

Fabio Poças Zambelli

**O isoflurano e a associação remifentanil e
isoflurano usados após isquemia reperfusão
causam proteção renal em ratos?**

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

Orientador: Prof. Dr Pedro Thadeu Galvão Vianna

**Botucatu – SP
2010**

Dedico

À minha filha, Ana Clara,
sempre motivo de alegria e força que me faz continuar nos
momentos difíceis.

À minha mãe, Telma,
que me ajudou a tornar isso possível, sempre dando todo o apoio para que essa tese
se realizasse.

À minha família,
que é a base de tudo.

Ao Prof.Titular Pedro Thadeu Galvão Vianna,
que além de orientador, tornou-se um amigo e grande
exemplo a ser seguido.

Agradecimento Especial

Ao Professor Titular Pedro Thadeu Galvão Vianna

Mestre paciente e brilhante que possui todas as qualidades de um grande professor. Exemplo de homem, que todos deveriam tentar ser. Um amigo que ajudou nos momentos difíceis e tornou simples coisas quase impossíveis. Não existem palavras para agradecer, nem para qualificar o Dr. Thadeu (principalmente escritas por um péssimo escritor como eu...).

Agradeço a Deus pelo privilégio de poder conviver e aprender tanto com ele!

Agradecimentos

Agradeço às equipes da Pós-Graduação
e do Laboratório Experimental do Departamento de Anestesiologia
e do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP,
em especial à Prof^ª Dr^ª Rosa Marlene Viero.

À Prof^ª Dr^ª Lídia Raquel de Carvalho, do Departamento de Bioestatística do
Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, pela análise estatística dos resultados.

Gostaria ressaltar a ajuda de três pessoas especiais, sem elas,
este trabalho não seria possível:
Cristiano Correa de Oliveira, Neli Aparecida Pavan e a
Prof^ª Titular Yara Marcondes Machado Castiglia.

Zambelli FP. O isoflurano e a associação remifentanil e isoflurano usados após isquemia-reperfusão causam proteção renal em ratos ? Botucatu, 2010. 73p. (Doutorado em Anestesiologia) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

Resumo

Introdução e objetivos. Há fármacos que produzem pré-condicionamento farmacológico e, dentre estes, os anestésicos inalatórios são os mais estudados. Como exemplo, o isoflurano pode proteger o rim contra a lesão causada pela isquemia-reperfusão, principalmente quando a anestesia inalatória é mantida por um período após a reperfusão. Os opióides parecem ser uma classe de fármacos capaz de produzir este pré-condicionamento. Há estudo mostrando que o remifentanil pode proteger o miocárdio contra a lesão produzida pela isquemia-reperfusão. Outro estudo mostrou que a lesão da isquemia e reperfusão renal pode ser atenuada em ratos submetidos à associação do isoflurano e do remifentanil e ao pré-condicionamento mecânico. O objetivo deste trabalho foi verificar se o isoflurano e a associação do isoflurano e do remifentanil usado após a isquemia-reperfusão podem causar proteção renal.

Material e Métodos - 40 ratos machos, da raça Wistar foram distribuídos em quatro Grupos: Grupo Sham (n=10); Grupo IP (n=10), isoflurano usado durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão; Grupo IRP (n=10), associação do isoflurano com remifentanil usado durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão e Grupo Iso (n=10), isoflurano usado durante o experimento. Todos os animais foram anestesiados submetidos à intubação orotraqueal e colocados em ventilação mecânica (Ventilador Harvard Rodent 683). A veia jugular esquerda foi dissecada e um cateter foi introduzido para administração de fármacos e para a hidratação dos animais. A artéria carótida esquerda também foi dissecada e um cateter foi introduzido na sua luz com a finalidade de medida da pressão arterial (PAM) e de coleta de amostras de sangue. Todos os Grupos foram anestesiados com isoflurano na concentração inspirada entre 1,5 a 3 % e no Grupo IRP teve início a infusão de remifentanil na velocidade de $2 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Após laparotomia foi realizada nefrectomia à direita em todos os Grupos. Nos Grupos IP, IRP e Iso, além da nefrectomia à direita, no rim esquerdo foi usado *clamp* arterial

para isquemia deste órgão durante 45 minutos. No Grupo Sham o experimento foi concluído após a retirada do rim direito. Nos Grupos IRP e IP, após a retirada do *clamp* ou período de reperfusão os animais permaneceram anestesiados por 90 minutos. Em todos os Grupos a temperatura corpórea foi mantida entre 36-38°C. No final do experimento, foi feita analgesia usando a técnica das infiltrações das feridas operatórias com bupivacaína a 0,25%. No pós-operatório alimento e água foram ofertados livremente a todos os animais. Após 24 horas de reperfusão todos os animais foram anestesiados, submetidos à nefrectomia à esquerda e a coleta de sangue arterial (M3). Finalmente, os animais foram sacrificados com tiopental sódico. Os rins esquerdos destes animais foram enviados para análise histológica, com avaliação de lesão tubular (*score* 0-3) e para citometria de fluxo (CF). Amostras de sangue foram coletadas para análise de hematócrito e creatinina em três momentos: Momento 1 (M1) no início do procedimento, após a cateterização arterial; Momento 2 (M2) após a retirada do *clamp* vascular da artéria renal esquerda; e o Momento 3 (M3) ocasião do sacrifício do animal, ou seja, 24h após o período da reperfusão. Para fins de estatística a pressão arterial média (PAM) e a temperatura retal foram medidas em três períodos após a cateterização da artéria carótida: P0, logo depois; P30, trinta minutos após; e P60, sessenta minutos após.

