27(12):997-1001.
90. Kadkhodae M, Aryamanesh S, Faghihi M, Zahmatkesh M. Protection of rat renal vitamin E levels by ischemic-preconditioning. *BMC Nephrol*. 2004 Apr;5:6.
91. Joo JD, Kim M, D'Agati VD, Lee HT. Ischemic preconditioning provides both acute and delayed protection against renal ischemia and reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Nov;17(11):3115-23.
92. Bussmann AR, Marton Filho MA, Módolo MP, Módolo RP, Amado P, Domingues MA, et al. Effect of allopurinol on the kidney function, histology and injury biomarker (NGAL, IL 18) levels in uninephrectomised rats subjected to ischaemia-reperfusion injury. *Acta Cir Bras*. 2014;29(8):515-21.

93. Chander V, Chopra K. Role of nitric oxide in resveratrol-induced renal protective effects of ischemic preconditioning. *J Vasc Surg.* 2005 Dec;42(6):1198-205.
94. Song T, Peng YF, Guo SY, Liu YH, Liul LY. Brief small intestinal ischemia lessens renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Comp Med.* 2007 Apr;57(2):200-5.
95. Timsit MO, Gadet R, Ben Abdennebi H, Cudas R, Petruzzo P, Badet L. Renal ischemic preconditioning improves recovery of kidney function and decreases alpha-smooth muscle actin expression in a rat model. *J Urol.* 2008 Jul;180(1):388-91.
96. Wever KE, Menting TP, Rovers M, van der Vliet JA, Rongen GA, Masereeuw R, et al. Ischemic preconditioning in the animal kidney, a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2012;7(2):e32296.
97. Bo CJ, Chen B, Jia RP, Zhu JG, Cao P, Liu H, et al. Effects of ischemic preconditioning in the late phase on homing of endothelial progenitor cells in renal ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc.* 2013 Mar;45(2):511-6.
98. Manintveld OC, Te Lintel Hekkert M, van den Bos EJ, Suurenbroek GM, Dekkers DH, Verdouw PD, et al. Cardiac effects of postconditioning depend critically on the duration of index ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Mar;292(3):H1551-60.
99. van den Akker EK, Hesselink DA, Manintveld OC, Lafranca JA, de Bruin RW, Weimar W, et al. Ischemic postconditioning in human DCD kidney transplantation is feasible and appears safe. *Transpl Int.* 2014 Feb;27(2):226-34.