Antonio Carlos Cerqueira Oliveira

Efeitos da ciclosporina na lesão renal por isquemia-reperfusão em ratos: estudo em modelo experimental

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Anestesiologia.

Orientadora: Professora Titular Norma Sueli Pinheiro Módolo

Botucatu - SP

2015

Antonio Carlos Cerqueira de Oliveira

Efeitos da ciclosporina na lesão renal por isquemia-reperfusão em ratos: estudo em modelo experimental

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profa. Titular Norma Sueli Pinheiro Módolo

Comissão examinadora

Profa. Titular Norma Sueli Pinheiro Módolo
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP

Prof. Dr Luiz Antonio Vane
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP

Prof. Dra Angélica de Fátima Assunção Braga
Universidade Estadual de Campinas

Botucatu, _____ de _____de_____.

Dedicatória

"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota".

Madre Teresa de Calcutá

Este trabalho é dedicado ao Pai Celestial, primeiro motor necessário e suficiente da minha existência; à minha família, meus pais, meus irmãos, minha esposa e minhas filhas, fonte de toda inspiração, amor e luta que me conduzem ao êxtase de uma vida digna e profusa; e aos amigos que exercem a pureza altruística da alma humana de desejar generosamente o nosso sucesso, sem culpas.

A vocês, todo o meu amor!

Agradecimento Especial

"O essencial, com efeito, na educação, não é a doutrina ensinada, é o despertar".

Ernest Renan

À Profa. Titular Norma Sueli Pinheiro Módolo, que com seu exemplo de simplicidade, carinho e competência deixa resplandecer de forma mais fulgurante a sua grandiosidade.

Agradecimentos

À UNESP – Universidade Estadual Paulista por ser uma instituição de excelência acadêmica e fomentadora desta.

Aos Professores do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, por promoverem ensino de qualidade e por terem me despertado para a necessidade da eterna busca pelo conhecimento.

Ao Professor Mestre Marcus Vinicius de Brito Santana, pela análise estatística dessa pesquisa e suporte metodológico.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Domingues, pelo estudo histológico das lâminas.

À Neli Aparecida Pavan, Joana Jacirene Costa Teixeira, André Renato Passaroni, Sônia Maria Martins e Silva, Marcelo Donizetti e Tatiane de Fátima Piñeiz Biondo, funcionários do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, que sempre se mostraram acessíveis e disponíveis, com um sorriso encorajador estampado no rosto, na consecução desse modesto, mas querido, projeto de pesquisa.

Aos queridos funcionários do Laboratório Experimental de Anestesiologia, Cristiano Correa de Oliveira e Jurandir Antonio, meu sincero reconhecimento.

Aos meus colegas de trabalho, verdadeiros companheiros na concretização deste projeto pessoal que intimamente me realiza e integraliza.

À Isadora Souza Rodrigues, aluna da iniciação científica pelo inestimado auxílio prestado.

A todos que contribuíram para a realização deste projeto.

Oliveira, ACC. Efeitos da ciclosporina na lesão renal por isquemia-reperfusão em ratos: estudo em modelo experimental. Botucatu, 2015. 73p. Dissertação (Mestrado em Anestesiologia), Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP.

RESUMO

Lesão isquêmica nos rins contribui decisivamente para o aumento da morbimortalidade. Várias estratégias de intervenção na lesão isquemia-reperfusão (LIR) têm sido propostas, dentre estas, a utilização da Ciclosporina A (CsA). A literatura, contudo, apresenta resultados controversos quanto ao seu benefício. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da CsA na LIR renal em ratos. Trata-se de um estudo experimental conduzido de março a junho de 2013, no laboratório da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da UNESP de Botucatu. Variáveis de controle da homeostase: pressões arteriais sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM), peso e temperatura (T) foram incluídas, além das medidas de creatinina, ureia e sódio séricos e classificação de RIFLE (protocolo de diagnóstico e estratificação de risco na lesão renal aguda (LRA)). Avaliação histológica foi realizada ao término do experimento. Os parâmetros PAS, PAD, PAM e T foram aferidos nos tempos T0 (início do experimento, após dissecção da artéria carótida esquerda); T1 (após o desclampeamento da artéria renal esquerda); e T2 (30 minutos após a reperfusão). As dosagens de creatinina, ureia e sódio foram realizadas nos momentos M0, que correspondeu ao tempo T0; M1, correspondente ao tempo T2; e M2, 12 horas após o procedimento cirúrgico inicial. Foram incluídos no estudo 30 ratos *Wistar* alocados aleatoriamente em três grupos: **Sham (S)**: laparotomia e nefrectomia direita. **Controle (C)**: laparotomia e nefrectomia direita, isquemia-reperfusão em rim esquerdo. **Cicloscoprina (CsA)**: os mesmos procedimentos realizados no grupo anterior e administração de ciclosporina (CsA) em duas doses de 15 mg/kg, 24 horas antes do procedimento cirúrgico inicial e imediatamente antes deste. As avaliações descritivas do RIFLE mostraram que tanto o grupo Controle como CsA apresentaram resultados negativos em relação ao grupo Sham. A avaliação dos valores de sódio não mostrou diferença significativa dentro de cada grupo ao longo dos três momentos. Sobre a função renal, as análises pareadas de creatinina sérica mostraram diferença entre todos os grupos entre os momentos, apesar da análise descritiva mostrar que os grupos Controle e CsA tiveram uma mudança maior. Conclui-se, então, que nessas condições, a CsA foi incapaz de prevenir os efeitos deletérios da LIR em ratos, apesar de atenuá-los segundo a histologia.

Palavras-Chave: lesão isquemia-reperfusão; lesão renal aguda; ratos; rim; ciclosporina.

Oliveira, ACC. Cyclosporine action on ischemia/reperfusion injury in rats: experimental study. Botucatu, 2015. 73p. Thesis (MSc degree in Anesthesiology), Botucatu Medical School, UNESP-Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Kidney ischemic injury contributes decisively to the increase of morbidity and mortality. Various strategies of intervention in Ischemia-Reperfusion Injury (IRI) have been proposed, among them, the use of Cyclosporine A (CsA). However, studies present controversial results in relation to its benefits. The goal of this study was asses the effect of CsA in kidney IRI in rats. This is an experimental study conducted from March to June of 2013 in the laboratory of "Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX)" of UNESP in Botucatu. Variables of homeostasis: systolic blood pressure (PAS), diastolic blood pressure (PAD), mean blood pressure (PAM), weight and temperature (T) controls were included, as were the measures of serum creatinine, urea nitrogen, and sodium, and RIFLE classification (protocol of diagnosis and risk stratification in acute renal injury), measured during three moments: PAS, PAD, PAM and T were measured at T0 (after catheterization of the carotid artery); T1 (after the clamping of the left renal artery); T2 (30 minutes after reperfusion). Serum creatinine, urea nitrogen and sodium were collected at M0 (T0); M1 (T2) and M2, 12 hours after the initial surgical procedure. Histological evaluation was performed at the end of the experiment. Thirty rats were included, randomly allocated in three groups: sham group (GS), which had only laparotomy and right nephrectomy; control group (GC) which additionally had ischemia reperfusion maneuver, and cyclosporine A group (GCsA), which besides having the afore mentioned procedures would use CsA intraperitoneal (15 mg/kg), 24 hours before and at the moment of initial surgical procedure. The RIFLE descriptive evaluations showed that the Control group and the CsA group presented negative results in relation to the Sham group. The assessment of the sodium levels did not present a meaningful difference of its numbers in each group during the three moments. About kidney function, the paired analysis of serum creatinine showed a difference among all groups between moments one, two, and three, in spite of the fact that descriptive analysis show that Control and CsA groups had a bigger change. We can conclude that, in these conditions, CsA was unable to prevent the deleterious effects of IRI in rats, however it did attenuate these effects according to histology.

Key words: ischemia-reperfusion injury; acute kidney injury; rats; kidney; cyclosporine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	*Trifosfato de Adenosina*
BAD	*BH3-Only Proteins Type (Proteínas Tipo BH3 Apenas)*
BAX	*Bcl-2 Associated Protein X (Proteína X Associada a Bcl-2)*
BCL-2	*B-Cell Lymphoma Protein 2 (Proteína 2 do Linfoma de Célula-B)*
BID	*BH3-Interacting Domain Death Agonist (Agonista do Domínio Morte Interagindo com BH3)*
Células TREG	*Células T-Reguladoras*
COX-2	*Ciclo Oxigenase 2*
Crry	*Inibidor do Sistema Complemento localizado na membrana basolateral das células epiteliais*
CsA	*Ciclosporina A*
Cys C	*Cistatina C*
C3a	*Fator 3 Ativado do Sistema Complemento*
C5a	*Fator 5 Ativado do Sistema Complemento*
eNos	*Óxido Nítrico Sintetase Endotelial*
ERK	*Cinase Regulada por Sinal Extracelular*
ERO	*Espécies Reativas de Oxigênio*
FADD	*FAS-Associated Death Domain (Domínio Morte Associado a FAS)*
FAS ou APO-1	*Apoptosis Antigen 1 (Antígeno 1 da Apoptose)*
FF	*Fração de Filtração*
GA	*Gauge*
GS	*Grupo Sham*
GC	*Grupo Controle*
GCsA	*Grupo Ciclosporina A*
HMGB1	*Grupo de Alta Mobilidade Caixa 1*
ICC	*Insuficiência cardíaca congestiva*
iNos	*Óxido Nítrico Sintetase Indutível*
IL	*Interleucina*
IL-18	*Interleucina 18*
JNK	*Cinase Terminal c-Jun N*
K-ATP Channels	*Canais de Potássio Dependentes de ATP*
KIM I	*Molécula de Lesão Renal Tipo I*
LIR	*Lesão por Isquemia-Reperfusão*
LRA	*Lesão Renal Aguda*

mPTP	*Poro de Permeabilidade Transitória da Mitocôndria*
NAG	*N-acetil-ß-glucosaminidase*
NF-κB	*Fator-κB Nuclear*
NGAL	*Lipocalina Associada à Gelatinase de Neutrófilos*
NO	*Óxido Nítrico*
NTA	*Necrose Tubular Aguda*
O_2	*Oxigênio*
RIFLE	*Risk, Injury, Failure, Loss, End-stage of Renal Disease*
SNS	*Sistema Nervoso* Simpático
TCR	*Receptores de Células T (nas próprias células T)*
TFG	*Taxa de Filtração Glomerular*
TLR	*Receptor Tipo Toll*
TNF	*Fator de Necrose Tumoral*
TSR	*Terapia de Substituição Renal*
UNESP	*Universidade Estadual Paulista*
UTI	*Unidade de Terapia Intensiva*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Escore dos graus de lesão renal atribuído aos exames histológicos.....	42
Tabela 2	Comparação das medidas de peso (g) entre os grupos estudados.....	44
Tabela 3	Comparação das medidas de pressão arterial média (mmHg) entre os grupos estudados.....	45
Tabela 4	Comparação das medidas de pressão arterial sistólica entre os grupos estudados.....	46
Tabela 5	Comparação das medidas de pressão arterial diastólica entre os grupos estudados.....	47
Tabela 6	Comparação das medidas de temperatura (ºC) entre os grupos estudados.....	47
Tabela 7	Comparação das medidas de creatinina sérica entre os grupos estudados.....	49
Tabela 8	Comparação das medidas de ureia sérica entre os grupos estudados.....	50
Tabela 9	Comparação das medidas de sódio sérico entre os grupos estudados.....	51
Tabela 10	Avaliação descritiva da função renal dos ratos (RIFLE).....	52
Tabela 11	Avaliação descritiva da função renal dos ratos (Histologia).....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fisiopatologia da LRA isquêmica.....	26
Figura 2	Classificação de RIFLE para LRA.....	28
Figura 3	Classificação de AKIN para LRA.....	28
Figura 4	Animais acondicionados em gaiola metabólica.....	36
Figura 5	Anestesia dos animais.....	37
Figura 6	Manutenção do animal após indução anestésica.....	37
Figura 7	Plataforma de aquecimento dos animais após permanecerem em plano anestésico.....	38
Figura 8	Incisão para dissecção de vasos cervicais.....	39
Figura 9	Laparotomia por incisão linear vertical mediana.....	40
Figura 10	Nefrectomia direita.....	40
Figura 11	Nefrectomia esquerda.....	41
Figura 12	Medidas de pressão arterial média nos tempos e grupos estudados.....	45
Figura 13	Medidas de pressão arterial sistólica nos tempos e grupos estudados.....	46
Figura 14	Medidas de pressão arterial diastólica nos tempos e grupos estudados.....	47
Figura 15	Análise pareada das medidas de temperatura nos grupos estudados.....	48
Figura 16	Análise pareada da creatinina sérica nos momentos estudados.....	49
Figura 17	Análise pareada da ureia sérica nos momentos estudados...	50
Figura 18	Análise pareada das medidas de sódio sérico nos momentos estudados.....	51
Figura 19	Rim esquerdo do grupo Sham. Grau 0 de Park. Parênquima renal normal, com os corpúsculos de Malpighi e os túbulos renais sem alterações (HE 200x).....	53
Figura 20	Rim esquerdo do grupo Ciclosporina A. Grau 4 de Park. Parênquima renal com necrose tubular, representada por morte celular (cariólise, cariorrexis e picnose), presença de material hialino e de “debris” celular na luz tubular (HE 400x).....	53
Figura 21	Rim esquerdo do grupo Controle. Grau 5 de Park. Parênquima renal com necrose tubular, evidenciando degeneração hidrópica da membrana epitelial basolateral, além das alterações descritas na lâmina anterior (HE 400x).	54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 133
2. REVISÃO DA LITERATURA 155
2.1. LESÃO RENAL AGUDA ISQUÊMICA (ISQUEMIA-REPERFUSÃO) 155
2.1.1. ALTERAÇÕES CELULARES DURANTE LRA 177
2.1.1.1. Lesão Celular Epitelial Aguda 177
2.1.1.2. Alterações Morfológicas 188
2.1.1.3. Mudanças Estruturais e do Citoesqueleto 188
2.1.1.4. Apoptose e Necrose 199
2.1.1.5. Disfunção Endotelial 211
2.1.1.5.1. Tono vascular 211
2.1.1.5.2. Permeabilidade 211
2.1.1.5.3. Coagulação 222
2.1.1.6. Leucócitos e Inflamação 233
2.2. CRITÉRIOS AKIN E RIFLE 277
2.3. ANESTÉSICOS INALATÓRIOS E LESÃO POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO 288
2.4. CICLOSPORINA A 3030
3. OBJETIVO 333
4. MATERIAIS E MÉTODOS 344
4.1. GRUPOS DE ESTUDO 344
4.2. TEMPOS ESTUDADOS 35
4.3. ATRIBUTOS ESTUDADOS 35
4.4. METODOLOGIA LABORATORIAL 35
4.5. MANOBRA DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO 35
4.6. SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL 366
4.7. MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA REPERFUSÃO 411
4.8. ESTUDO HISTOLÓGICO 422
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA 433
5. RESULTADOS 444
5.1 PESO 44
5.2. PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA 455
5.3. PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA 476
5.4. PRESSÃO ARTERIAL DIASTÓLICA 47
5.5. TEMPERATURA 488
5.6. CREATININA SÉRICA 499
5.7. UREIA SÉRICA 50
5.8. SÓDIO SÉRICO 511
5.9. RIFLE E HISTOLOGIA 52
6. DISCUSSÃO 555
7. CONCLUSÃO 633
8. REFERÊNCIAS 64

1 INTRODUÇÃO

Lesão isquêmica em órgãos vitais como coração, cérebro e rins contribui decisivamente para o aumento da morbimortalidade[1,2]. Isquemia renal durante oclusão arterial, choque e transplante de órgãos é uma causa comum de morte celular, falência renal, retardo funcional e rejeição do enxerto renal[3]. A privação de sangue oxigenado compromete a fosforilação oxidativa mitocondrial com dano irreversível em cada organela e sistemas subcelulares[4].

Após um episódio de isquemia renal aguda, reperfusão precoce permanece como uma estratégia primária para limitar a lesão do órgão, contudo, a reperfusão renal tem o potencial, por si só, de causar morte celular [5] semelhante ao observado no coração [6]. A investigação de estratégias protetoras utilizadas no momento da reperfusão são fundamentais no manuseio desse tipo de lesão[7,8].

A patogênese da lesão por isquemia-reperfusão (LIR) é complexa. De forma geral, os mecanismos envolvidos abrangem a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), ausência no controle do metabolismo do cálcio celular, depleção de ATP, obstrução dos capilares por vários elementos sanguíneos pré-formados e consequente diminuição do fluxo sanguíneo[4,9].