Resultados: Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os Grupos nos parâmetros: peso, hematócrito e temperatura. O resultado da PAM no P0 (momento inicial do experimento) foram similares entre os Grupos. No período P30 a PAM foi significativamente menor no Grupo IRP (73 ± 27 mmHg) em relação ao Grupo Sham e ao Grupo Iso, mas similar ao Grupo IP (81 ± 17 mmHg). No período P60 a PAM foi estatisticamente menor no Grupo IRP (58 ± 13 mmHg) e no Grupo IP (73 ± 21) em relação ao Grupo Sham= 109 ± 11 mmHg) e o Grupo Iso (100 ± 18 mmHg). A creatinina sérica no M3 foi significativamente menor no Grupo Sham ($0,8 \pm 0,2$ mg/dl) do que nos Grupos IRP ($4,0 \pm 2,2$ mg/dL), Grupo IP ($4,3 \pm 2,5$) e no Grupo Iso ($3,9 \pm 1,5$ mg/dL). A necrose tubular no M3 foi menor no Grupo Sham (0,0 [0,0;0,0]) do que nos outros Grupos IRP (3,0[2,0;3,0]), Grupo IP (3,0[2,0;3,0]) e o Grupo Iso (3,0[2,0;3,0]). A Citometria de fluxo (CF) mostrou, estatisticamente significativo, menor índice de apoptose inicial (Anexina V) em M3 no Grupo Sham (2,3[1,8;2,9]) quando comparado aos grupos IRP (10,6 [9,0;11,8]) e IP (10,3[2,9;16,6]) e estes menores quando

comparado ao Grupo Iso (15,5[13,1;19,2]). Em relação a necrose foi menor em percentual no grupos Sham (7,5[6,5;11,5]), IRP (9,8[9,1;11,9]) e IP (11,1[3,8;17,0]) do que Iso (49,0[27,0;50,0]).

Conclusões: Pelos resultados da CF, o Grupo Iso teve piores resultados, tanto na apoptose inicial como na tardia. Os Grupos IRP e IP tiveram resultados similares em relação a apoptose inicial e a tardia. Concluímos, então que o emprego do isoflurano ou da associação isoflurano e remifentanil usados 90 minutos pós-reperfusão tiveram comportamento similares com relação à proteção renal.

Palavras-chave: isoflurano, remifentanil, isquemia, perfusão, pré-condicionamento, rim, rato.

Zambelli FP. Does Remifentanil plus isoflurane make preconditioning in kidney rats?. Botucatu, 2010. 73p. Doutorado em Anestesiologia. Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Abstract

Background and objectives: How we can protect our patients against ischemia-reperfusion injury is a question we make every day in anesthesia. Some drugs may be having the answer. Drugs can make pharmacologic preconditioning may be a good way to answer the question. Remifentanil can protect heart cells against ischemia-reperfusion (IR) injury. Isoflurane can protect the kidney against IR injury. Our work makes a question if the association can make any protection against ischemia-reperfusion injury?

Methods: 40 male Wistar rats were put in four groups Sham (n=10), Isoflurane (n=10) (Iso), isoflurane plus remifentanil (IRP) and isoflurane before reperfusion (ISO) with 10 rats each one. All rats groups were anesthetized and put with mechanical ventilation (Harvard Rodent Ventilator 683) by tracheal intubation. Catheters were inserted in jugular internal vein, for fluid or drug administration, and carotid artery, for measure arterial blood pressure and blood samples. All groups were anesthetized with Isoflurane between 1.5 and 3% and the group IRP start after the venous catheterize remifentanil 2 mcg/kg/min. The right kidney was removed, in the group Sham the procedure were over. For the others groups a clamp were put in left renal artery (LRA) for 45 minutes. The group Iso end, the procedure after the clamp were retired. The group IRP and IP were anesthetized for plus 90 minutes and the procedure were over. In all groups body temperature were between 36-38°C. In the end of the procedure before the extubation, analgesia were performed with infiltration of bupivacaine at 0.25%. Free food and water for all animals. After 24 hours all rats were nephrectomized in the left side and sacrificed with thiopentone. The kidneys were send to histological examination, and score for tubular lesion were performed (0- 3). Flow Cytometry (FCM) were performed in the left kidney for all groups. Blood samples to analyze serum creatinine and hematocrite were collected in three moments: In the beginning of the procedure (M1), after the clamp of LRA retired (M2) and before the left kidney be removed (M3).

Results: There's no difference between all groups for weight or body temperature. PAM (mmHg) was analyzed in three times: at the beginning of procedure (P0), 30 minutes after (P30); and 60 minutes after (P60). The P0 were similar for all groups, but the P30 were increased in Sham (100 ± 17) and Iso (99 ± 16), lower IRP (73 ± 27) and IP (81 ± 17). The P60 were higher in Sham (109 ± 11) and ISO (100 ± 18) than IRP (58 ± 13) and IP (73 ± 21). The serum creatinine in the M3 was lower in Sham (0.8 ± 0.2) than IRP (4.0 ± 2.2), IP (4.3 ± 2.5), ISO (3.9 ± 1.5). The tubular necrosis were lower in Sham than IRP ($3.0[2.0;3.0]$), IP ($3.0[2.0;3.0]$) e ISO ($3.0[2.0;3.0]$). The FCM show beginning apoptosis in percentual (%) lower in Sham ($2.3[1.8;2.9]$) than IRP($10.6[9.0;11.8]$) and IP ($10.3[2.9;16.6]$). These two groups were lower than ISO ($15.5[13.1;19.2]$). Dead cells were lower (%) in Sham ($7.5[6.5;11.5]$), IRP ($9.8[9.1;11.9]$) and IP ($11.1[3.8;17.0]$). than ISO ($49.0[27.0;50.0]$).

Conclusions: By the results of FCM, the ISO were the worst result. The IRP and IP have better results. We concluded Isoflurane plus Remifentanil there's no difference the isoflurane used before and after IR injury. The use of isoflurane only before and at time IR (ISO) shows a worst for protect kidney.

Key-words: isoflurane, remifentanil, ischemia, reperfusion, kidney, preconditioning

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Pré-condicionamento.....	18
1.1.1 Definição.....	18
1.1.2 Fisiologia.....	19
1.1.3 Pré-condicionamento precoce e tardio.....	23
1.1.4 Pré-condicionamento nos diferentes órgãos.....	25
1.1.5 Pré-condicionamento e anestesia.....	26
2 OBJETIVOS.....	31
3 MATERIAL E MÉTODO.....	32
3.1 Seqüência experimental.....	35
3.1.1 Grupo SHAM.....	35
3.1.2 Grupo IP.....	37
3.1.3 Grupo IRP.....	38
3.1.4 Grupo ISSO.....	41
3.2 Estudo histológico.....	43
3.3 Avaliação da viabilidade celular (apoptose) pelo método da citometria de fluxo.....	44
3.5 Metodologia estatística.....	47
4 RESULTADOS.....	48
4.1 Temperatura corporal.....	48
4.2 Pressão arterial média (PAM).....	49
4.3 Hematócrito.....	50
4.4 Creatinina sérica.....	51
4.5 Avaliação histológica.....	52
4.6 Citometria de fluxo.....	55
4.6.1 Citometria de fluxo. ANEXINA V – apoptose precoce.....	55
4.6.2 Citometria de fluxo. PI = Necrose – membrana degradada..	56
4.6.3 Citometria de fluxo. ANEXINA + PI = apoptose avançada.	57
4.6.4 Citometria de fluxo. Células viáveis.....	58
5 DISCUSSÃO.....	59
6 CONCLUSÕES.....	65
7 REFERÊNCIAS.....	66

Lista de Tabelas

Tabela 1	Média e desvio-padrão referente à temperatura segundo momentos (P0 = início, P30 = 30 minutos e P60 = 60 minutos) e grupos: Sham (n=10); IP (n=10) - isoflurano, durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão; IRP (n=10) - isoflurano e remifentanil durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão e Iso (n=10) - isoflurano, durante o experimento.....	48
Tabela 2	Média e desvio-padrão referente à PAM segundo momentos (P0 = início, P30 = 30 minutos e P60 = 60 minutos) e grupos: Sham (n=10); IP (n=10) - isoflurano, durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão; IRP (n=10) - isoflurano e remifentanil durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão e Iso (n=10) - isoflurano, durante o experimento.....	49
Tabela 3	Média e desvio-padrão referente ao hematócrito segundo momentos (P0 = início, P30 = 30 minutos e P60 = 60 minutos) e grupos: (Sham (n=10); IP (n=10) - isoflurano, durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão; IRP (n=10) - isoflurano e remifentanil durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão e Iso (n=10) - isoflurano, durante o experimento.....	50
Tabela 4	Média e desvio-padrão referente à creatinina segundo momentos (P0 = início, P30 = 30 minutos e P60 = 60 minutos) e grupos: Sham (n=10); IP (n=10) - isoflurano, durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão; IRP (n=10) - isoflurano e remifentanil durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão e Iso (n=10) - isoflurano, durante o experimento.....	51
Tabela 5	Mediana, 1º e 3º quartis, entre colchetes, referentes aos escores de patologia segundo grupos: Sham (n=10); IP (n=10) - isoflurano, durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão; IRP (n=10) - isoflurano e remifentanil durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão e Iso (n=10) - isoflurano, durante o experimento.....	52
Tabela 6	Mediana, 1º e 3º quartis, entre colchetes, referentes à citometria de fluxo segundo os grupos: Sham (n=10); IP (n=10) - isoflurano, durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão; IRP (n=10) - isoflurano e remifentanil durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão e Iso (n=10) – isoflurano, durante o experimento.....	55
Tabela 7	Mediana, 1º e 3º quartis, entre colchetes, referentes à citometria de fluxo segundo os grupos: Sham (n=10); IP (n=10) - isoflurano, durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão; IRP (n=10) - isoflurano e remifentanil durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão e Iso (n=10) – isoflurano durante o experimento.....	56

Tabela 8	Mediana, 1º e 3º quartis, entre colchetes, referentes à citometria de fluxo – apoptose avançada, segundo os grupos: Sham (n=10); IP (n=10) - isoflurano, durante o experimento e 90 minutos pós-reperusão; IRP (n=10) - isoflurano e remifentanil durante o experimento e 90 minutos pós-reperusão e Iso (n=10) - isoflurano, durante o experimento.....	57
Tabela 9	Mediana, 1º e 3º quartis, entre colchetes, referentes à citometria de fluxo – células viáveis segundo os grupos: Sham (n=10); IP (n=10) - isoflurano, durante o experimento e 90 minutos pós-reperusão; IRP (n=10) - isoflurano e remifentanil durante o experimento e 90 minutos pós-reperusão e Iso (n=10) – isoflurano durante o experimento.....	58

Lista de Figuras

Figura 1	Esquema de lesão, reparação celular e apoptose.....	19
Figura 2	Mecanismo celular do pré-condicionamento isquêmico.....	22
Figura 3	Períodos de pré-condicionamento: precoce e tardio	23
Figura 4	Mostra dos mecanismos moduladores inflamatórios relacionados ao pré-condicionamento precoce	24
Figura 5	Mostra dos mecanismos moduladores inflamatórios relacionados ao pré-condicionamento tardio	25
Figura 6	Esquema do mecanismo de ação dos anestésicos voláteis no PCI.	27
Figura 7	Esquema da atuação dos opióides na PCI.....	29
Figura 8	Rato na campânula com isoflurano na concentração de 4%.....	33
Figura 9	Rato durante o experimento, monitorizado, ventilado mecanicamente e hidratado com infusão de Ringer lactato com auxílio da bomba Harvard.....	34
Figura 10	Rato durante o experimento, com monitorização.....	34
Figura 11	Monitor utilizado durante o experimento para avaliação da frequência e ritmo cardíaco, capnografia das curvas de pressão arterial, pressão venosa central e oximetria digital.....	35
Figura 12	Artéria renal esquerda dissecada e isolada pronta para ser clampeada.....	40
Figura 13	Rato após a extubação traqueal aguardando o período de 24 horas para o momento 3 (M3).....	40
Figura 14	Metodologia da pesquisa e tempos dos grupos.....	43
Figura 15	Exemplos de resultados da citometria de fluxo.....	47
Figura 16	Necrose tubular discreta (grau 1) rato do grupo IRP.....	52
Figura 17	Necrose intensa (grau 3) em rato do grupo IRP.....	52
Figura 18	Necrose tubular intensa com presença de cilindros em rato do grupo Iso.....	53
Figura 19	Mecanismo celular do pré-condicionamento por anestésico voláteis.....	62