Várias estratégias de intervenção na LIR têm sido propostas, dentre estas, a utilização da Ciclosporina A (CsA)[10,11]. A CsA é uma droga imunossupressora rotineiramente utilizada em transplantes de órgãos sólidos, a qual tem sido atribuído efeito protetor na LIR, principalmente no coração onde tem sido investigada desde a década de 1990 com foco na sua capacidade de diminuir a extensão do infarto do miocárdio após isquemia-reperfusão coronariana, apresentando resultados promissores, encontrando-se em investigação translacional, especificamente na intervenção coronariana percutânea primária e na cirurgia de revascularização miocárdica[12-14]. Por outro lado, tem demonstrado resultados controversos quando se trata de LIR no rim, onde não há um número expressivo de trabalhos[10,15].

A CsA é um composto ciclopeptídico sintetizado a partir do fungo *Tolypocladium inflatum*, inicialmente desenvolvido como antifúngico, encontrou sua utilização como imunossupressor que age ligando-se a um grupo de pequenas proteínas regulatórias intracelulares, as ciclofilinas, formando um complexo capaz de inibir a proteína fosfatase calcineurina com consequente comprometimento da ativação dos linfócitos T. A CsA, ainda, pela mesma ação, a de se ligar à proteína ciclofilina D, no caso mitocondrial, é capaz de inibir a abertura dos poros de permeabilidade transitória, impedindo a saída de cálcio e o comprometimento definitivo desta organela, atuando de forma protetora em situações de isquemia-reperfusão celular[7,16].

Durante muito tempo, os dados epidemiológicos sobre lesão renal aguda (LRA) mostraram-se controversos, a exemplo das variações nos valores de incidência, entre 1% a 31%, assim como taxas de mortalidade de 28% a 82%, basicamente em razão de sua multiplicidade de definições, problema este resolvido com a publicação do critério RIFLE de diagnóstico de LRA, em 2004 que as uniformizou[2].

Apesar da medida de creatinina utilizada no critério RIFLE mostrar limitação no cenário das lesões renais agudas, esta é ainda a melhor opção para a sua avaliação[17], posto que os novos biomarcadores, dentre eles a Cistatina C (Cys C), a molécula de lesão renal 1 (KIM I), a lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos (NGAL), e a interleucina 18 (IL-18), encontram-se em investigação[18].

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Lesão Renal Aguda Isquêmica (isquemia-reperfusão)

O rim é constituído de populações celulares heterogêneas que trabalham em conjunto para realizar um número de processos complexos e estreitamente controlados. LRA é um evento clínico comum que rompe a homeostase, levando a uma elevada taxa de morbimortalidade. Uma causa importante de LRA é a isquemia, que pode ocorrer por uma série de razões, por exemplo, com o uso de drogas vasoconstrictoras ou agentes de contraste radiológico, além de hipotensão associada à sepse, perda sanguínea após cirurgia ou trauma. O organismo é capaz de se adaptar a uma redução de fluxo sanguíneo até certo estágio, porém quando a oferta de O_2 e substratos metabólicos se tornam inadequados, a lesão celular conduz à disfunção do órgão[19].

A identificação de indivíduos com maior risco para o desenvolvimento de LRA após diminuição leve à moderada da perfusão renal é crucial no sentido de evitar tal desfecho. Assim, variáveis como idade, doença renal crônica pré-existente e proteinúria, associadas aos biomarcadores tradicionais e aos critérios de estadiamento clínico (RIFLE e AKIN), devem ser avaliados nesse contexto, como procedimentos cirúrgicos eletivos, uso de drogas que potencialmente diminuam o fluxo sanguíneo renal e situações inflamatórias ou de alto potencial para causar estresse oxidativo[20-28].

A azotemia pode ser pré-renal, renal ou pós-renal. A pré-renal é a causa mais comum de LRA e contribui com 40%-55% de todos os casos. Esta condição é consequência de hipoperfusão renal secundária a volume arterial efetivo reduzido, ou seja, o volume sanguíneo que perfunde os órgãos de fato. Azotemia pré-renal se divide em duas apresentações, a que responde e a que não responde a volume. Em pacientes portadores da forma que não responde a volume a reposição volêmica não restabelece a função e a perfusão renais. Por exemplo, pacientes com condições como insuficiência cardíaca congestiva

(ICC) e sepse podem não responder à fluidoterapia venosa e apresentar diminuição do débito cardíaco e da resistência vascular total comprometendo a perfusão renal[31-33]. A compensação da azotemia pré-renal inclui a ativação de barorreceptores, que inicia a cascata de respostas neurohumorais, ativação do sistema nervoso simpático (SNS) e aumento na produção de catecolaminas, especialmente norepinefrina[34]. Ocorre também aumento na liberação de vasopressina que é mediado por hipovolemia e aumento na osmolalidade extracelular, resultando em vasoconstricção, retenção de água e escape retrógrado de ureia para o interstício papilar.

A ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona conduz ao aumento da produção do potente vasoconstrictor angiotensina II, que preferencialmente aumenta a resistência da arteríola eferente. A taxa de filtração glomerular (TFG), nesse contexto, se preserva por aumento da pressão hidrostática no glomérulo. A atividade da angiotensina II encontra-se também aumentada durante grande depleção de volume, o que leva a uma contração arteriolar aferente, reduzindo o fluxo plasmático renal, a TFG e a fração de filtração (FF)[35].

Simultaneamente, mecanismos compensatórios de autorregulação renal preservam a perfusão glomerular. Em condições fisiológicas, a autorregulação do fluxo sanguíneo renal trabalha acima de uma pressão sanguínea arterial sistêmica média de 75-80 mmHg. Abaixo desta faixa, a pressão de ultrafiltração glomerular e a TFG declinam abruptamente[19]. A produção renal de prostaglandinas, calicreína, cininas e óxido nítrico (NO) estão aumentadas e contribuem para a vasodilatação[36,37]. Drogas anti-inflamatórias não esteroidais inibem a produção de prostaglandinas e diminuem a perfusão renal. Os inibidores da enzima de conversão da angiotensina bloqueiam a síntese de angiotensina II e comprometem o delicado equilíbrio entre o tônus arteriolar aferente e eferente em pacientes que possuem reduções severas no volume arterial efetivo, tais como aqueles com insuficiência cardíaca congênita (ICC) ou estenose arterial renal bilateral, piorando, portanto, a azotemia pré-renal. Antagonicamente, níveis muito elevados de angiotensina II, como visto no

choque circulatório, causam constricção de ambas as arteríolas, aferente e eferente, o que anula seu efeito protetor[19].

Considerados em conjunto, esses dados fornecem fortes evidências de que certos pacientes identificáveis encontram-se em alto risco de desenvolverem LRA. Atenção aumentada na maximização de certas condições como estado hemodinâmico, dose de fármacos baseados na TFG e volemia é fundamental para a prevenção ou melhora da LRA nesses pacientes[19].

2.1.1 Alterações celulares durante LRA

2.1.1.1 Lesão celular epitelial aguda

Após redução na perfusão renal efetiva, as células epiteliais são incapazes de manter níveis intracelulares adequados de ATP para os processos essenciais. Esta depleção de ATP leva à lesão celular e, se muito grave, morte celular por necrose ou apoptose. Todos os segmentos do néfron podem ser afetados durante a agressão isquêmica, mas a célula epitelial mais comumente afetada é a tubular proximal em virtude da alta taxa metabólica necessária para transportes iônicos e da baixa tolerância à glicólise anaeróbica, além de uma única fonte vascular para a camada externa do segmento S3 do néfron (*pars recta)*, que leva a uma expressiva hipoperfusão microvascular e congestão deste após a lesão, que persiste e conduz a isquemia prolongada mesmo quando o fluxo sanguíneo cortical retorna a níveis próximos do normal. Lesão e disfunção endoteliais são os responsáveis primários por este fenômeno, conhecido como fase de extensão da LRA[38].

Outro grande grupo celular epitelial envolvido na fisiopatologia da LRA isquêmica é a porção ascendente espessa medular da alça de Henle, localizada distalmente. Alterações apoptóticas foram detectadas em LRA de seres humanos como demonstrado nos segmentos distais do néfron durante necrose aguda tubular tóxica. Lesão e disfunção celulares tubulares proximais durante isquemia ou sepse leva à vasoconstricção arteriolar aferente mediada por retroalimentação tubuloglomerular, obstrução luminal e retrovazamento do

filtrado através das células tubulares proximais lesionadas, resultando em filtração glomerular inefetiva e uma diminuição acentuada na TFG[39,40].

2.1.1.2 Alterações morfológicas

Uma alteração histopatológica típica da lesão isquêmica é a perda da borda em escova apical das células tubulares proximais. Ruptura das microvilosidades e seu destacamento da superfície celular apical leva à formação precoce de vesículas conectadas à membrana após isquemia que são liberadas dentro da luz tubular. Avulsão e perda das células tubulares expõem áreas desnudas da membrana basal, resultando em áreas focais de dilatação tubular proximal, assim como formação de cilindros tubulares distais que possuem o potencial de obstruir a luz tubular, levando à ausência de filtração glomerular na unidade funcional comprometida. Morte celular necrótica é rara e restrita a regiões medulares externas altamente suscetíveis, enquanto características apoptóticas são comumente observadas em células tubulares proximais e distais[19].

2.1.1.3 Mudanças estruturais e do citoesqueleto

O citoesqueleto de actina possui um papel integral na manutenção da estrutura e função celular, polaridade, endocitose, transdução de sinais, motilidade, movimentação de organelas, exocitose, divisão celular, migração, função de barreira de complexos juncionais e adesão da matriz celular[41]. Depleção do ATP celular leva a uma rápida ruptura da actina F (microfilamentar) apical por despolimerização mediada em parte pela cofilina e redistribuição da actina F central do citoesqueleto. Esta ruptura causa instabilidade da superfície da membrana e formação de vesículas extracelulares ligadas à membrana que se descamam para dentro da luz tubular ou são reabsorvidas pela célula para potencial reciclagem[42–45].

Outra consequência importante da ruptura do citoesqueleto de actina é a perda das junções firmes e das junções de adesão. Estes complexos juncionais participam ativamente de numerosas funções tais como transporte paracelular, polaridade celular e morfologia da célula. Lesão isquêmica inicial resulta em

abertura das junções firmes, levando ao aumento da permeabilidade paracelular e retrovazamento do filtrado glomerular para o interstício [46]. Durante isquemia, células epiteliais também perdem sua ligação à matriz extracelular subjacente levando à ruptura das integrinas. As células descamadas, então, se ligam umas às outras formando cilindros celulares dentro da luz tubular [19].

Alterações no citoesqueleto de actina durante isquemia resultam em mudanças na polaridade celular e na sua função. Bombas Na+/K+ - ATPase basolaterais são redistribuídas para a membrana apical tão precocemente quanto 10 minutos após ruptura do citoesqueleto espectrina-actina, a qual é responsável por conectar as bombas à membrana[47]. Redistribuição das bombas resulta em transporte bidirecional de sódio e água através da membrana apical, assim como da basolateral, com sódio celular sendo transportado de volta à luz tubular. Uma elevada concentração de sódio no filtrado atingindo o túbulo distal leva a uma redução da TFG pela ativação da retroalimentação túbulo-glomerular, com estimulação da mácula densa mediando vasoconstricção da arteríola aferente[19].

2.1.1.4 Apoptose e necrose

O destino da célula epitelial após um evento isquêmico depende, em última análise, da extensão da lesão. Células submetidas à lesão subletal ou menos intensa possuem a capacidade de recuperação estrutural e funcional se o insulto for interrompido. Células que sofrem uma lesão mais grave ou letal experimentam apoptose ou necrose que levam à morte celular. Apoptose é a morte celular programada, dependente de energia, que resulta em condensação do material citoplasmático e do núcleo para formar os corpos apoptóticos. Estes corpos apoptóticos ligados à membrana são rapidamente fagocitados por macrófagos e células epiteliais vizinhas. Durante necrose existe edema celular e das organelas, perda da integridade da membrana plasmática e rápida liberação de material citoplasmático e nuclear para a luz tubular ou o interstício. Necrose secundária ocorre quando células submetidas

à apoptose não possuem níveis suficientes de ATP para garantir a morte programada da célula[19].

Os mecanismos apoptóticos são complexos, com elementos afetando várias vias. A família caspase de proteases é um importante precursor e efetor da apoptose[48,49]. Tanto a via apoptótica intrínseca (mitocondrial) quanto a extrínseca (receptor morte) são ativadas na LRA. Especificamente, a ativação da procaspase-9 depende primariamente das vias intrínsecas mitocondriais reguladas pela família de proteínas Bcl-2, ao passo que a ativação da procaspase-8 resulta da sinalização extrínseca via receptores morte na superfície celular, tais como, antígeno 1 da apoptose (FAS) e antígeno 1 da apoptose associado ao domínio da morte (FADD)[48,49]. Comunicação importante também existe entre as vias intrínseca e extrínseca. Caspase-3, caspase-6 e caspase-7 são caspases efetoras que são abundantes e cataliticamente robustas, clivando muitas proteínas celulares que resultam no clássico fenótipo apoptótico. Inibição da atividade da caspase tem se mostrado protetora contra lesão *in vitro* e em LRA *in vivo* [50,51]. O equilíbrio entre sobrevivência e morte celular apoptótica depende das concentrações relativas de agentes pró-apoptóticos (BAX, BAD e BID) e anti-apoptóticos (Bcl-2 e proteína 1 semelhante à Bcl-2) [19].

A necrose de células epiteliais tubulares resulta de um aumento intracelular de cálcio e a ativação de fosfolipases da membrana e calpaína. Células necróticas, por este motivo, não exibem a condensação da cromatina e a fragmentação nuclear vistos na apoptose e nem formam corpos apoptóticos. Funcionalmente, depleção severa de ATP resulta inicialmente em lesão mitocondrial com subsequente parada da fosforilação oxidativa, levando ao posterior exaurimento dos estoques de energia e intensa formação de ERO. ERO, tais como peroxinitrito e ácido hipercloroso, são gerados por conversão catalítica nas células epiteliais tubulares durante lesão isquêmica. Estas moléculas lesionam as células de várias formas, incluindo peroxidação de lipídios nas membranas plasmática e intracelulares e instabilização de proteínas do citoesqueleto e integrinas, necessárias para manter a adesão

intercelular, assim como, as interações entre as células e a matriz extracelular. ERO podem apresentar efeitos vasoconstrictores por eliminação de NO[19].

A autofagia, que é um processo envolvido em degradação de componentes próprios da célula através de um maquinário lisossomal, está sendo progressivamente reconhecida como, talvez, a mais frequente via de morte no epitélio tubular lesionado[19].

2.1.1.5 Disfunção endotelial

As células endoteliais contribuem para o tônus vascular, a regulação do fluxo sanguíneo aos leitos teciduais locais, a modulação da coagulação e inflamação, além da permeabilidade vascular. Tanto a isquemia quanto a sepse possuem profundos efeitos sobre o endotélio renal, redundando em desregulação microvascular, isquemia continuada e lesão posterior, especialmente na camada mais externa do rim [41].

2.1.1.5.1 Tono vascular

Rins pós-isquêmicos de ratos demonstraram vasoconstricção em resposta à diminuição da pressão de perfusão renal, por consequência, não poderiam autorregular o fluxo sanguíneo, mesmo quando o fluxo sanguíneo renal total tinha retornado aos valores da linha de base com mais de uma semana após a lesão [52,53]. Globalmente, existe um desequilíbrio entre óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) e óxido nítrico sintetase indutível (iNOS) na LRA isquêmica. Tem sido proposto que em função de uma diminuição relativa na eNOS, secundária a dano e disfunção endotelial, exista a perda de propriedades antitrombogênicas do endotélio levando ao aumento da susceptibilidade à trombose microvascular[19].

2.1.1.5.2 Permeabilidade

A barreira endotelial separa a luz do vaso sanguíneo do tecido circundante e controla a troca de células e fluido entre esses dois compartimentos. O endotélio é limitado por vias trans e paracelulares, estas últimas dando uma contribuição maior para a disfunção endotelial induzida pela

inflamação[19]. O aumento da permeabilidade microvascular observado na LRA é causado provavelmente por uma combinação de fatores, tais como rupturas da monocamada endotelial e do citoesqueleto de actina, quebra da matriz perivascular, alterações nos contatos entre células endoteliais, interações supra-reguladas entre leucócitos e endotélio e alterações severas na integridade das junções de adesão da microvasculatura renal. Imagens de dois fótons *in vivo* demonstraram a perda da função de barreira capilar dentro de 2-4 horas de reperfusão, com efeitos máximos observados com 24h depois da lesão[54].