Lista de Gráficos

Gráfico 1	Média e desvio-padrão referente à PAM (mm Hg) segundo momentos e grupos.....	49
Gráfico 2	Média e desvio-padrão referente à creatinina segundo momentos e grupos.....	51
Gráfico 3	<i>Box plot</i> da necrose tubular segundo os Grupos.....	52
Gráfico 4	<i>Box Plot</i> da Citometria de fluxo. ANEXINA V - apoptose precoce dos grupos estudados.....	55
Gráfico 5	<i>Box Plot</i> da Citometria de fluxo. PI = Necrose - membrana degradada dos grupos estudado.....	56
Gráfico 6	<i>Box Plot</i> da Citometria de fluxo. ANEXINA + PI: = apoptose avançada dos grupos estudados.....	57
Gráfico 7	<i>Box Plot</i> das células viáveis dos grupos estudados.....	58

1 Introdução

A insuficiência renal intra ou pós-operatória é grande causa de mortalidade e tem alta morbidade por isso, evitar a insuficiência renal perioperatória é fator importante para o sucesso de um procedimento cirúrgico. Nas cirurgias de grande porte, sobretudo a cirurgia cardíaca, sua morbidade e letalidade são elevadas.

Segundo Rosner & Okusa¹, estima-se que até 30% dos pacientes submetidos à cirurgia cardíaca, têm lesão renal, sendo que dependendo da definição esse número pode ser bem maior e 1% destes pacientes necessitam de diálise. Ao avaliar a morbidade e a mortalidade relacionados à lesão renal aguda (LRA) pós-operatória em cirurgia cardíaca, Karkouti et al.² conseguiram associar ao grau de lesão renal (avaliada pelo ritmo de filtração glomerular = RFG) a um maior tempo de internação hospitalar e mortalidade. Para decréscimos de até 25% no RFG a média de dias internados foi sete dias e a mortalidade de 1%. Para reduções do RFG maior que 25%, o tempo de internação médio foi de 10 dias e a mortalidade elevou-se para 10%. Quando a redução do RFG é maior do que 50% este tempo médio de internação foi para 14 dias e a mortalidade para 25%. Ocorrendo redução do RFG ainda maior, ou seja, além de 75% este tempo de internação elevou-se para 19 dias e a mortalidade para 46%.

Nas cirurgias não cardíacas a incidência de LRA varia de 1% a 5% dos pacientes hospitalizados^{3,4}. Segundo Abelha et al.⁴, a incidência de LRA aumentou para 7,5% quando os pacientes necessitaram dos cuidados da Unidade de Terapia Intensiva (UTI), no pós-operatório. Por este motivo

a proteção renal durante o perioperatório é um fator importante para o sucesso do procedimento cirúrgico.

Vários mecanismos vêm sendo pesquisados para diminuir a ocorrência de complicações renais no intra ou no pós-operatório. A reposição volêmica correta e monitorização dessa volemia tem sido um dos grandes desafios da medicina perioperatória. Alguns estudos vêm sendo realizados na tentativa de descobrir quais são os fatores preditivos para os pacientes desenvolverem lesão renal no intra ou no pós-operatório. Uma vez melhor identificada essa população poderemos tratá-la com reposição volêmica mais “agressiva”, acompanhada de adequada monitorização para redução da ocorrência de lesão renal. Em cirurgia cardíaca, Heise et al.⁵ e Karkouti et al.², determinaram que os fatores de risco para LRA peri ou pós-operatória eram insuficiência renal pré-operatória, anemia pré-operatória, necessidade de transfusão de hemácias durante o ato cirúrgico, *diabetes mellitus*, uso de balão intra-aórtico pós-cirurgia e longo tempo de circulação extra-corporea. Em cirurgia não cardíaca Kheterpal et al.³ mostraram que os pacientes eram mais suscetíveis a LRA peri e pós-operatória quando apresentavam os seguintes fatores de risco: idade acima de 59 anos, índice de massa corporal acima de 32, cirurgia de alto risco, cirurgia de emergência, doença hepática, doença pulmonar obstrutiva e uso de broncodilatador e doença oclusiva vascular periférica. Os fatores intra-operatórios foram: a necessidade e a dose de vasopressor e a utilização de diuréticos.

A proteção de órgãos sofreu enorme impacto quando, em 1984, Zager et al.⁶ relataram a existência de mecanismo de proteção à isquemia renal que era desconhecido e o qual eles não sabiam explicar.

Dois anos depois, em 1986, Murry et al.⁷ observaram que breve lesão isquêmica do coração condicionaria este órgão a ficar mais bem adaptado a

sofrer outra lesão isquêmica mais intensa. Este mecanismo de proteção a isquemia cardíaca, foi denominado pré-condicionamento isquêmico (PCI).

Desde então, muito vem sendo estudado sobre pré-condicionamento, lesão de isquemia-reperfusão (IR) e os mecanismos de proteção contra os danos causados pela reperfusão.

Existem estudos sobre o efeito desse fenômeno em vários órgãos, sendo o coração o órgão mais estudado, e nele foram descobertos os mecanismos fisiológicos, os mediadores e os receptores envolvidos neste fenômeno e até atribuído o conceito de pré-condicionamento à distância⁸.

Várias técnicas vêm sendo estudadas para introduzir o pré-condicionamento na clínica, entretanto, uma das maiores controvérsias é saber se o pré-condicionamento poderá ser usado na clínica.

Dentre as técnicas utilizadas para se conseguir o pré-condicionamento, a primeira foi a mecânica (clampeamento intermitente de artéria pré-isquemia), depois foi introduzido o pré-condicionamento farmacológico com a utilização de fármacos que mimetizam o PCI. Nestes fármacos estão incluídos os anestésicos inalatórios e os opióides.

Em 1997, Cason et al.⁹ e Kersten et al.¹⁰ foram os primeiros a relacionar os anestésicos voláteis ao pré-condicionamento. Estes fármacos foram capazes de reduzir em cobaias a área de infarto do coração expostos a isquemia e reperfusão.

O isoflurano¹¹⁻¹³ e o remifentanil¹⁴⁻¹⁷ usados isoladamente já foram descritos na literatura como fármacos capazes de causar pré-condicionamento farmacológico. Estudo realizado no rim¹³ mostrou que o isoflurano causava melhor proteção renal quando a anestesia era mantida duas horas após a reperfusão.

Para a realização de uma anestesia geral são usados fármacos hipnóticos como o anestésico inalatório isoflurano, associado ao analgésico

opióide sendo o remifentanil um dos mais empregados na prática clínica. Desse modo, resolveu-se estudar o possível efeito protetor renal do isoflurano e da associação do mesmo com o remifentanil mantido em 90 minutos de reperfusão.

1.1 Pré-condicionamento (PCI)

1.1.1 Definição

Murry et al.⁷, em 1986, foram os primeiros a descrever o fenômeno, em coração de cães, observando que “curtos períodos de isquemia podem proteger o miocárdio da agressão por uma isquemia sustentada subsequente”. Neste estudo os autores relatam o envolvimento da reperfusão no mecanismo de agressão e o provável mecanismo de depleção de ATP relacionado com a adenosina.

Mais de 20 anos depois, Tapuria et al.⁸ definiu da seguinte forma o fenômeno: “Estratégias protetoras foram desenvolvidas para proteção dos órgãos da lesão por isquemia e reperfusão que se define como pré-condicionamento orgânico”.

Após adaptação de vários estudos finalmente ficou definido como:

“É o fenômeno adaptativo a curtos períodos de isquemia, que irá proteger contra uma isquemia subsequente, diminuindo a lesão causada pela isquemia e pela reperfusão, podendo ter como gatilho estímulos mecânicos ou farmacológicos”.

Neste intervalo entre os estudos de Murry et al.⁷ e o de Tapuria et al.⁸, foi relatado que o pré-condicionamento pode ser local ou à distância, isto é,

um estímulo pré-condicionante em um órgão pode proteger outro isquêmico que não sofreu o estímulo pré-condicionante diretamente⁸⁻²⁰.

Outra importante descoberta foi que a proteção causada pelo pré-condicionamento, pode ser precoce ou “clássico”, mas, também existe outra janela de proteção que seria a tardia ou segunda janela.

1.1.2 Fisiologia

Durante o período de isquemia as células evoluem para reparação celular ou para apoptose e necrose. Podendo ocorrer conforme a figura 1.

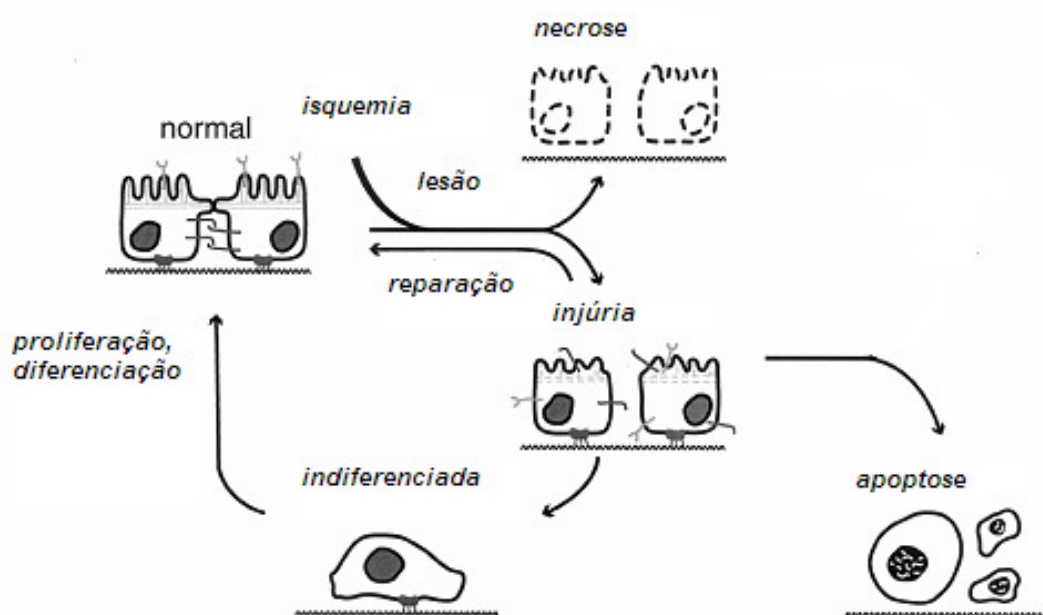


Figura 1 – Esquema de lesão, reparação celular e apoptose (Adaptado de Liu²¹).

O mecanismo do pré-condicionamento atua no período de lesão retardando ou evitando a lesão para apoptose. Nesse esquema, adaptado de Liu²¹, pode-se entender em que fase da lesão celular ela ocorre. Em

isquemia prolongada a célula evolui direto para necrose, porém após um período curto de isquemia (cada célula terá seu tempo para definir como curto, tendo células mais resistentes e células mais suscetíveis a isquemia) ela evolui para lesão, em geral reversível, lançando mecanismos protetores e não evoluindo para apoptose.