Quebra da função de barreira oferecida pelo endotélio pode ser consequência também da ativação da metaloproteinase-2 matriz ou da metaloproteinase-9 matriz, que se correlaciona temporariamente com um aumento na permeabilidade microvascular [38,55].

2.1.1.5.3 Coagulação

As células endoteliais possuem um papel central na coagulação por sua interação com a proteína C e a trombomodulina. A proteína C é ativada por clivagem mediada pela trombina e a taxa desta reação é aumentada em 1.000 vezes quando a trombina se liga ao receptor da trombomodulina na superfície da célula endotelial. A taxa de ativação da proteína C é posteriormente aumentada em aproximadamente 10 vezes quando o receptor endotelial da proteína C se liga à proteína C e a apresenta ao complexo trombina-trombomodulina. A proteína C ativada adquire propriedades antitrombóticas e pró-fibrinolíticas e participa de numerosas vias anti-inflamatórias e citoprotetoras restauradoras da homeostase [56].

Durante uma resposta inflamatória, muitos dos anticoagulantes naturais, incluindo a proteína C, são degradados ou têm a sua produção diminuída em conjunto com a infra-regulação do receptor endotelial da proteína C e da expressão da trombomodulina, o que diminui os efeitos anticoagulante e anti-inflamatório da via da proteína C. Células endoteliais lesionadas sofrem apoptose, o que amplifica posteriormente a cascata da coagulação pela provisão de uma superfície pró-coagulante [57]. Ativação continuada da

inflamação e da via de coagulação leva ao aumento da coagulação microvascular e subsequente disfunção celular endotelial. Em última análise, a função microvascular é comprometida, resultando em coagulação intravascular disseminada e trombose, diminuindo a perfusão tecidual local, disfunção do órgão ou falência [19].

Ativação dos leucócitos e liberação de suas citocinas requerem sinais de quimiocinas circulando na corrente sanguínea ou contato direto com o endotélio. Leucócitos rolantes podem ser ativados por agentes quimiotáticos, tais como C5a e fator ativador de plaqueta. Uma vez ativados, integrinas leucocitárias se conectam a ligantes do endotélio que promovem adesão firme, sendo a integrina ß2 a mais importante [58]. Estas interações com o endotélio são mediadas por moléculas de adesão endoteliais que são suprarreguladas durante situações de isquemia. A P-seletina nas plaquetas, mas não nas células endoteliais, foi a principal determinante na LRA isquêmica mediada por neutrófilo[59].

2.1.1.6 Leucócitos e inflamação

Inflamação e recrutamento de leucócitos durante lesão epitelial são agora reconhecidos como os maiores mediadores de todas as fases das lesões celulares tubular e endotelial. Inflamação precoce é caracterizada pela margeação de leucócitos ao endotélio vascular ativados via interações entre selectinas e ligantes que possibilitam adesão firme, seguida por transmigração para o interstício. Um número de potentes mediadores é gerado pela célula epitelial tubular proximal lesada, incluindo citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF, IL-6, IL-1ß, IL-8, quimiocina 2 do tipo C-C, fator ß transformador do crescimento e quimiocina 5 do tipo C-C[60]. TLR 2 é um importante mediador de lesão isquêmica endotelial, enquanto TLR 4 tem sido demonstrado em modelos animais tanto de lesão isquêmica quanto séptica possuir também um papel na lesão, especialmente nas células tubulares proximais [61].

Os neutrófilos são as primeiras células a se acumularem no sítio da lesão isquêmica[61], porém outros mediadores leucocitários são importantes como macrófagos, linfócitos B e linfócitos T[62]. Existem interações sinérgicas

entre diferentes tipos de leucócitos[63]. Expressão do C5a é suprarregulado significativamente nas células epiteliais tubulares proximais assim como nos macrófagos intersticiais e este é um poderoso quimiotático com propriedades pró-coagulantes[64]. As cascatas do complemento são ativadas durante a sepse e C5a apresentando-se elevadas em modelos de sepse em roedores. Bloqueio de C5a ou seu receptor poderia melhorar a sobrevivência na sepse[65,66].

Foi demonstrado que o C3a é pré-requisito para a produção de quimiocina CXC pelas células epiteliais e que o inibidor do sistema complemento localizado na membrana basolateral das células epiteliais (Crry) diminuiu após lesão isquêmica[67]. Queda de C3a e de caspase-3 utilizando interferência de RNA protege a função renal em um modelo de transplante [68]. Numerosas citocinas, se liberadas das células epiteliais ou endoteliais, trabalham em conjunto para aumentar a resposta inflamatória subsequente à lesão isquêmica ou séptica [69].

TLR 2 e TLR 4 são expressos de maneira constitutiva no epitélio renal e sua expressão aumenta após lesão isquemia-reperfusão renal[70]. Foi mostrado em um modelo de sepse em ratos de ligadura e perfuração cecal que a expressão de TLR 4 aumentou significativamente em todos os túbulos (proximal e distal), glomérulos e na vasculatura renal. Além do mais, este grupo demonstrou que sepse leva a um aumento dependente do TLR 4 na expressão do mediador pró-inflamatório COX-2[71]. Depleção genética tanto de TLR 2 quanto de TLR 4 protege contra LIR renal, portanto, indicando o papel proeminente dos TLR na LRA[61,72].

Os macrófagos produzem citocinas pró-inflamatórias que podem estimular a atividade de outros leucócitos[73]. Foi demonstrado que a depleção de macrófagos no rim e no baço usando clodronato lipossomal antes da LIR renal preveniu LRA, enquanto transferência adotiva de macrófagos reconstituiu a LRA. Células dendríticas parecem também ter um papel na LRA[74]. Demonstrou-se que após LRA, células dendríticas renais produzem as citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-6, quimiocina 2 do tipo C-C e quimiocina 5

do tipo C-C, e que depleção das células dendríticas antes da isquemia reduzia substancialmente os níveis de TNF produzidos pelo rim [19].

Células TREG também possuem um papel na LRA isquêmica[75]. Foi demonstrado em um modelo murino de LRA isquêmica que o tráfico de células TREG nos rins foi aumentado após 3 e 10 dias. Rins pós-isquêmicos tiveram um aumento de células T com TCR ß+CD4+ e TCR ß+CD8+, com aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias. Pesquisadores observaram que a depleção de células TREG utilizando anticorpo anti-CD25 1 dia após a lesão isquêmica aumentou a lesão tubular renal, reduziu a proliferação tubular, aumentou a produção de citocinas do infiltrado de células T aos 3 dias e geração de TNF pelas células T TCR ß+CD4+ aos 10 dias. Em outro estudo, infusão de células TREG CD4+ CD25+ 1 dia após lesão inicial reduziu a produção de interferon *γ* pelas células T TCR ß+CD4+ aos 3 dias, aumentou o reparo e reduziu a geração de citocinas aos 10 dias[76]. Células TREG infiltram rins reperfundidos durante o processo de cura, promovendo reparo, provavelmente por meio da modulação da produção de citocinas pró-inflamatórias de outros subconjuntos de células T. Depleção parcial de células TREG com um anticorpo monoclonal anti-CD25 potencializou o dano renal induzido pela lesão isquemia-reperfusão e resultou em mais neutrófilos, macrófagos e transcrição de citocinas inatas no rim [76]. Outro aspecto observado durante inflamação e lesão celular endotelial é o fenômeno de empilhamento de hemácias com formação de rolhas, causando obstrução e prolongando a redução do fluxo sanguíneo microvascular, exacerbando, assim, a lesão tubular[42].

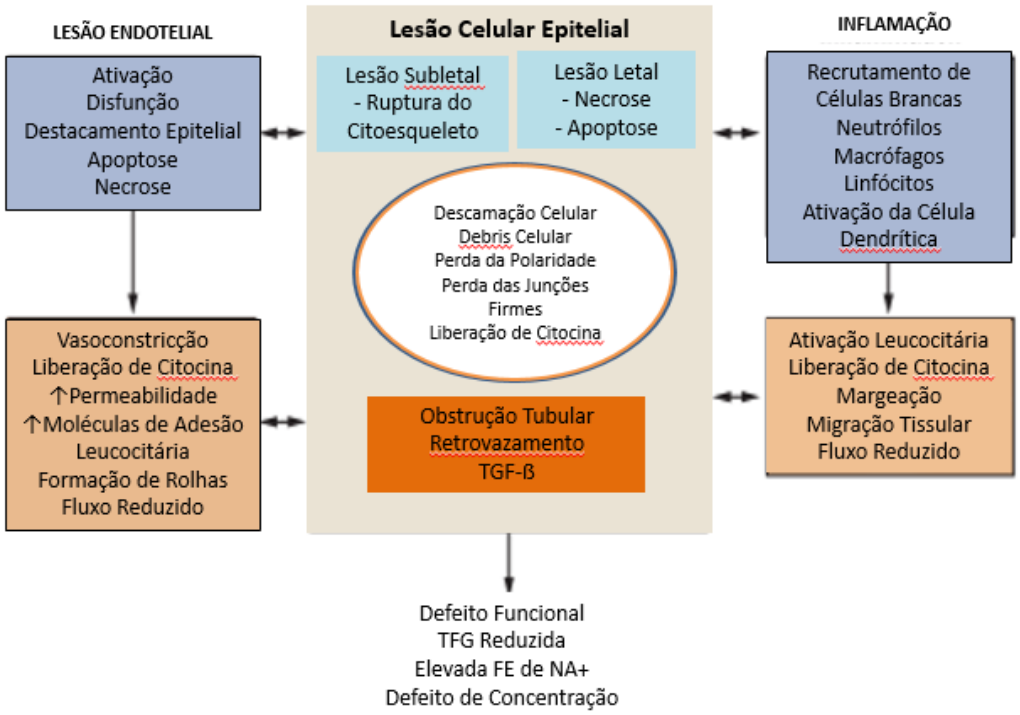


Figura 1 - Fisiopatologia da LRA isquêmica (Adaptado de Sharfuddin et al., 2011[5]).

As principais vias de diminuição da TFG na lesão tubular aguda isquêmica são provocadas pela depleção de ATP nas células tubulares e vasculares. Existem interações numerosas entre as células endoteliais, leucócitos e células epiteliais na fisiopatologia da LRA isquêmica. Estas interações são bidirecionais entre as células envolvidas e resulta em alterações estruturais e funcionais específicas. Os mediadores inflamatórios liberados das células tubulares proximais influenciam os processos celulares endoteliais (por exemplo, aumento da vasoconstricção e expressão de moléculas de adesão celular) que, por sua vez, influenciam as interações entre leucócitos e células endoteliais, levando à redução do fluxo microvascular e hipóxia ininterrupta dentro do ambiente local. Alterações funcionais adicionais ocorrem, tais como, uma acentuada redução na produção de eritropoietina e na 25-hidroxilação da vitamina D. Acumulação de eletrólitos pode levar rapidamente à necessidade de TSR. Acidose metabólica secundária à LRA deve ser cuidadosamente monitorizada.

2.2 Critérios AKIN e RIFLE

LRA é uma complicação séria e comum em pacientes criticamente enfermos. A taxa de mortalidade permanece alta apesar das TSR. Uma causa possível da alta taxa de mortalidade é que pacientes em UTI tendem a ser mais idosos e mais debilitados do que no passado. Os fatores fisiopatológicos associados à LRA também estão incriminados na falência de outros órgãos, indicando que LRA é habitualmente parte de uma síndrome de falência de múltiplos órgãos[77,78].

Antes do desenvolvimento do sistema de classificação RIFLE (acrônimo indicando risco de falência renal (Risk), lesão renal (Injury), falência da função renal (Failure), perda da função renal (Loss), e estágio final de lesão renal (End)), uma variação ampla de definições da LRA limitou investigações epidemiológicas de incidências e desenlaces em pacientes gravemente enfermos[79]. Esta diversidade de definições também gerou confusão clínica e comparações complicadas de dados entre os estudos[80,81].

A classificação RIFLE foi inicialmente proposta por iniciativa do grupo de qualidade em diálise aguda (ADQI, em inglês) para padronizar o estudo da falência renal aguda, em 2004[82]. Até a presente data, a classificação provou sua utilidade, não apenas em populações específicas [83,84], mas, também, para diagnóstico e classificação da gravidade da LRA em pacientes heterogêneos em enfermarias e UTI[24,85–87].

Recentemente, o grupo *Acute Kidney Injury Network* (AKIN), composto por nefrologistas e intensivistas, propôs modificações no critério RIFLE. No estágio 1 da AKIN (análogo ao RIFLE-Risco), uma pequena mudança dentro de 48 h na creatinina sérica maior do que 0,3 mg/dL (≥ 26,2 μmoL/L) foi sugerida como um limiar de LRA. Adicionalmente, pacientes recebendo TSR foram reclassificados como AKIN estágio 3 (RIFLE-Falência). Finalmente, as classificações perda (Loss) e doença renal em estágio final (End) não foram recepcionadas pelo sistema AKIN. A razão destas alterações foi aumentar a sensibilidade dos critérios RIFLE[88]. Os poucos estudos descritos comparando as duas medidas demonstraram pouca diferença entre elas[89,90] (Figura 2).

	TGF	Débito Urinário	
Risco	Aumento da Cr x 1,5 ou TFG diminuída > 25%	D.U. < 0,5 mL/kg/h x 6hs	Alta sensibilidade
Injúria	Aumento da Cr x 2 ou TFG diminuída > 50%	D.U. < 0,5 mL/kg/h x 12hs	
Insuficiência	Aumento da Cr x 3 ou TFG diminuída > 75% ou Cr > 4,0 mg/dL ou aumento súbito da Cr > 0,5 mg/dL	D.U. < 0,5 mL/kg/h x 24hs ou anúria x 12hs	
Perda	Insuficiência renal permanente = perda completa da função renal por > 4 semanas		Alta especificidade
Doença renal terminal	Doença renal terminal = perda completa da função renal por > 3 meses		

Figura 2 - Classificação RIFLE para LRA.

E	Creatinina Sérica	Débito Urinário
1	**Aumento na [Cr] ≥ 0,3 mg% ou aumento da [Cr] de base ≥ 150 a 200%**	**Menos de 0,5 ml/Kg/h por mais de 06 horas**
2	**Aumento na [Cr] de base ≥ 200 a 300%**	**Menos de 0,5 ml/Kg/h por mais de 12 horas**
3	**Aumento na [Cr] de base > 300% ou [Cr] ≥ 4,0 mg%**	**Menos de 0,5 ml/Kg/h por 24 horas ou anúria por 12 horas**

Figura 3 - Classificação de AKIN para LRA.

2.3 Anestésicos inalatórios e lesão por isquemia e reperfusão

Milhões de pacientes são expostos anualmente aos anestésicos inalatórios. Além dos seus efeitos anestésicos, estes agentes possuem significantes efeitos fisiológicos não anestésicos. Existem evidências recentes de que os anestésicos inalatórios protegem contra LIR no coração[91,92] e no pulmão[93,94]. Especificamente, tratamento com anestésicos voláteis antes da isquemia cardíaca protege contra a LIR[91,92]. Os mecanismos de proteção de órgãos pelos anestésicos inalatórios permanecem desconhecidos, contudo, vários estudos têm sugerido que os anestésicos voláteis protegem o coração pela ativação dos canais de potássio dependentes de ATP. Outros estudos

sugerem que os anestésicos inalatórios protegem contra LIR no coração[95,96] e nos pulmões[97] por meio dos efeitos anti-inflamatórios.

Lee et al. (2004)[98] concluíram que concentrações clínicas relevantes (1 CAM) de anestésicos inalatórios protegem, tanto durante quanto após isquemia renal, contra LIR em ratos em razão da redução dramática da necrose tubular tipicamente observada após LIR renal. Além disto, anestésicos inalatórios evidenciaram proteção diferencial na LIR renal, onde o desflurano foi menos efetivo e mostrou menores efeitos anti-inflamatórios comparados com isoflurano, sevoflurano ou halotano. Além do mais, dois mecanismos diferentes foram demonstrados neste estudo comparado com estudos prévios de proteção mediada por anestésico inalatório no coração. Os canais de potássio dependentes de ATP não estão envolvidos na proteção mediada por anestésico inalatório na isquemia-reperfusão renal[99] e os anestésicos inalatórios devem estar presentes durante a isquemia-reperfusão renal para conferir proteção em oposição ao benefício observado nos estudos cardíacos com apenas pré-tratamento com anestésico inalatório[100].