Os estudos de Chien et al., em 1999 e 2000^{22,23} demonstraram como o pré-condicionamento isquêmico inibe a apoptose.

O mecanismo celular exato do pré-condicionamento ainda não está completamente elucidado.

Alguns receptores da membrana celular são ativados por estímulos como opióides, noradrenalina, adenosina, bradicinina, anestésicos voláteis entre outros. Estes receptores ativam uma cascata reacional que através de segundos mensageiros se acoplam a proteína G, tendo como ponto final a ativação da proteína cinase C.

A proteína cinase C tem papel fundamental neste mecanismo sendo responsável pela ativação de vias de sinais intracelulares que irão resultar na abertura de canais de potássio do sarcolema e da mitocôndria responsáveis pela despolarização da membrana mitocondrial, evitando um influxo de cálcio na reperfusão e também auxiliando na fosforilação oxidativa.

A proteína cinase C também é responsável pela ativação do núcleo celular, levando a transcrição de proteínas cinases citoprotetoras e de enzimas que irão ajudar a abertura dos canais de potássio da mitocôndria e do sarcolema.

Nesse mecanismo o papel do óxido nítrico, das proteínas do choque e da cicloxigenase-2 são fundamentais.

Vários são os segundos mensageiros e mediadores inflamatórios que são liberados visando manter a homeostase celular, evitando a lesão do

citoesqueleto, diminuindo a produção de espécies reativas do oxigênio (responsáveis pela lesão de reperfusão), evitando também um hiperfluxo de cálcio na mitocôndria e, em último estágio, evitando o gatilho dos eventos que culminarão com apoptose.

Por termos tantos mediadores e segundo mensageiros envolvidos, inúmeras são as possibilidades de interação, desde o acoplamento na membrana celular, até estimulação de transcrição de proteínas no núcleo, a abertura de canais de potássio mitocondriais e mecanismos de proteção ainda não elucidados.

A adenosina parece ser o gatilho que dispara esta cascata de estímulos a partir de receptores da membrana celular, sendo o uso de agonistas do receptor A_1 ²⁴⁻²⁵ capazes de realizar o PC (pré-condicionamento). Antagonistas da adenosina parecem bloquear o estímulo para a ativação do PC²⁶.

Assim como, inibidores da captação de adenosina como dipiridamol parecem ter efeito pré-condicionante²⁷.

Outro mediador importante é o óxido nítrico, tendo várias áreas de atuação no PC, sendo vasodilatador, inibindo a adesão e a migração de macrófagos e neutrófilos inflamatórios além de ser importante no mecanismo de proteção tardia.

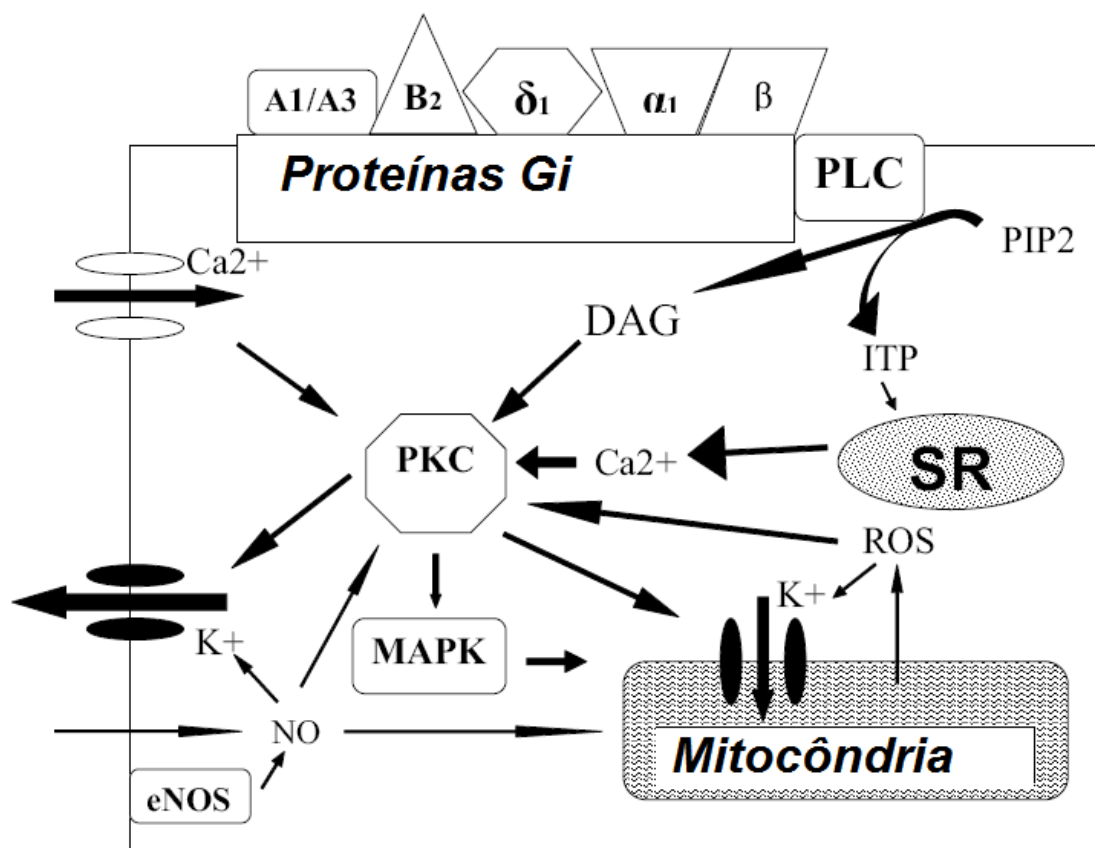


Figura 2 - Mecanismo celular do pré-condicionamento isquêmico; ativação dos receptores de adenosina A₁ e A₃ (A1/A3), bradicinina (B₂), δ₁ opióide (δ₁), α₁-adrenérgico (α₁) e β-adrenérgico estimulam a fosfolipase c (PLC) através da inibição do nucleotídeo de guanina ligado a proteínas (proteína Gi). PLC produz diacilglicerol (DAG) e 1,4,5 trifosfato de inositol (ITP) (Adaptada de Lorsonradee et al.¹²).