O fator-$_K$B nuclear (NF-κB) é um dos mais críticos fatores de transcrição envolvidos em muitas condições inflamatórias, incluindo LIR renal. Ativação do NF-κB é um passo crítico na resposta inflamatória renal e sistêmica, que leva à liberação de citocinas pró-inflamatórias incluindo o HMGB1[101], IL-1ß[102] e o TNF-α[103]. Tem sido observado que a via apoptótica p53-Bax-caspase-3 está envolvida na LIR renal[103,104]. P53 pode induzir a infrarregulação do Bcl-2 anti-apoptótico e a suprarregulação do Bax pró-apoptótico. Uma diminuição na relação Bcl-2/Bax dispara a liberação de citocromo c da mitocôndria que resulta na ativação da caspase-3 e reação em cadeia que leva à apoptose[105,106]. Portanto, inibindo os processos coexistentes de inflamação e apoptose, é oferecida uma abordagem potencial para a prevenção e o tratamento da LIR renal.

O isoflurano é um agente inalatório comumente utilizado em cenários cirúrgicos clínicos. Estudos prévios indicam que, associado aos seus efeitos anestésicos, ele protege o tecido contra LIR em vários órgãos incluindo o

coração[107], o fígado[108] e o cérebro[109]. Além do mais, possui um efeito farmacológico de pré-condicionamento contra LIR renal pela suprarregulação do fator-1α indutível por hipóxia e atenua a ativação da JNK e da ERK[110]. Não obstante, não se sabe se o pré-condicionamento do isoflurano protege contra LIR renal pela modulação da resposta inflamatória mediada pela NF-κB e/ou pela via apoptótica da p53-Bax-caspase-3[111].

2.4 Ciclosporina A

A formação e a abertura do PPTm no início da reperfusão miocárdica é o fator preponderante da disfunção mitocondrial e da morte celular do músculo cardíaco no cenário de LIR aguda[112]. Nos anos 80 foi descoberto que a abertura do PPTm poderia ser farmacologicamente inibida pelo agente imunossupressor CsA [113].

A CsA é um peptídeo cíclico lipofílico de 11 aminoácidos com peso molecular de 1202 KDa, sintetizado a partir do fungo *Tolypocladium inflatum*, que foi descoberto em 1970 como parte de um programa de rastreamento de antifúngicos iniciado em 1958. É um agente imunossupressor que atua inibindo seletivamente a proliferação de linfócitos T sem comprometer a proliferação celular somática[112]. No interior celular possui uma alta afinidade de ligação pelas ciclofilinas, proteínas que possuem atividade enzimática peptidil-prolil isomerase, essencial para o enovelamento de proteínas *in vivo*. A ligação da CsA à ciclofilina inibe a atividade da peptidil-prolil isomerase[114]. Existem vários tipos de ciclofilina, porém a ligação da CsA com a ciclofilina D é essencial para o seu efeito inibitório sobre o PPTm[112].

Fato interessante é que o efeito inibidor da CsA sobre a respiração mitocondrial observada nos estudos iniciais foram negligenciados na sua maioria, com maior atenção ao efeito inibitório da CsA sobre o PPTm, contudo, estudos recentes têm revisitado os potenciais efeitos deletérios da CsA sobre a função mitocondrial[112]. O mecanismo pelo qual a CsA inibe a abertura do PPTm foi descrito em estudo de 1990, que referiu que a CsA exerce esta ação

pela sua ligação com a ciclofilina D, uma isomerase *cis-trans* peptidil-prolil na mitocôndria[115].

No estudo de Halestrap e Davidson, 1990, foi proposto que a ligação da CsA à ciclofilina D a impedia de se associar ao poro componente do PPTm na membrana interna e, assim, induzir mudança conformacional nesse componente, que se acreditava, na época, ser a adenina nucleotídeo translocase[115,116]. Um estudo subseqüente, de 1996, confirmou que o alvo farmacológico da CsA é a proteína ciclofilina D mitocondrial humana de 21 kDa[117].

Em 1986, Crompton et al. foram os primeiros a propor que o PPTm seria um mediador da morte celular no cenário de lesão isquemia-reperfusão aguda. Nestes estudos iniciais, o grupo de Crompton descreveu a abertura do PPTm em uma mitocôndria isolada de coração de rato em resposta ao cálcio (≥1μM), fosfato (≥10Mm), estresse oxidativo e baixos níveis de ATP (≤1mM), condições presentes na LIR aguda. A descoberta pelo mesmo grupo em 1988 de que a CsA era um potente inibidor do PPTm, portanto, forneceu a ferramenta investigativa necessária para testar esta proposição[113,118–120].

Em 2002, Hausenloy et al. foram os primeiros a demonstrar que a administração de CsA por meio da perfusão de corações isolados de ratos no início da reperfusão poderia limitar o tamanho do infarto miocárdico, confirmando que a abertura do PPTm ocorria primariamente no início da reperfusão miocárdica. De importância crucial, o fato de que um inibidor da calcineurina, tacrolimus, não exercia essa mesma ação quando administrada no início da reperfusão miocárdica, sugerindo que a inibição do PPTm, e não a inibição da calcineurina, era o provável mecanismo cardioprotetor[121]. Além disso, em um estudo subsequente de 2003, Hausenloy et al. observaram que o fármaco sangliferina A (SfA), que inibe a ciclofilina D mitocondrial sem afetar a atividade da calcineurina, também foi citada como cardioprotetora quando administrada no início da reperfusão miocárdica, porém não apresentava efeitos protetores quando administrada após 15 minutos da reperfusão,

evidenciando a importância da intervenção nos primeiros minutos da reperfusão no intuito de prevenir a abertura do PPTm[122].

Estudos experimentais usando modelos animais *ex vivo* e *in vivo* (murino, rato e coelho) de LIR confirmaram posteriormente os efeitos de diminuição do tamanho do infarto do miocárdio da CsA quando administrado no momento da reperfusão miocárdica. Observação curiosa é a de que a estreita margem terapêutica da CsA observada nos estudos *ex vivo* não foi um fator importante nos estudos *in vivo*, com doses benéficas de CsA observadas dentro de uma faixa de 1,0 a 10,0 mg/kg[112]. Estudos recentes utilizando um modelo animal porcino de LIR produziram resultados conflitantes, a razão para estes achados discordantes não é conhecida mas pode se relacionar a variações no desenho do modelo de LIR e na dose utilizada de CsA[123,124].

Tem sido relatado que a CsA protege outros órgãos contra a lesão isquemia-reperfusão aguda, tais como fígado, cérebro, rim e outros[112]. Em 2001, Yang et al., primeiro revelaram que uma dose única em *bolus* de CsA (3,0 mg/kg) protegia o rim contra lesão isquemia-reperfusão letal aguda, um efeito que foi atribuído à ativação da proteína de choque térmico 70[125].

Portanto, a proposta deste estudo decorreu do fato de que na literatura ainda não estão totalmente elucidados o efeito protetor e a dose de ciclosporina.

HIPÓTESE DO ESTUDO

A ciclosporina A, na dose de 15 mg/kg de peso, administrada 24 horas e imediatamente antes da isquemia e reperfusão causa proteção renal.

3 OBJETIVO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos da ciclosporina A na lesão isquemia-reperfusão renal em ratos, por meio dos critérios de RIFLE e histologia renal.

4 MATERIAIS E MÉTODO

Trata-se de um estudo experimental conduzido de março a junho de 2013, no Laboratório de Anestesiologia da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu (nº 1034-2013, alterado pelo ofício CEUA nº 24/2015). Foram incluídos no estudo 30 ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*), machos, com peso maior ou igual a 300g, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu, UNESP.

4.1 Grupos de Estudo

Grupo sham (GS): laparotomia e nefrectomia direita.

Grupo controle (GC): laparotomia e nefrectomia direita, além de manobra de isquemia-reperfusão no rim esquerdo.

Grupo ciclosporina (GCsA): além de laparotomia, nefrectomia direita e manobra de isquemia-reperfusão no rim esquerdo, foi administrada ciclosporina por via intraperitoneal (IP) 24 horas antes e no início do procedimento cirúrgico.

Todos os animais dos três grupos foram submetidos, em ventilação espontânea, à indução anestésica com isoflurano na concentração de 3 a 4 vol% (volumes por cento) e manutenção anestésica com isoflurano na concentração inspirada entre 1,5 a 3,0 vol%.

4.2 Tempos Estudados

Os atributos PAS, PAD, PAM e T foram estudados nos tempos: T0 – após a cateterização da artéria carótida esquerda; T1 – após o pinçamento da artéria renal esquerda nos grupos com isquemia (C e CsA) e após ter passado intervalo de tempo semelhante no grupo sem isquemia (S); T2 - 30 minutos após a liberação do pinçamento da artéria renal esquerda nos grupos com

isquemia (C e CsA).

A concentração plasmática de ureia, creatinina e sódio foi estudada nos momentos: M0 - após a cateterização da artéria carótida esquerda, coincidindo com T0; M1 - 30 minutos após a liberação do pinçamento da artéria renal esquerda nos grupos com isquemia (C e CsA) e após ter passado intervalo de tempo semelhante no grupo sem isquemia (S), coincidindo com T2; M2 - 12 horas após o término da cirurgia inicial. A histologia foi realizada no rim direito que foi retirado no começo da cirurgia inicial e no rim esquerdo que foi retirado 12 horas após o término da cirurgia inicial.

4.3 Atributos Estudados

Foram estudados, em cada um dos animais dos três grupos de estudo, os seguintes atributos:

- Peso;
- Pressão arterial média (PAM);
- Pressão arterial sistólica (PAS);
- Pressão arterial diastólica (PAD);
- Temperatura retal;
- Dosagem plasmática de sódio, ureia e creatinina;
- Critérios de RIFLE;
- Exame histológico dos rins direito e esquerdo.

4.4 Metodologia Laboratorial

Para as dosagens de ureia e creatinina foram utilizados reagentes da marca EBRAM e o equipamento para análise foi o COBAS MIRA PLUS.

4.5 Manobra de Isquemia e Reperfusão

Após identificação e dissecção da artéria renal esquerda, procedeu-se a interrupção do seu fluxo com pinça atraumática tipo *bulldog*, mantendo-se um

período de isquemia de 30 minutos. A seguir, a artéria renal esquerda foi liberada por um período de resguardo posterior de 30 minutos, findo o qual, foram registrados os dados hemodinâmicos e de temperatura e coletado 1,0 ml de sangue carotídeo para dosagem de creatinina, ureia e sódio, com ulterior fechamento da cavidade abdominal.

4.6 Sequência Experimental

Os animais foram acondicionados em ambiente controlado de temperatura, umidade, ruídos e ciclo sono-vigília dentro de gaiolas metabólicas com livre acesso a água e alimentos por um período de 24 horas antes do procedimento cirúrgico inicial (Figura 4).



Figura 4 – Animais acondicionados em gaiolas metabólicas.

O grupo da ciclosporina fez uso desta droga por via IP na dose de 15,0 mg/kg no início deste período e na mesma dose antes da cirurgia. A ciclosporina foi fornecida em solução estéril a 2%, manipulada pela Citopharma “Manipulações Parenterais”, localizada no estado de Minas Gerais, e diluída em água destilada para um volume total de 1,0 ml.

Após o período de 24 horas, com livre acesso a alimentos e água, os animais foram pesados imediatamente antes do início do procedimento cirúrgico e anestesiados dentro de uma campânula em ambiente com concentração de oxigênio de 40% e de isoflurano de 3 a 4 vol% (Figura 5).



Figura 5 – Anestesia dos animais.

Após a indução anestésica os animais foram mantidos com o mesmo anestésico na concentração inspirada de 1,5 a 3 vol%, em ventilação espontânea, com máscara ajustada à boca e ao focinho adaptada a um dispositivo eficaz de administração anestésica, avalvular e sem absorvedor de gás carbônico (CO_2) (Figura 6).



Figura 6 – Manutenção do animal após a indução anestésica.

Após adormecer e permanecer em plano anestésico, os animais foram colocados em uma plataforma sob bolsas aquecidas para manutenção da temperatura retal entre 37°C e 39ºC e monitorizados quanto a temperatura, pressões arteriais media, sistólica e diastólica através de sensores conectados a um monitor *Datex-Ohmeda modelo AS3 (Engstron – Finlândia)* (Figura 7). Nos animais do grupo da ciclosporina, esta foi administrada por via intraperitoneal na dose de 15 mg/kg de peso.



Figura 7 – Plataforma de aquecimento dos animais após permanecerem em plano anestésico.

Após as incisões cervicais foram dissecadas a veia jugular interna direita para infusão de solução salina (Ringer lactato) utilizando a bomba de infusão *(ANNE® - Abbott Laboratories, EUA)* e a artéria carótida esquerda para monitorização cardiovascular e coleta de amostras sanguíneas. Ambos os vasos foram cateterizados com cânula de teflon 24 GA (Figura 8). A solução salina foi administrada logo após a disseção venosa na velocidade de infusão de 3 $ml.h^{-1}$. Após a dissecção arterial foi colhido 1,0 ml de sangue para dosagem de creatinina, ureia e sódio e administrado 3,0 ml de solução salina em *bolus* para manutenção da estabilidade hemodinâmica.



Figura 8 – Incisões para dissecção dos vasos cervicais.

Realizada laparotomia por incisão linear vertical mediana (Figura 9). Após identificação do pedículo vascular do rim direito foi procedida nefrectomia (Figura 10). Identificada artéria renal esquerda e, após a sua dissecção, realizado pinçamento com *bulldog* por um período de 30 minutos (Figura 11). Em seguida, o pinçamento foi liberado e aguardado mais 30 minutos para coleta de 1,0 ml de sangue da carótida esquerda seguida da infusão de 3,0 ml de solução salina em *bolus*. A parede abdominal foi fechada com infiltração das bordas da ferida cirúrgica com bupivacaína a 0,125% sem vasoconstrictor com objetivo de analgesia pós-operatória. Retirada dos cateteres venoso e arterial. Fechamento das incisões cervicais. Interrupção da administração do anestésico isoflurano e monitorização clínica do animal até a sua recuperação.



Figura 9 - Laparotomia por incisão linear vertical mediana.



Figura 10 – Nefrectomia direita.



Figura 11 – Nefrectomia esquerda.

Após a recuperação anestésico-cirúrgica o animal foi mantido em gaiola metabólica nas mesmas condições iniciais do experimento por um período de 12 horas. Ao término deste intervalo, os animais foram anestesiados nas mesmas condições anteriormente descritas, procedida nova laparotomia para realização de nefrectomia esquerda e coletado 1,5 ml de sangue intracardíaco para dosagem de creatinina, ureia e sódio quando, então, o animal foi sacrificado pela administração intracardíaca de bupivacaína a 0,5% sem vasoconstrictor na dose de 3,0 mg/kg.

4.7 Modelo Experimental de Isquemia Reperfusão

O modelo experimental de isquemia-reperfusão renal em ratos *wistar* machos, com uninefrectomia contralateral ao rim submetido à agressão isquêmica, sob anestesia inalatória e controle hemodinâmico, ventilatório e de temperatura, já é consolidado para o estudo da proteção renal na unidade de pesquisa experimental da UNESP com mais de 1.000 animais utilizados.

A uninefrectomia contralateral ao rim submetido à agressão isquêmica é realizada com o objetivo de permitir recuperação mais rápida do comprometimento funcional do órgão, menor lesão isquêmica e menor produção de fatores humorais responsáveis pela reparação compensatória do

rim agredido[126]. Na ausência deste procedimento, o rim que experimenta o estresse isquêmico enfrenta maior dificuldade em virtude da ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona pelo rim não agredido[127].

Os animais machos são preferidos em razão de sua maior sensibilidade à agressão isquêmica[128].

4.8 Estudo Histológico

Os rins dos animais foram retirados e colocados em solução de Duboscq-Brasil separadamente em dois frascos e identificados como rins direito e esquerdo durante 24 horas, sendo, a seguir, armazenados em álcool a 80%, 150 mL; ácido pícrico, 2,4 g; formalina 40%, 60 mL; ácido acético glacial, 12,5 mL para posterior avaliação histológica.

A solução de Duboscq-Brasil foi utilizada para preservar e fixar as microestruturas renais. O corante utilizado para o estudo histológico foi a hematoxilina-eosina e os cortes foram analisados sob aumentos padrões na microscopia ótica (de 50 a 400x). Após o preparo das lâminas dos rins, com fixação em parafina, essas foram avaliadas quanto à porcentagem de necrose tubular e classificadas de acordo com escore descrito por Park et al., 2008[128].

Tabela 1 - Escores dos graus de lesão utilizados na avaliação histológica

GRAU	TIPO	% DE LESÃO
0	Sem Lesão	
1	Leve	< 10% necrose tubular
2	Moderado	10 a 25% necrose tubular
3	Moderado a Grave	25 a 50% necrose tubular
4	Grave	50 a 75% necrose tubular
5	Muito Grave	> 75% necrose tubular

Adaptada de Park et al., 2008

4.9 Análise Estatística

Para o cálculo amostral foi utilizado esquema proposto por Scheibe (2008)[129] para estudos experimentais que estabeleceu o número de 7 animais por grupo considerando antecipadamente uma diferença percentual das médias entre os grupos testados e controle de 30 e uma percentagem do coeficiente de variação devido à variabilidade biológica de 20, fornecendo um p menor do que 0,05 e um poder estatístico de, pelo menos, 80%[129].

Análises descritivas sobre peso, pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial media, temperatura, sódio, creatinina, ureia, RIFLE e análise histológica foram realizadas. Para as variáveis quantitativas foi realizada a análise de normalidade ou homocedasticidade através da avaliação do histograma, comparação da média e mediana, valor de *Skewness e Kurtosis*, comparação entre media e desvio padrão e teste de hipótese que neste caso foi o Kolgomorov-Smirnov. Para estatística inferencial foi usado o ANOVA com post hoc de Bonferroni para comparação dos valores de creatinina entre os grupos. Para análise pareada das medidas de creatinina ao longo do tempo foi utilizado o ANOVA de medidas repetidas. Foram considerados significantes valores de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

A amostra foi composta por 30 ratos, distribuídos igual e aleatoriamente em três grupos, o grupo Sham (GS), o grupo Controle (GC) e o grupo Ciclosporina (GCsA).

5.1 Peso (g)

Tabela 2 - Comparação das medidas de peso entre os grupos estudados

Grupos	Média + DP	p valor
GS (n=10)	387±18,88*	0,002
GC (n=10)	458±50,50*∞	
GCsA (n=10)	405±46,72∞	

ANOVA com post hoc de Bonferroni. (*) e (∞) indicam a diferença p ≤ 0,05.

Comentários: na análise não pareada do peso houve diferença estatisticamente significante entre os grupos sham e controle e entre os grupos controle e ciclosporina.

5.2 Pressão Arterial Média (PAM)

Tabela 3 - Comparação das medidas de pressão arterial média (mmHg) entre os grupos estudados

Grupos	T0	T1	T2
	média + DP	média + DP	média + DP
GS (n=10)	98,5±13,69*	75±10,80*	83±12,29*
GC (n=10)	112±9,47*∞	72±12,99	77±11,45
GCsA (n=10)	96±9,51∞	61±10,04*	66±15,60*
p valor	0,007	0,035	0,020

ANOVA com *post hoc* de Bonferroni. (*) e (∞) indicam a diferença p ≤ 0,05.

Comentários: na análise não pareada houve diferença estatisticamente significante entre GS e GC e GC e GCsA para T0, e entre GS e GCsA para T1 e T2.

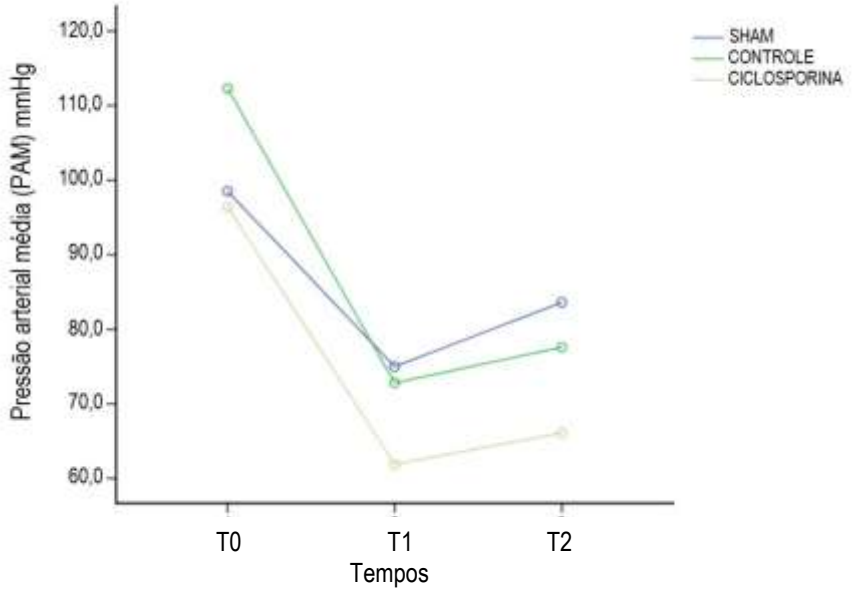


Figura 12 - Medida de pressão arterial média nos tempos e grupos estudados (p ≤ 0,05).

Houve diferença entre T0 e T1 (p=0,003) e entre a T1 e T2 (p=0,02) para GS, para GC entre T0 e T1 (p=0,0001) e entre T0 e T2 (p=0,0001); e para o GCsA entre T0 e T1 e entre T0 e T2 (p=0,004).

5.3 Pressão Arterial Sistólica (PAS)

Tabela 4 - Comparação das medidas de pressão arterial sistólica (mmHg) entre os grupos estudados

Grupos	T0	T1	T2
	média + DP	média + DP	média + DP
GS (n=10)	119±16,14	95±8,23	103±9,53
GC (n=10)	133±10,44	96±13,08	104±15,26
GCsA (n=10)	122±10,64	86±8,37	90±11,36
p valor	0,061	0,082	0,390

ANOVA com post hoc de Bonferroni. (*) e (∞) indicam a diferença p ≤ 0,05.

Comentários: a análise não pareada nos três tempos não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

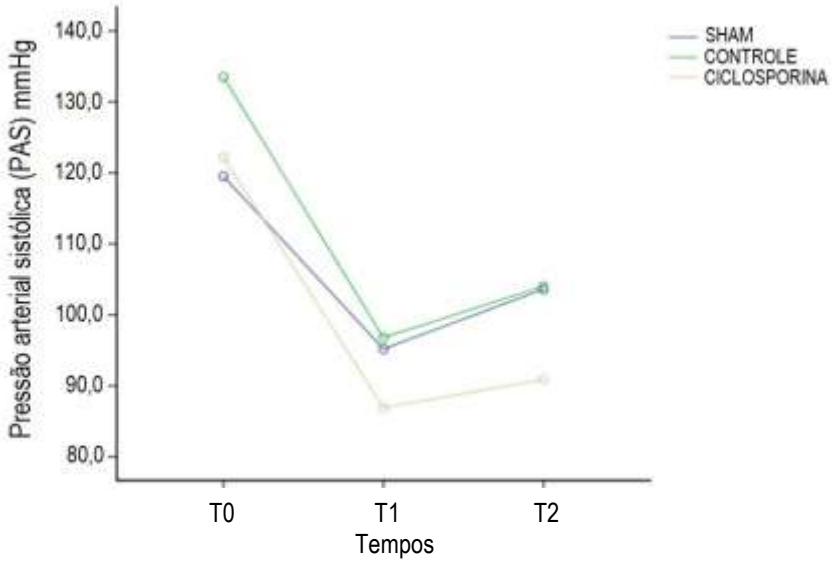


Figura 13 - Medidas de pressão arterial sistólica nos tempos e grupos estudados.

Na análise pareada para o GS houve diferença entre T0 e T1 (p=0,001) e entre T1 e T2. Para GC houve diferença entre T0 e T1 (p=0,001) e entre T0 e T2 (p = 0,002), assim como para GCsA, entre T0 e T1 (p = 0,0001) e T0 e T2 (p = 0,002).

5.4 Pressão Arterial Diastólica (PAD)

Tabela 5 - Comparação das medidas de pressão arterial diastólica (mmHg) entre os grupos estudados

Grupos	T0	T1	T2
	média + DP	média + DP	média + DP
GS (n=10)	88±13,24*	64±12,91*	83±9,25*
GC (n=10)	102±9,15*∞	60±13,81	49±12,30
GCsA (n=10)	73±14,12∞	64±11,53*	53±18,43*
p valor	0,001	0,040	0,023

ANOVA com post hoc de Bonferroni. (*) e (∞) indicam a diferença p ≤ 0,05.

Comentários: as análises não pareadas mostraram diferenças estatisticamente significantes em T0 entre GS e GC e entre GC e GCsA. Em T1 houve diferença estatisticamente significante entre GS e GCsA, assim como para T2.

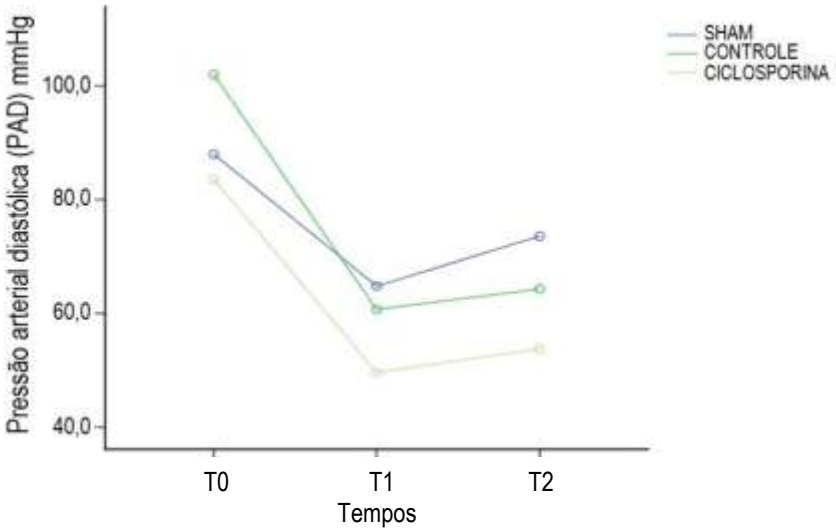


Figura 14 - Medidas de pressão arterial diastólica nos tempos e grupos estudados (p ≤ 0,05).

A avaliação pareada mostrou para GS diferença entre T0 e T1 (p = 0,005) e entre T1 e T2 (p = 0,025), para GC entre a T0 e T1 (p = 0,0001) e T1 e T2 (p = 0,0001). No GCsA entre T0 e T1 (p = 0,0001) e T0 e T2 (p = 0,0001).

5.5 Temperatura Retal (T)

Tabela 6 - Comparação das medidas de temperatura (ºC) entre os grupos estudados

Grupos	T0	T1	T2
	média + DP	média + DP	média + DP
GS (n=10)	36,98±0,6	37,6±0,5	37,54±0,81
GC (n=10)	37,14±0,5	37,98±0,8	37,71±0,6
GCsA (n=10)	37,43±0,7	38,22±0,4	37,67±0,6
p valor	0,347	0,205	0,837

ANOVA com post hoc de Bonferroni. (*) e (∞) indicam a diferença p ≤ 0,05.

Comentários: a análise não pareada nos três tempos não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

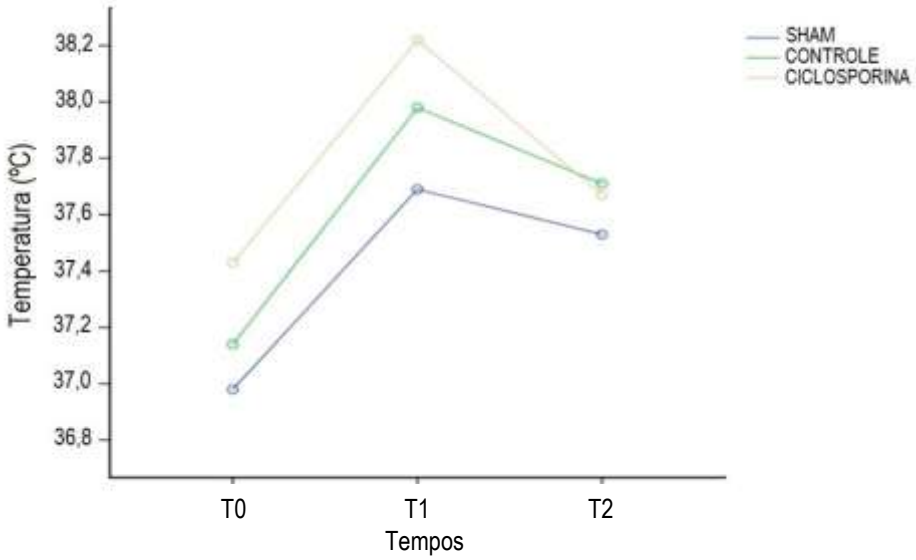


Figura 15 - Análise pareada das medidas de temperatura nos tempos e grupos estudados.

As avaliações da temperatura não mostraram diferença significativa em GS (p = 0,092). Para GC houve diferença entre os valores em T0 e T1 (p = 0,001) e entre T0 e T2 (p = 0,006) e para GCsA apenas entre T0 e T1 (p = 0,032).

5.6 Creatinina Sérica

Tabela 7 - Comparação das medidas de creatinina sérica (mg/dL) entre os grupos estudados

Grupos	M0 (T0)	M1 (T2)	M2
	média + DP	média + DP	média + DP
GS (n=10)	0,35±0,05	0,47±0,06*∞	0,62±0,06*∞
GC (n=10)	0,35±0,07	0,8±0,18*	3,8±1,20*
GCsA (n=10)	0,41±0,05	0,87±0,08∞	4,17±1,25∞
p valor	0,06	0,0001	0,0001

ANOVA com post hoc de Bonferroni. (*) e (∞) indicam a diferença p ≤ 0,05.

Comentários: as análises não pareadas não mostraram diferenças estatisticamente significantes em M0. Diferenças estatisticamente significantes foram encontradas entre GS e GC e entre GS e GCsA para M1 e M2, respectivamente.

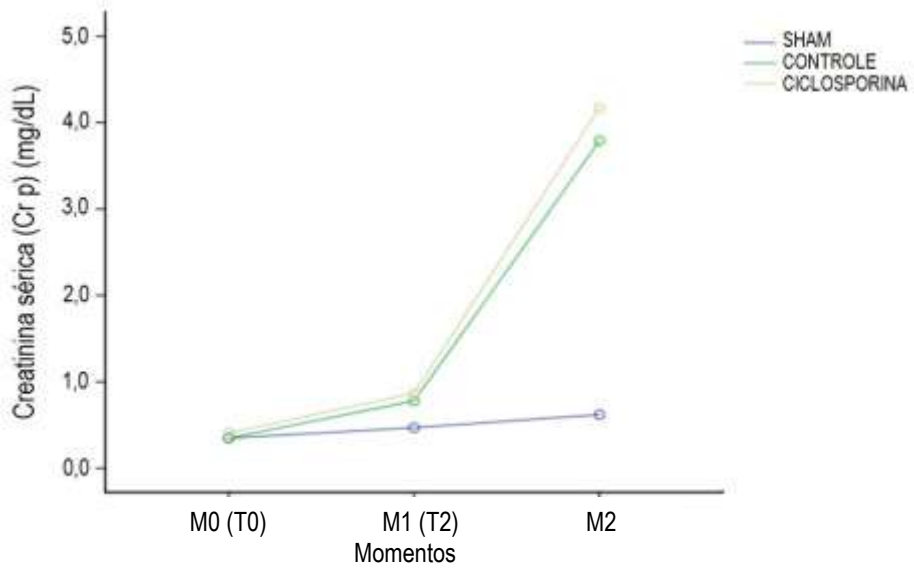


Figura 16 - Análise pareada da creatinina sérica nos momentos e grupos estudados.

Na análise pareada houve diferença estatisticamente significante dentro de cada grupo em todos os tempos (p = 0,0001).

5.7 Ureia Sérica

Tabela 8 - Comparação das medidas de ureia sérica (mg/dL) entre os grupos estudados

Grupos	M0 (T0)	M1 (T2)	M2
	média + DP	média + DP	média + DP
GS (n=10)	44,4±4,52	47,40±4,55	43,60±7,39*∞
GC (n=10)	40,1±4,7	48,4±5,3	184,5±49,8*
GCsA (n=10)	40,9±3,98	52,2±4,89	187,7±22,93∞
p valor	0,89	0,90	0,0001

ANOVA com post hoc de Bonferroni. (*) e (∞) indicam a diferença p ≤ 0,05.

Comentários: na análise não pareada houve diferenças entre GS e GC e entre GS e GCsA para M2.