Ambos DAG e ITP ativam a proteína cinase C (PKC). PKC atua abrindo canais de potássio sensíveis a ATP (canais K_{atp}) e provavelmente via mitogenio-ativadas proteínas cinases (MAPK). NO -> óxido nítrico, NOS -> óxido nítrico sintetase, PIP₂ -> bifosfato de fosfatidilinositol, ROS-> espécies reativas do oxigênio e SR – retículo sarcoplasmático.

1.1.3 Pré-condicionamento precoce e tardio

Se dividirmos o pré-condicionamento em duas fases, sendo a primeira a precoce, que se instala poucos minutos após a agressão isquêmica podendo se manter por cerca de 3 a 4 horas, e a outra, a tardia, que começa cerca de 24 horas depois, relacionada com mecanismos fisiológicos diferentes.

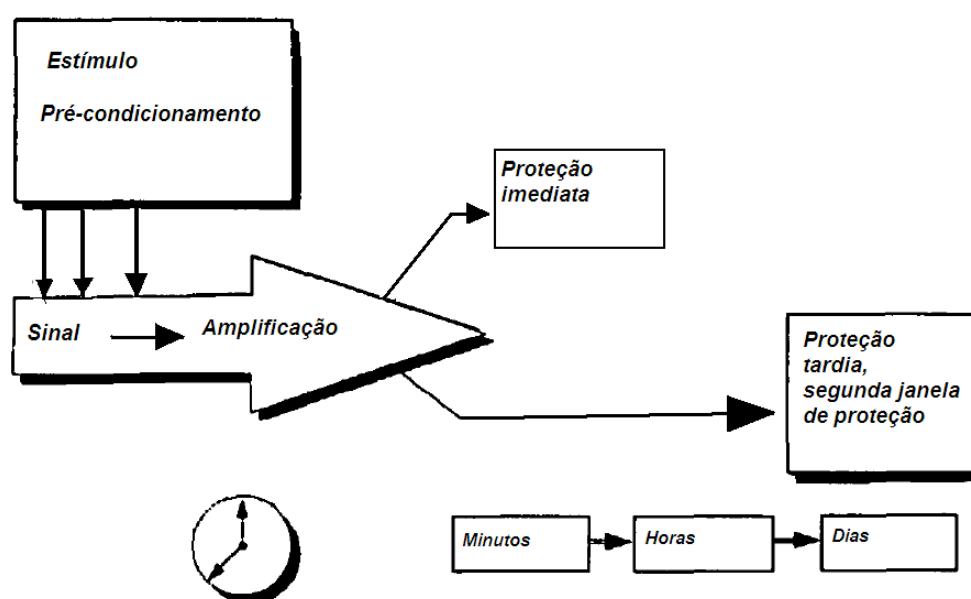


Figura 3 - Períodos de pré-condicionamento: precoce e tardio (Adaptado de Hawaleshka & Jacobsohn²⁸)