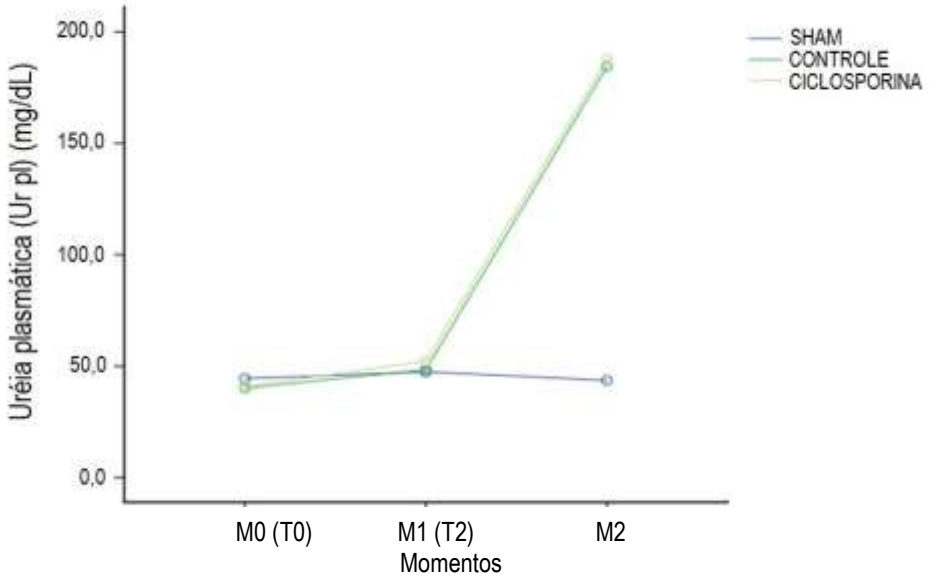


Figura 17 - Análise pareada da uréia sérica nos momentos e grupos estudados.

A ureia sérica foi diferente ao longo de todos os tempos para GC e GCsA (ambos p=0,0001), mas não para GS que foi diferente, apenas, entre M0 e M1 (p=0,003).

5.8 Sódio Sérico

Tabela 9 - Comparação das medidas de sódio sérico (mEq/L) entre os grupos estudados

Grupos	M0 (T0)	M1 (T2)	M2
	média + DP	média + DP	média + DP
GS (n=10)	140,2±2,7	141,3±1,8	137,5±8,8
GC (n=10)	140,6±1,9	141,9±2,6	139,6±2,2
GCsA (n=10)	140,5±1,64	139,9±1,85	138,2±6,1
p valor	0,911	0,124	0,753

ANOVA com post hoc de Bonferroni. (*) e (∞) indicam a diferença p ≤ 0,05.

Comentários: as análises não pareadas não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nos tempos estudados.

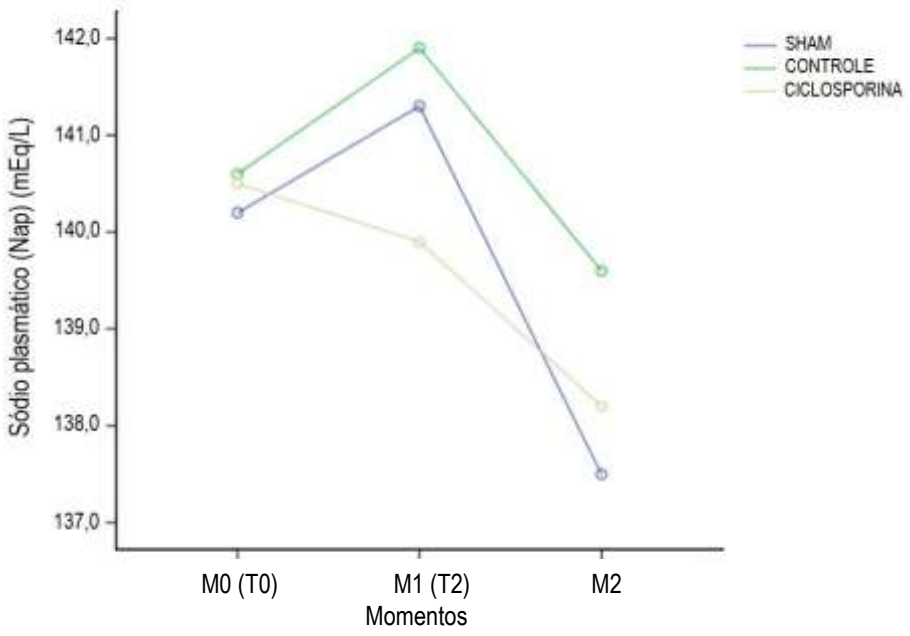


Figura 18 - Análise pareada das medidas de sódio nos momentos e grupos estudados.

A análise pareada não mostrou diferença significativa dos seus valores dentro de cada grupo ao longo dos três tempos, GS (p = 0,291), GC (p = 0,064) e GCsA (p = 0,367).

5.9 Rifle e Histologia

As avaliações descritivas do RIFLE mostraram que tanto GC como GCsA apresentaram resultados negativos, comportamento distinto ao descrito na avaliação histológica (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10 - Avaliação descritiva da função renal dos ratos (RIFLE).

Critério de RIFLE	Grupos		
	GS (n=10)	GC (n=10)	GCsA (n=10)
Sem Risco	-	1(10%)	-
Risco	6(60%)	-	-
Lesão	4(40%)	-	-
Falência	-	9(90%)	10(100%)
Perda Renal	-	-	-
Estágio	-	-	-

Tabela 11 – Avaliação descritiva da função renal dos ratos (Histologia)

Histologia	Grupos		
	GS (n=10)	GC (n=10)	GCsA (n=10)
Rim direito			
Sem Lesão	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
Rim esquerdo			
Sem Lesão	8(88,9%)	-	-
Leve	1(11,1%)	1(10%)	-
Moderado	-	-	-
Moderado/Grave	-	-	4(40%)
Grave	-	-	1(10%)
Muito Grave	-	9(90%)	5(50%)

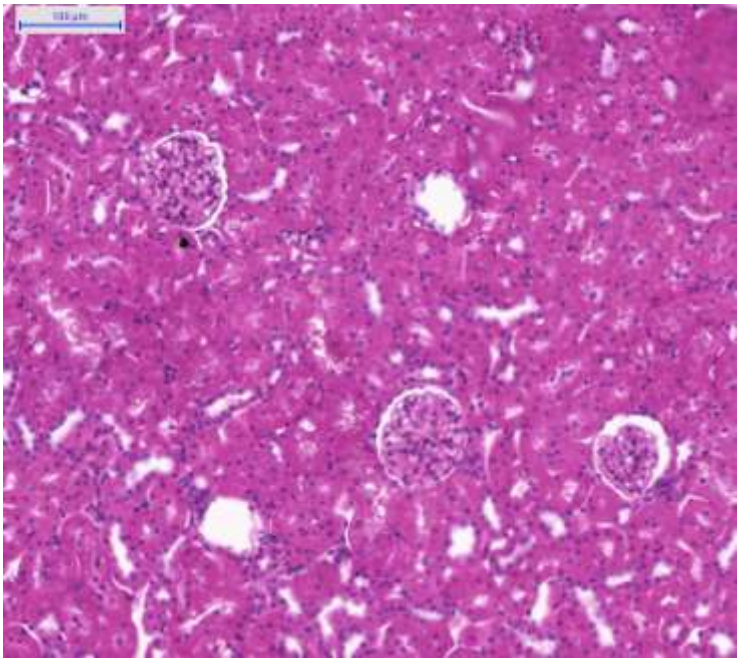


Figura 19 – Rim Esquerdo do Grupo Sham. Grau 0 de Park Parênquima renal normal, com os corpúsculos de Malpighi e os túbulos renais sem alterações (HE 200x).

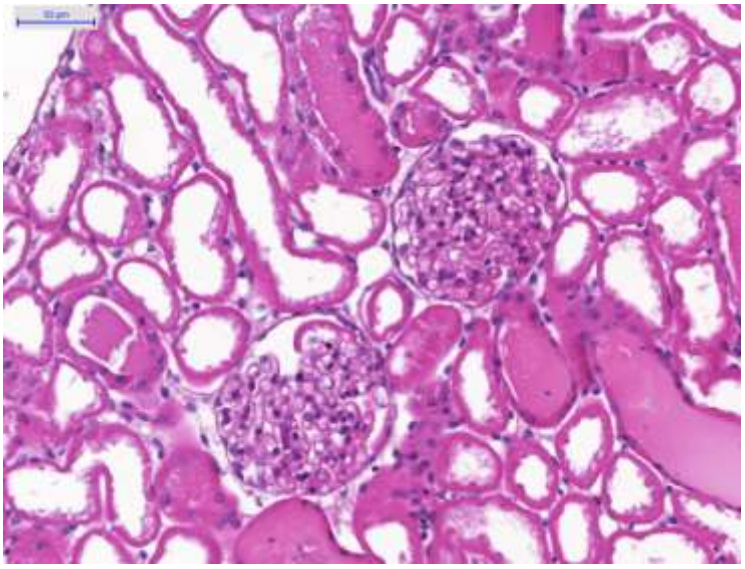


Figura 20 – Rim Esquerdo do grupo Ciclosporina A. Grau 4 de Park. Parênquima renal com necrose tubular, representada por morte celular (cariólise, cariorrexis e picnose), presença de material hialino e de “debris” celular na luz tubular (HE 400x).

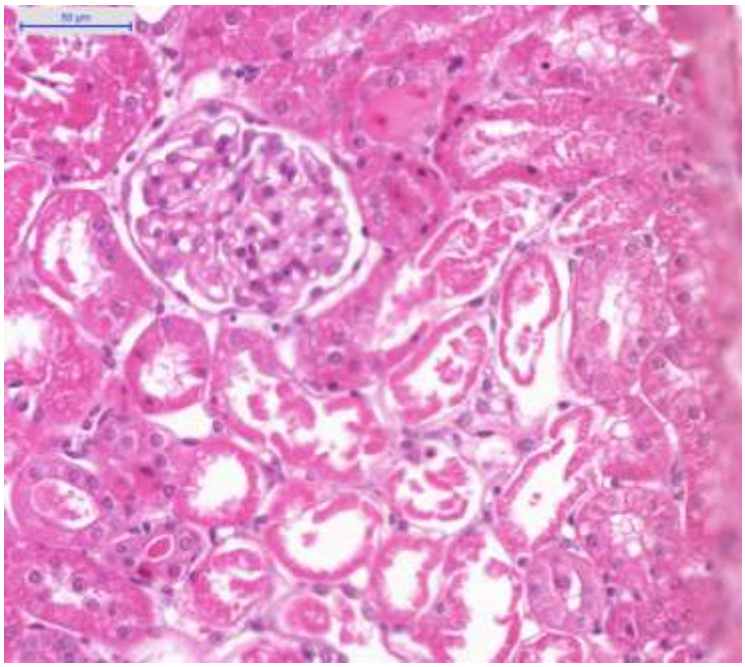


Figura 21 – Rim Esquerdo do grupo Controle. Grau 5 de Park. Parênquima renal com necrose tubular, evidenciando degeneração hidrópica da membrana epitelial apical, além das alterações descritas na lâmina anterior (He 400x).

6 DISCUSSÃO

Os animais do presente estudo apresentaram peso superior a 450 gramas e, apesar das diferenças estatisticamente significantes entre os grupos sham e controle e controle e ciclosporina, não se pode reputar a este parâmetro capacidade para interferir nos resultados das outras variáveis estudadas, tendo em vista o fato de todos eles pertencerem a uma mesma linhagem e possuírem o mesmo grau de maturidade, assim como serem submetidos à reposição volêmica e uso de fármacos com lastro ponderal individual. Além disso a distribuição entre os grupos foi por sorteio, aleatoriamente.

Foi realizada nefrectomia direita para que não houvesse interferência do rim contralateral, sendo a isquemia temporária renal executada com pinçamento vascular atraumático.

Vários autores já relataram atenuação da doença e facilitação da recuperação com a realização da nefrectomia prévia contralateral[126].

A insuficiência renal aguda oligúrica, que é de pior prognóstico, foi demonstrada em ratos submetidos a pinçamento da artéria renal esquerda sem a realização prévia de nefrectomia contralateral. Nesta mesma pesquisa, nos ratos nos quais houve a realização de nefrectomia contralateral previamente, a insuficiência renal que se instalou foi da forma poliúrica, além desses animais terem apresentado menor dano celular tubular e maior depuração de inulina[126].

A produção de fatores humorais, que estimulam o crescimento das células renais, aumenta, seguindo a nefrectomia prévia e acelera o reparo das mesmas. A atividade da renina plasmática e o conteúdo da renina no rim pós-isquêmico aumentam significativamente em ratos não nefrectomizados.

Os fatores responsáveis pela vasoconstrição renal (tromboxane A2, endotelina etc) parecem estar em maior concentração nos ratos não nefrectomizados[126].

Entretanto, Islam et al.[138] não observaram diferenças entre os rins pré-condicionados por isquemia e os que não foram submetidos a esta técnica nos animais que não sofreram nefrectomia unilateral.

De qualquer forma, a nefrectomia prévia foi realizada para que não houvesse interferência com a avaliação do rim esquerdo, que foi submetido à isquemia.

O tempo de isquemia renal é uma variável de fundamental importância na determinação da deterioração da função do órgão, guardando uma relação direta de proporcionalidade com este desfecho. Em um estudo de isquemia renal normotérmica em seres humanos com rim único submetidos à nefrectomia parcial por lesão tumoral evidenciou-se tempo de corte de 25 minutos para os sujeitos evoluírem com LRA ou estágio IV de doença renal crônica[130].

Outro estudo, experimental, concluiu que o ponto de corte para o tempo de isquemia normotérmica capaz de produzir maior elevação de biomarcadores de lesão renal foi o de 30 minutos[131].

Por estes motivos, este estudo arbitrou como período de isquemia capaz de produzir lesões renais expressivas sem, contanto, conduzir o órgão à necrose maciça, o tempo de 30 minutos, deste modo, evitando a impossibilidade de avaliação da intervenção proposta.

Dentre os parâmetros fisiológicos avaliados, a temperatura, sem dúvida, exerce uma influência capital sobre o processo lesional precipitado pela isquemia renal, com hipotermia oferecendo proteção e hipertermia favorecendo a lesão[132].

Na ausência de isquemia renal a hipertermia não tem efeito adverso sobre a função e morfologia renais ou sobre os estoques renais de fosfato de alta energia, mas quando há instalação da mesma isto não acontece segundo Zager e Altschuld, em 1986[132].

Estes mesmos autores trabalharam com ratos em normo, hipo e hipertermia, submetidos à isquemia renal total de 25-40 minutos. Com 25

minutos de isquemia, a lesão isquêmica nos ratos normotérmicos desapareceu após 24-48 horas da interrupção do fluxo sanguíneo. Em ratos hipertérmicos (temperatura maior que 38^{o}C) 25 minutos de isquemia causaram lesão renal intensa e nos hipotérmicos (32-35ºC) a lesão foi branda e de rápida recuperação[132].

Durante o experimento vários fatores podem alterar a temperatura. As soluções administradas são frias, abertura de cavidade, respiração com ventilação controlada sem reinalação e sem aquecimento do ar promovem perda rápida de calor. A manutenção da temperatura foi realizada com a colocação de mantas térmicas sob e sobre os animais e controlou-se a temperatura retal.

A ausência de alterações histológicas, no grupo GS (Sham) comprovou que a temperatura não interferiu com os resultados encontrados no experimento.

No presente estudo a temperatura se manteve dentro da faixa proposta, não havendo diferença estatisticamente significante entre os três grupos nos três tempos avaliados, não representando, assim, um fator de confusão na avaliação da relação entre intervenção e desfecho.

Outro parâmetro que poderia interferir com os resultados encontrados seria a hidratação imposta aos ratos durante o experimento. A dosagem de sódio plasmático não apresentou variação, confirmando a adequação da reposição volêmica.

Este estudo, utilizando modelo já consolidado de lesão isquemia-reperfusão renal em ratos desenvolvido nesta Universidade, adotou a técnica anestésica inalatória com o agente isoflurano. A literatura já estabeleceu que o isoflurano possui efeito protetor em cenários de lesão isquemia-reperfusão renal, possivelmente por meio da supressão da ativação do NF-κB, da diminuição da expressão de citocinas inflamatórias, da atenuação da apoptose tubular, da regulação do desequilíbrio das expressões de Bcl-2/Bax e da regulação da ativação da caspase-3 [111]. Apesar da referida constatação, este estudo expôs os três grupos analisados ao mesmo agente inalatório, nas

mesmas condições de uso, de forma que o grupo sham (simulação) funcionou como grupo controle dos outros dois, permitindo concluir que qualquer alteração nos desfechos destes dois últimos seria atribuída exclusivamente à manobra de isquemia-reperfusão e aditivamente, alternativamente ou indiferentemente ao uso da CsA.

Onishi et al.[16] demonstraram que o sevoflurano e a CsA inibem o PTTm, por mecanismos diferentes e que ambos os fármacos protegem o coração da lesão de isquemia e reperfusão.

A abertura do PTTm é fundamental para o estabelecimento da lesão por isquemia-reperfusão.

O PPTm é formado pela adenina nucleotídeo translocase na membrana interna da mitocôndria e do canal de cálcio voltagem dependente.

Ao se ligar à ciclofilina D, a matriz proteção da adenina nucleotídeo translocase aumenta a sensibilidade deste íon cálcio que é o gatilho para abertura do PPTm.

A ciclosporina previne a interação da ciclofilina à adenina nucleotídeo translocase, resultando na inibição da abertura do PPTm. Os inalatórios impedem a abertura deste poro por efeito mediado pela inativação da glicogênio cinase sintetase.

Embora por mecanismos distintos, a inibição da abertura do PPTm deveria ser sinérgica quando da utilização dos dois fármacos e, consequentemente, uma melhora acentuada na lesão por isquemia-reperfusão.

Nesta pesquisa, não houve esta proteção pois os grupos controle (GC) e ciclosporina (GCsA) apresentaram o mesmo grau de lesão, com exceção apenas da avaliação histológica, onde quase metade dos animais do GCsA ficou na condição de moderada à grave (25%-50% da superfície histológica com necrose tubular), ao contrário do GC onde quase a totalidade apresentou lesão muito grave (>75% da superfície histológica com necrose tubular).

A monitorização utilizada no presente estudo se ateve às variáveis hemodinâmicas e de temperatura, não lançando mão da oximetria arterial que

proveria informação importante e adequada acerca da oxigenação tecidual. Infelizmente não havia disponível tal monitor para esta análise, de forma que se utilizou a monitorização clínica através da observação da mecânica motora torácica e da coloração das extremidades (cianose), apesar das limitações do método. Na literatura não é comum o uso da oximetria arterial no cenário da pesquisa experimental com ratos.

O procedimento cirúrgico por si só possui o condão de ativar a resposta metabólica ao trauma, com ativação do sistema nervoso autonômico simpático, deslocamento de fluido do intravascular e precipitação de resposta inflamatória sistêmica, com poder intrínseco de provocar lesão orgânica, fato observado no presente estudo em que os animais do grupo sham (simulação), apesar de terem sido anestesiados com isoflurano e não terem sido desafiados com a manobra de isquemia e reperfusão, apresentaram risco (60%) e lesão (40%) de acordo com os critérios RIFLE, assim como lesão histológica leve (11,1%) no rim esquerdo conforme classificação de Park et al.[128].

A nefrectomia realizada à direita é considerada uma cirurgia de grande porte. Este tipo de cirurgia submete as cobaias a um estresse cirúrgico grande com consequente ativação intensa do sistema nervoso simpático, com indução de aumento na atividade simpática renal, a perda de fluidos no transoperatório juntamente com a resposta inflamatória sistêmica podem ter contribuído para as alterações encontradas que, entretanto, não se encontrou dano estrutural, principalmente no grupo sham, cuja histologia é normal.

O objetivo principal deste estudo foi avaliar os efeitos da CsA na lesão isquemia-reperfusão renal em ratos. De uma forma geral, os resultados mostraram que a administração deste fármaco, na dosagem e condições propostas neste trabalho, foi incapaz de promover melhora dos danos decorrentes da lesão tecidual isquêmica seguida de reperfusão. Este estudo incluiu a avaliação de medidas e escalas validadas e comumente utilizadas na investigação das lesões renais, incluindo as avaliações das dosagens plasmáticas de ureia e creatinina bem como avaliação histológica dos rins e o critério RIFLE. Em síntese os resultados foram equivalentes para cada medida

examinada, fato este que mostra consistência nos efeitos encontrados. Apesar do GS, na análise pareada, ter apresentado variações significativas nas medidas séricas de ureia e creatinina, a análise não pareada entre os três grupos apresentou diferenças significativas entre o GS e o GC e o GS e o GCsA para as medidas de creatinina sérica, assim como ureia sérica, quando avaliados em M2. De fato, estes achados foram reforçados nas análises descritivas do RIFLE, onde os animais incluídos em GCsA e em GC, em quase sua totalidade, apresentaram falência. Esta tendência não se confirmou com a avaliação histológica que mostrou lesão de moderada à grave, em quase metade dos animais (25%-50% da superfície histológica com necrose tubular), até muito grave no GCsA, enquanto que no GC quase a totalidade dos animais apresentou lesão muito grave (>75% da superfície histológica com necrose tubular).

O cenário não é negativo em sua totalidade, sendo que um estudo mostrou que CsA pode melhorar os resultados da avaliação histológica na lesão renal[133]. As razões para estas diferenças podem partir da hipótese de diferenças metodológicas.

Por exemplo, a dosagem de CsA utilizada neste trabalho foi cinco vezes maior que a utilizada no outro trabalho [133]. Os autores utilizaram 3 mg/kg de ciclosporina A por via venosa em ratos submetidos à isquemia de 45 minutos por ligadura do pedículo renal bilateral. O anestésico administrado foi o pentobarbital sódico. Houve diminuição da lesão renal, da creatinina e da ureia sérica no grupo tratado com ciclosporina.

Os autores aventaram para a hipótese de que a CsA pode inibir o PPTm protegendo a célula de subsequente estresse oxidativo, assim como, a infiltração de neutrófilos e a apoptose celular.

Apesar da impossibilidade de realização de estatística inferencial os resultados da avaliação histológica foram coerentes em parte com aqueles vistos em outro estudo [10].

Cologna et al.[10] utilizaram CsA na dose de 20 mg/kg/dia intraperitoneal, isto é, uma dose administrada 24 horas antes do procedimento experimental e

a outra no dia da cirurgia. A anestesia foi realizada com tiopental sódico, e os ratos foram divididos em cinco grupos experimentais: controle, 40, 60 minutos de isquemia realizada por pinçamento da artéria renal esquerda, e 40, 60 minutos de isquemia associados à CsA. O grupo submetido a 40 minutos de isquemia e a administração de CsA, foi o que apresentou lesões mais brandas.

O tempo e a dose de fato são elementos críticos para o desfecho final, como já relatado anteriormente [15]. Além disso, outros elementos importantes conhecidos e não conhecidos devem contribuir para resultados opostos, a começar pela heterogeneidade das avaliações, tempo de isquemia, dose da droga, momento de administração, intervenções associadas, órgão alvo, presença de outras doenças e agravos dentre outros [10,11,134–137]. Ainda sobre a avaliação descritiva, a análise dos resultados do RIFLE segue o mesmo padrão, o que reforça que nas condições planejadas CsA não protege o rim da lesão por isquemia-reperfusão.

As análises inferenciais da creatinina e da ureia apresentaram um padrão de resultados piores nos grupos controle e CsA em relação ao grupo sham ou simulação, similar ao já descrito na literatura [10,15]. De forma diferente um estudo bem delineado mostrou resultados distintos no coração [137], mas a intervenção consistiu de CsA e pós-condicionamento. Interessantemente poucos estudos têm avaliado a curva dose-resposta. Um estudo americano avaliando as diferenças entre o uso da CsA e de solução lipídica a 20% mostrou que, ao avaliar a curva dose-resposta, este último foi mais eficaz em prevenir lesão no coração [7], porém a avaliação se constituiu no tamanho da área do infarto. Talvez seja importante que estudos avaliando a curva dose-resposta para CsA possa ajudar a elucidar se este fármaco é realmente incapaz de prevenir lesão renal ou se a variabilidade metodológica e a forma como os estudos são desenhados é que justificam o cenário ainda controverso nos diferentes órgãos [11,12,133].

Este presente estudo foi delineado com o intuito de contribuir de maneira eficaz para o esclarecimento de tão grave condição clínica, a saber, lesão isquemia-reperfusão renal, além de frequente, que, invariavelmente, expõe a

risco real de saúde e vida àqueles acometidos, assim como impõe vultosos gastos de natureza econômica para a sociedade. Envidar esforços na consecução de tal mister, no sentido de minimizar ou anular os efeitos deletérios de tão nefasto agravo à saúde, representa feito de grande benefício para a humanidade. Portanto, a síntese deste trabalho foi trazer mais uma informação valiosa e confiável no cenário científico mundial, contextualizando junto com os outros trabalhos produzidos no mesmo sentido, para fornecer subsídios à comunidade científica na produção de estratégias, como uma revisão sistemática e meta-análise por exemplo, no estabelecimento de um eventual panorama em que a CsA, em determinadas condições, possa oferecer benefício efetivo em situações de isquemia-reperfusão renal. Além disso, a avaliação da lesão e proteção renal com a administração de CsA pelo critério de RIFLE, até o presente momento, não se encontrou na literatura.

Este trabalho apresenta limitações. A não inclusão de um grupo controle para a ciclosporina com o objetivo de mostrar que em doses similares a esta, a droga é incapaz de piorar a lesão isquemia-reperfusão, mas isso implicaria maior custo e inclusão de novos animais para o referido grupo. Em estudos experimentais com animais é necessário pensar em três palavras: "*Refinement, Reduction* e *Replacement"*, que traduz a necessidade de produzir o mínimo possível de dor, estresse e sofrimento aos animais, reduzindo ao estritamente necessário o número de animais utilizados e, quando possível, adotando modelos não animais para resolução de perguntas de investigação. Além disso, a literatura já tem demonstrado que a ciclosporina não piora a lesão isquemia-reperfusão em doses de 1,0 a 20,0 mg/kg utilizadas no período imediatamente anterior ou posterior à isquemia-reperfusão[10,112]. Outrossim, a utilização de biomarcadores com capacidade de detecção mais precoce da lesão renal poderia fornecer informações adicionais, porém, estão todos, ainda, sob investigação e a creatinina se mostrou suficiente na situação experimental proposta, se elevando prontamente após a manobra de isquemia-reperfusão.

7 CONCLUSÃO

A Ciclosporina A, nas dosagens e condições utilizadas neste estudo, não preveniu os danos decorrentes da lesão isquêmica tecidual (renal) seguida de reperfusão em ratos, apesar de atenuá-los sob a perspectiva histológica.

8 REFERÊNCIAS

1. Moens A, Claeys M, Timmermans J, et al. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int J Cardiol*. 2005;100(2):179-190.

2. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury. *Lancet*. 2012;380(9843):756-766.

3. Perico N, Cattaneo D, Sayegh M, et al. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet*. 2004;364(9447):1814-1827.

4. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med*. 2011;17(11):1391-1401.

5. Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol*. 2011;7(4):189-200.

6. Verma S, Fedak P, Weisel R, et al. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation*. 2002;105(20):2332-2336.

7. Li J, Iorga A, Sharma S, et al. Intralipid, a clinically safe compound, protects the heart against ischemia-reperfusion injury more efficiently than cyclosporine-a. *Anesthesiology*. 2012;117(4):836-846.

8. Shiga Y, Onodera H, Matsuo Y, et al. Cyclosporin a protects against ischemia-reperfusion injury in the brain. *Brain Res*. 1992;595(1):145-148.

9. Lameire NH, Bagga A, Cruz D, et al. Acute kidney injury: an increasing global concern. *Lancet*. 2013;382(9887):170-179.

10. Cologna AJ, Lima LVS, Tucci SJ, et al. Cyclosporine action on kidneys of rats submitted to normothermic ischaemia and reperfusion. *Acta Cir Bras*. 2008;23(Supplement 1):36-41.

11. Zhu T, Au-yeung KKW, Siow YL, et al. Cyclosporine a protects against apoptosis in ischaemic/reperfused rat kidneys. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002;29:852-854.

12. Karlsson LO, Zhou A-X, Larsson E, et al. Cyclosporine does not reduce myocardial infarct size in a porcine ischemia-reperfusion model. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2010;15(2):182-189.

13. Xie J-R, Yu L-N. Cardioprotective effects of cyclosporine a in an in vivo model of myocardial ischemia and reperfusion. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2007;51(7):909-913.

14. Pritzwald-Stegmann P, Hoyer A, Kempfert J, et al. Cardioprotective effects of low-dose cyclosporin a added to histidine-tryptophan-ketoglutarate cardioplegia solution prior to total myocardial ischemia: an in vitro rabbit heart study. *Pharmacology*. 2011;88(3-4):167-173.

15. Ysebaert DK, De Greef KE, Nouwen EJ, et al. Influence of cyclosporin a on the damage and regeneration of the kidney after severe ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc*. 1997;29:2348-2351.

16. Onishi A, Miyamae M, Kaneda K, et al. Direct evidence for inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by sevoflurane preconditioning in cardiomyocytes: comparison with cyclosporine a. *Eur J Pharmacol*. 2012;675(1-3):40-46.

17. Chang C-H, Lin C-Y, Tian Y-C, et al. Acute kidney injury classification: comparison of akin and rifle criteria. *Shock*. 2010;33(3):247-252.

18. Vaidya VS, Ozer JS, Frank D, et al. Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in multi-site preclinical biomarker qualification studies. *Natl Biotechnol*. 2010;28(5):478-485.

19. Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol*. 2011;7(4):189-200.

20. Thakar C, Arrigain S, Worley S, et al. A clinical score to predict acute renal failure after cardiac surgery. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(1):162-168.

21. Singh P, Rifkin D, Blantz R. Chronic kidney disease: an inherent risk factor for acute kidney injury? *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(9):1690-1695.

22. Coca S. Acute kidney injury in elderly persons. *Am J Kidney Dis*. 2010;56(1):122-131.

23. Harel Z, Chan C. Predicting and preventing acute kidney injury after cardiac surgery. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008;17(6):624-628.

24. Ricci Z, Cruz D, Ronco C. The rifle criteria and mortality in acute kidney injury: a systematic review. *Kidney Int*. 2008;73(5):538-546.

25. Molitoris BA, Melnikov W, Okusa M, et al. Technology insight: biomarker development in acute kidney injury-what can we anticipate? *Nat Clin Pract Nephrol*. 2008;4(3):154-165.

26. Molitoris BA. Contrast nephropathy: are short-term outcome measures adequate for quantification of long-term renal risk? *Nat Clin Pract Nephrol*. 2008;4(11):594-595.

27. Himmelfarb J. Acute kidney injury in the elderly: problems and prospects. *Semin Nephrol*. 2009;29(6):658-664.

28. James M, Hemmelgarn B, Wiebe N, et al. Glomerular filtration rate, proteinuria, and the incidence and consequences of acute kidney injury: a cohort study. *Lancet*. 2010;376(9758):2096-2103.

29. Nash K, Hafeez A, Hou S. Hospital-acquired renal insufficiency. *Am J Kidney Dis*. 2002;39(5):930-936.

30. Sesso R, Roque A, Vicioso B, et al. Prognosis of arf in hospitalized elderly patients. *Am J Kidney Dis*. 2004;44(3):410-419.

31. Wencker D. Acute cardio-renal syndrome: progression from congestive heart failure to congestive kidney failure. *Curr Heart Fail Rep*. 2008;4(3):134-138.

32. Wan L, Bagshaw S, Langenberg C, et al. Pathophysiology of septic acute kidney injury: what do we really know? *Crit Care Med*. 2008;36(4 Suppl):S198-S203.

33. Himmelfarb J, Joannidis M, Molitoris BA, et al. Evaluation and initial management of acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(4):962-967.

34. Fujii T, Kurata H, Takaoka M, et al. The role of renal sympathetic nervous system in the pathogenesis of ischemic acute renal failure. *Eur J Pharmacol*. 2003;481(2-3):241-248.

35. Kastner P, Hall J, Guyton A. Control of glomerular filtration rate : role of intrarenally formed angiotensin II. *Am J Physiol*. 1984;246:F897-F906.

36. Yared A, Kon V, Ichikawa L. Mechanism of preservation of glomerular perfusion and filtration during acute extracellular fluid volume depletion. *J Clin Invest*. 1985;75:1477-1487.

37. Oliver J, Sciacca R, Cannon P. Renal vasodilation by converting enzyme inhibition. *Hypertension*. 1983;5:166-171.

38. Molitoris BA, Sutton T. Endothelial injury and dysfunction: role in the extension phase of acute renal failure. *Forefronts Nephrol*. 2003:496-499.

39. Alejandro V, Scandling J, Sibley R, et al. Mechanisms of filtration failure during postischemic injury of the human kidney. *J Clin Invest*. 1995;95(February):820-831.

40. Ramaswamy D, Corrigan G, Polhemus C, et al. Maintenance and recovery stages of postischemic acute renal failure in humans. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;282:F271-F280.

41. Molitoris BA. Actin cytoskeleton in ischemic acute renal failure. *Kidney Int*. 2004;66:871-883.

42. Ashworth S, Sandoval R, Tanner G, et al. Two-photon microscopy: visualization of kidney dynamics. *Kidney Int*. 2007;72(4):416-421.

43. Ashworth S, Sandoval R, Hosford M, et al. Ischemic injury induces adf relocalization to the apical domain of rat proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001;280:F886-F894.

44. Ashworth S, Southgate E, Sandoval R, et al. adf / cofilin mediates actin cytoskeletal alterations in llc-pk cells during atp depletion. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;284:F852-F862.

45. Atkinson S, Hosford M, Molitoris BA. Mechanism of actin polymerization in cellular atp depletion. *J Biol Chem*. 2004;279(7):5194-5199.

46. Molitoris BA, Marrs J. The role of cell adhesion molecules in ischemic acute renal failure. *Am J Med*. 1999;106(5):583-592.

47. Molitoris BA, Geerdes A, McIntosh J. Dissociation and redistribution of na + , k + -atpase from its surface membrane actin cytoskeletal complex during cellular atp depletion. *J Clin Invest*. 1991;88:462-469.

48. Bonegio R, Lieberthal W. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2002;11:301-308.

49. Guo R, Wang Y, Minto A, et al. Acute renal failure in endotoxemia is dependent on caspase activation. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(12):3093-3102.

50. Safirstein R. Acute renal failure : from renal physiology to the renal transcriptome. *Kidney Int*. 2004;66(Supplement 91):S62-S66.

51. Nicholson D. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature*. 2000;407:810-816.

52. Conger J, Schrier R. Renal hemodynamics in acute renal failure. *Annu Rev Physiol*. 1980;42:603-614.

53. Conger J, Robinette J, Hammond W. Differences in vascular reactivity in models of ischemic acute renal failure. *Kidney Int*. 1991;39(6):1087-1097.

54. Sutton T, Mang H, Campos S, et al. Injury of the renal microvascular endothelium alters barrier function after ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285:F191-F198.

55. Sutton T, Kelly K, Mang H, et al. Minocycline reduces renal microvascular leakage in a rat model of ischemic renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;288(1):F91-F97.

56. Gupta A, Rhodes G, Berg D, et al. Activated protein c ameliorates lps-induced acute kidney injury and downregulates renal inos and angiotensin 2. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;293(1):F245-F254.

57. Mizutani A, Okajima K, Uchiba M, et al. Activated protein c reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation. *Am Soc Hematol*. 2000:3781-3787.

58. Tajra L, Martin X, Margonari J, et al. In vivo effects of monoclonal antibodies against rat ß2 integrins on kidney ischemia – reperfusion injury. *J Surg Res*. 1999;87:32-38.

59. Singbartl K, Forlow S, Ley K. Platelet , but not endothelial , p-selectin is critical for neutrophil-mediated acute postischemic renal failure. *FASEB J*. 2001;(30):2337-2344.

60. Akcay A, Nguyen Q, Edelstein C. Mediators of inflammation in acute kidney injury. *Mediators Inflamm*. 2009;2009:1-12.

61. Wu H, Chen G, Wyburn K, et al. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest*. 2007;117:2947-2959.

62. Burne-Taney M, Rabb H. The role of adhesion molecules and t cells in ischemic renal injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2003;12(1):85-90.

63. Burne-Taney M, Ascon D, Daniels F, et al. B cell deficiency confers protection from renal ischemia reperfusion injury. *J Immunol*. 2003;171(6):3210-3215.

64. De Vries B, Kohl J, Leclercq W, et al. Complement factor c5a mediates renal ischemia-reperfusion injury independent from neutrophils. *J Immunol*. 2003;170(7):3883-3889.

65. Riedemann N, Guo R-F, Ward P. The enigma of sepsis. *J Clin Invest*. 2003;112(4):460-467.

66. Huber-Lang M, Sarma J, McGuire S, et al. Protective effects of anti-c5a peptide antibodies in experimental sepsis. *FASEB J*. 2001:568-570.

67. Thurman J, Lenderink A, Royer P, et al. C3a is required for the production of cxc chemokines by tubular epithelial cells after renal ishemia/reperfusion. *J Immunol*. 2007;178(3):1819-1828.

68. Zheng X, Zhang X, Sun H, et al. Protection of renal ischemia injury using combination gene silencing of complement 3 and caspase 3 genes. *Transplantation*. 2006;82(12):1781-1786.

69. Kinsey G, Li L, Okusa M. Inflammation in acute kidney injury. *Nephron Exp Nephrol*. 2008;109(4):e102-e107.

70. El-Achkar T, Huang X, Plotkin Z, et al. Sepsis induces changes in the expression and distribution of toll-like receptor 4 in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;290(5):F1034-F1043.

71. El-Achkar T, Plotkin Z, Marcic B, et al. Sepsis induces an increase in thick ascending limb cox-2 that is tlr4 dependent. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;293(4):F1187-F1196.

72. Rusai K, Sollinger D, Baumann M, et al. Toll-like receptors 2 and 4 in renal ischemia/reperfusion injury. *Pediatr Nephrol*. 2010;25(5):853-860.

73. Day Y-J, Huang L, Ye H, et al. Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2a receptor-mediated tissue protection: role of macrophages. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;288(4):F722-F731.

74. Dong X, Swaminathan S, Bachman L, et al. Resident dendritic cells are the predominant tnf-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int*. 2007;71(7):619-628.

75. Gandolfo M, Jang H, Bagnasco S, et al. Foxp3+ regulatory t cells participate in repair of ischemic acute kidney injury. *Kidney Int*. 2009;76(7):717-729.

76. Kinsey G, Huang L, Vergis A, et al. Regulatory t cells contribute to the protective effect of ischemic preconditioning in the kidney. *Kidney Int*. 2010;77(9):771-780.

77. Uchino S, Kellum J, Bellomo R, et al. Acute renal failure in critically ill patients. *J Am Med Assoc*. 2005;294(7):813-818.

78. Ostermann M, Chang R. Acute kidney injury in the intensive care unit according to rifle. *Crit Care Med*. 2007;35(8):1837-1843.

79. Kellum J, Levin N, Bouman C, et al. Developing a consensus classification system for acute renal failure. *Curr Opin Crit Care*. 2002;8(6):509-514.

80. Lameire N, Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure. *Lancet*. 2005;365:417-430.

81. Schrier R, Wang W, Poole B, et al. Acute renal failure : definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest*. 2004;114(1):5-14.

82. Bellomo R, Ronco C, Kellum J, et al. 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;8(4):R204-R212.

83. Lin C-Y, Tsai F-C, Tian Y-C, et al. Evaluation of outcome scoring systems for patients on extracorporeal membrane oxygenation. *Ann Thorac Surg*. 2007;84(4):1256-1262.

84. Jenq C-C, Tsai M-H, Tian Y-C, et al. RIFLE classification can predict short-term prognosis in critically ill cirrhotic patients. *Intensive Care Med*. 2007;33(11):1921-1930.

85. Uchino S, Bellomo R, Goldsmith D, et al. An assessment of the rifle criteria for acute renal failure in hospitalized patients. *Crit Care Med*. 2006;34(7):1913-1917.

86. Hoste E, Clermont G, Kersten A, et al. RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis. *Crit Care*. 2006;10(3):R73.

87. Bellomo R, Kellum J, Ronco C. Defining and classifying acute renal failure: from advocacy to consensus and validation of the rifle criteria. *Intensive Care Med*. 2007;33(3):409-413.

88. Mehta R, Kellum J, Shah S, et al. Acute kidney injury network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care*. 2007;11(2):R31.

89. Lopes J, Fernandes P, Jorge S, et al. Acute kidney injury in intensive care unit patients: a comparison between the rifle and the acute kidney injury network classifications. *Crit Care*. 2008;12(4):R110.

90. Bagshaw S, George C, Bellomo R. A comparison of the rifle and akin criteria for acute kidney injury in critically ill patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(5):1569-1574.

91. Cope D, Impastato W, Cohen M, et al. Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. *Anesthesiology*. 1997;86:699-709.

92. Novalija E, Fujita S, Kampine J, et al. Sevoflurane mimics ischemic preconditioning effects on coronary flow and nitric oxide release in isolated hearts. *Anesthesiology*. 1999;91(3):701-712.

93. Tolier W, Kersten J, Hettrick D, et al. Sevoflurane reduces myocardical infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Anesthesiology*. 1999;91:1437-1446.

94. Kersten J, Schmeling T, Hettrick D, et al. Mechanism of myocardical protection by isoflurane. *Anesth Analg*. 1996;85:794-807.

95. Mobert J, Zahler S, Becker B, et al. Inhibition of neutrophil activation by volatile anesthetics decreases adhesion to cultured human endothelial cells. *Anesthesiology*. 1999;90:1372-1381.

96. Kowalski C, Zahler S, Becker B, et al. Halothane, isoflurane, and sevoflurane reduce postischemic adhesion of neutrophils in the coronary system. *Anesthesiology*. 1997;86:188-195.

97. Liu R, Ishibe Y, Ueda M. Isoflurane–sevoflurane administration before ischemia attenuates ischemia–reperfusion-induced injury in isolated rat lungs. *Anesthesiology*. 2000;92(3):833-840.

98. Lee H, Ota-Setlik A, Fu Y, et al. Differential protective effects of volatile anesthetics against renal ischemia – reperfusion injury in vivo. *Anesthesiology*. 2004;101(6):1313-1324.

99. Aronson S, Rebecca B. Perioperative renal dysfunction and cardiovascular anesthesia: concerns and controversies. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 1998;12(5):567-586.

100. Star R. Treatment of acute renal failure. *Kidney Int*. 1998;54:1817-1831.

101. Rabadi M, Ghaly T, Goligorksy M, et al. HMGB1 in renal ischemic injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;303(6):F873-F885.

102. Yang J-R, Yao F-H, Zhang J-G, et al. Ischemia-reperfusion induces renal tubule pyroptosis via the chop-caspase-11 pathway. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;306(1):F75-F84.

103. Kelly K, Sutton T, Weathered N, et al. Minocycline inhibits apoptosis and inflammation in a rat model of ischemic renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;287:F760-F766.

104. Jin X, Chen J, Hu Z, et al. Genetic deficiency of adiponectin protects against acute kidney injury. *Kidney Int*. 2013;83(4):604-614.

105. Havasi A, Borkan S. Apoptosis and acute kidney injury. *Kidney Int*. 2011;80(1):29-40.

106. Kurokawa M, Kornbluth S. Caspases and kinases in a death grip. *Cell*. 2009;138(5):838-854.

107. Jamnicki-Abegg M, Weihrauch D, Pagel P, et al. Isoflurane inhibits cardiac myocyte apoptosis during oxidative and inflammatory stress by activating akt and enhancing bcl-2 expression. *Anesthesiology*. 2005;103(5):1006-1014.

108. Schmidt R, Tritschler E, Hoetzel A, et al. Heme oxygenase-1 induction by the clinically used anesthetic isoflurane protects rat livers from ischemia/reperfusion injury. *Ann Surg*. 2007;245(6):931-942.

109. Zhou Y, Lekic T, Fathali N, et al. Isoflurane posttreatment reduces neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats by the sphingosine-1-phosphate/phosphatidylinositol-3-kinase/akt pathway. *Stroke A J Cereb Circ*. 2010;41(7):1521-1527.

110. Hashiguchi H, Morooka H, Miyoshi H, et al. Isoflurane protects renal function against ischemia and reperfusion through inhibition of protein kinases, jnk and erk. *Anesth Analg*. 2005;101(6):1584-1589.

111. Liang Y, Li Z, Mo N, et al. Isoflurane preconditioning ameliorates renal ischemia-reperfusion injury through antiinflammatory and antiapoptotic actions in rats. *Biol Pharm Bull*. 2014;37(10):1599-1605.

112. Hausenloy D, Boston-Griffiths E, Yellon D. Cyclosporin a and cardioprotection: from investigative tool to therapeutic agent. *Br J Pharmacol*. 2012;165(5):1235-1245.

113. Crompton M, Ellinger H, Costi A. Inhibition by cyclosporin a of a ca2 + -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J*. 1988;255:357-360.

114. Handschumacher R, Harding M, Rice J, et al. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin a. *Science*. 1984;226:544-547.

115. Halestrap A, Davidson A. Inhibition of ca2 + -induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J*. 1990;268:153-160.

116. Griffiths E, Halestrap A. Further evidence that cyclosporin a protects mitochondria from calcium overload by inhibiting a matrix peptidyl-prolyl. *Biochem J*. 1991;274:611-614.

117. Tanveer A, Virji S, Andreeva L, et al. Involvement of cyclophilin d in the activation of a mithocondrial pore by ca2+ and oxidant stress. *Eur J Biochem*. 1996;238:166-172.

118. Al-Nasser I, Crompton M. The entrapment of the ca2 + indicator arsenazo III in the matrix space of rat liver mitochondria by permeabilization and resealing. *Biochem J*. 1986;239:31-40.

119. Crompton M, Costi A, Hayat L. Evidence for the presence of a reversible ca2+-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem J*. 1987;245:915-918.

120. Al-Nasser I, Crompton M. The reversible ca2 + -induced permeabilization of rat liver mitochondria. *Biochem J*. 1986;239:19-29.

121. Hausenloy D, Maddock H, Baxter G, et al. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening : a new paradigm for myocardial preconditioning ? *Cardiovasc Res*. 2002;55:534-543.

122. Hausenloy D. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35(4):339-341.

123. Karlsson L, Zhou A-X, Larsson E, et al. Cyclosporine does not reduce myocardial infarct size in a porcine ischemia-reperfusion model. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2010;15(2):182-189.

124. Skyschally A, Schulz R, Heusch G. Cyclosporine a at reperfusion reduces infarct size in pigs. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2010;24(1):85-87.

125. Chul W, Hee J, Hyuk J, et al. Pharmacological preconditioning with low-dose cyclosporine or fk506 reduces subsequent ischemia/reperfusion injury in rat kidney. *Transplantation*. 2001;72(11):1753-1759.

126. Módolo NS, Castiglia YM, Ganem EM, et al. Acute renal ischemia model in dogs: effects of metoprolol. *Ren Fail*. 2001;23(1):1-10.

127. Fujii T, Takaoka M, Tsuruoka N, et al. Dietary supplementation of l -carnosine prevents ischemia / reperfusion- induced renal injury in rats. *Biol Pharm Bull*. 2005;28(2):361-363.

128. Park Y, Hirose R, Dang K, et al. Increased severity of renal ischemia-reperfusion injury with venous clamping compared to arterial clamping in a rat model. *Surgery*. 2008;143(2):243-251.

129. Scheibe P. Number of samples - hypothesis testing. *Nucl Med Biol*. 2008;35(1):3-9.

130. Thompson R, Lane B, Lohse C, et al. Every minute counts when the renal hilum is clamped during partial nephrectomy. *Eur Urol*. 2010;58(3):340-345.

131. Woodson B, Wang L, Mandava S, et al. Urinary cystatin C and NGAL as early biomarkers for assessment of renal ischemia-reperfusion injury: a serum marker to replace creatinine? *J Endourol*. 2013;27(12):1510-1015.

132. Zager R, Altschuld R. Body temperature: an important determinant of severity of ischemic renal injury. *Am J Physiol*. 1986;251(1 Pt 2):F87-F93.

133. Singh D, Chander V, Chopra K. Cyclosporine protects against ischemia/reperfusion injury in rat kidneys. *Toxicology*. 2005;207(3):339-347.

134. Badalzadeh R, Mohammadi M, Najafi M, et al. The additive effects of ischemic postconditioning and cyclosporine-a on nitric oxide activity and functions of diabetic myocardium injured by ischemia/reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2012;17(2):181-189.

135. Piot C, Croisille P, Staat P. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2008;359(5):473-481.

136. Jiang B, Liu X, Chen H, et al. Ischemic postconditioning attenuates renal ischemic/reperfusion injury in mongrel dogs. *Urology*. 2010;76(6):1519.e1-1519.e7.

137. Duan X, Ji B, Yu K, et al. Acidic buffer or plus cyclosporine a post-conditioning protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury. *Perfusion*. 2011;26(3):245-252.

138. Islam CF, Mathie RT, Dinneen MD, et al. Ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney: the effect of preconditioning. *British Journal of Urology. 1997;79(6):842-847.*