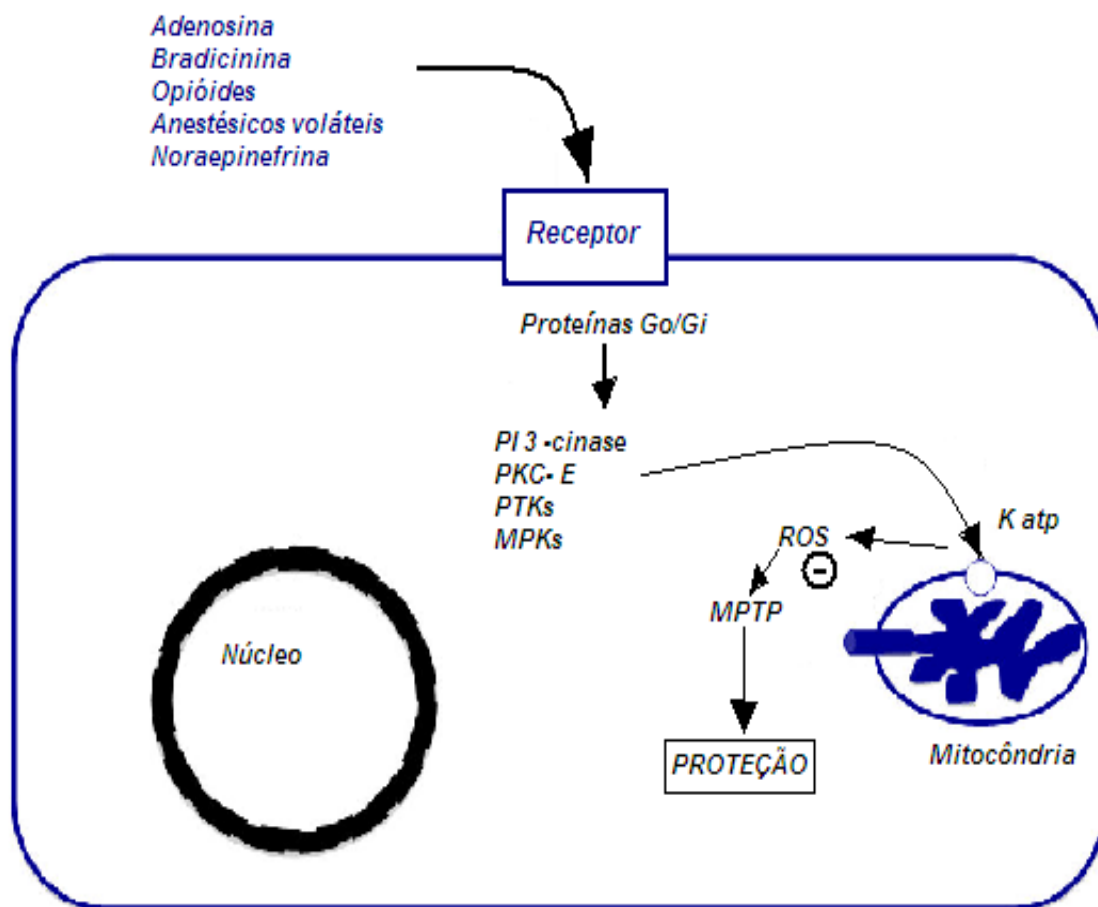


Figura 4 - Mostra dos mecanismos moduladores inflamatórios relacionados ao pré-condicionamento precoce (Adaptado de Ricksen et al.²⁹).

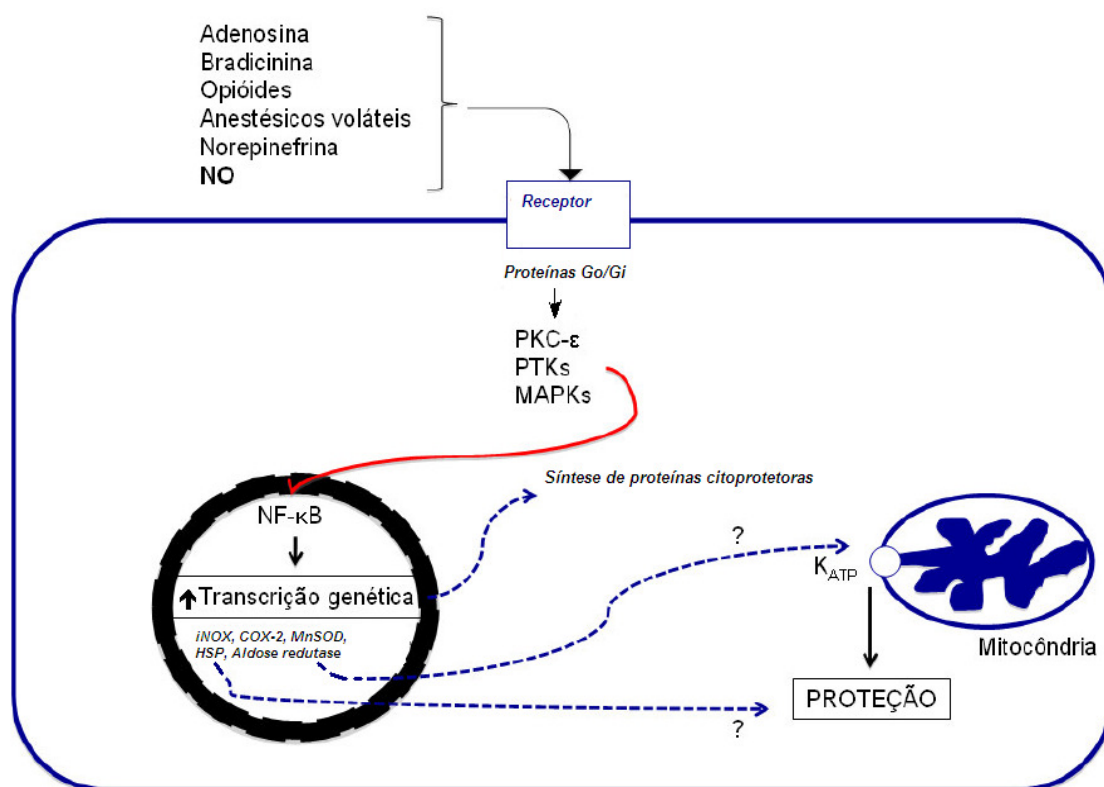


Figura 5 – Mostra dos mecanismos moduladores inflamatórios relacionados ao pré-condicionamento tardio. É muito importante se relacionar a função do núcleo celular no mecanismo antes feito somente pelas mitocôndrias. Jefayri et al.³¹ relatou a importância do óxido nítrico como mediador da proteção tardia. Joo et al.³² descreve como principal diferença dos mecanismos de pré-condicionamento, a utilização do óxido nítrico como mediador e a importância do “up regulation” do óxido nítrico sintetase causada pelo pré-condicionamento (Adaptado de Ricksen et al.³⁰).

1.1.4 Pré-condicionamento nos diferentes órgãos

Vários são os órgãos no quais já foram realizados experimentos com PC.

O coração, sem dúvida, é o mais estudado sendo o conceito de pré-condicionamento descrito pela primeira vez justamente neste órgão⁷.

Desde então, muitos trabalhos vêm demonstrando a sua capacidade para PC tanto isquêmico como farmacológico e de provocar e receber pré-condicionamento à distância^{8,18, 29}.

Nesta década, o rim começou a ser mais pesquisado em relação ao PC tendo também vários trabalhos sobre esta capacidade de PC e sobre este assunto existem várias pesquisas³³⁻³⁶

Há também pesquisas sobre PC no fígado^{37,38} e no cérebro^{39,40}.

1.1.5 Pré-condicionamento e anestesia

Há várias perguntas feitas com relação ao pré-condicionamento, entre elas:

- 1 Como poderemos obter esses efeitos nos pacientes?
- 2 Fármacos utilizados durante a anestesia podem causar efeito protetor renal após a lesão por isquemia-reperfusão (IR)?

A resposta parece ser sim, pois um dos principais causadores do PC farmacológico são os anestésicos inalatórios¹¹⁻¹³, que estão sendo bastante pesquisados com boas respostas tanto no coração como no rim.

De Hert et al.¹¹ propuseram um mecanismo bastante complexo na via de atuação dos anestésicos inalatórios para o mecanismo de PC (Figura 6).

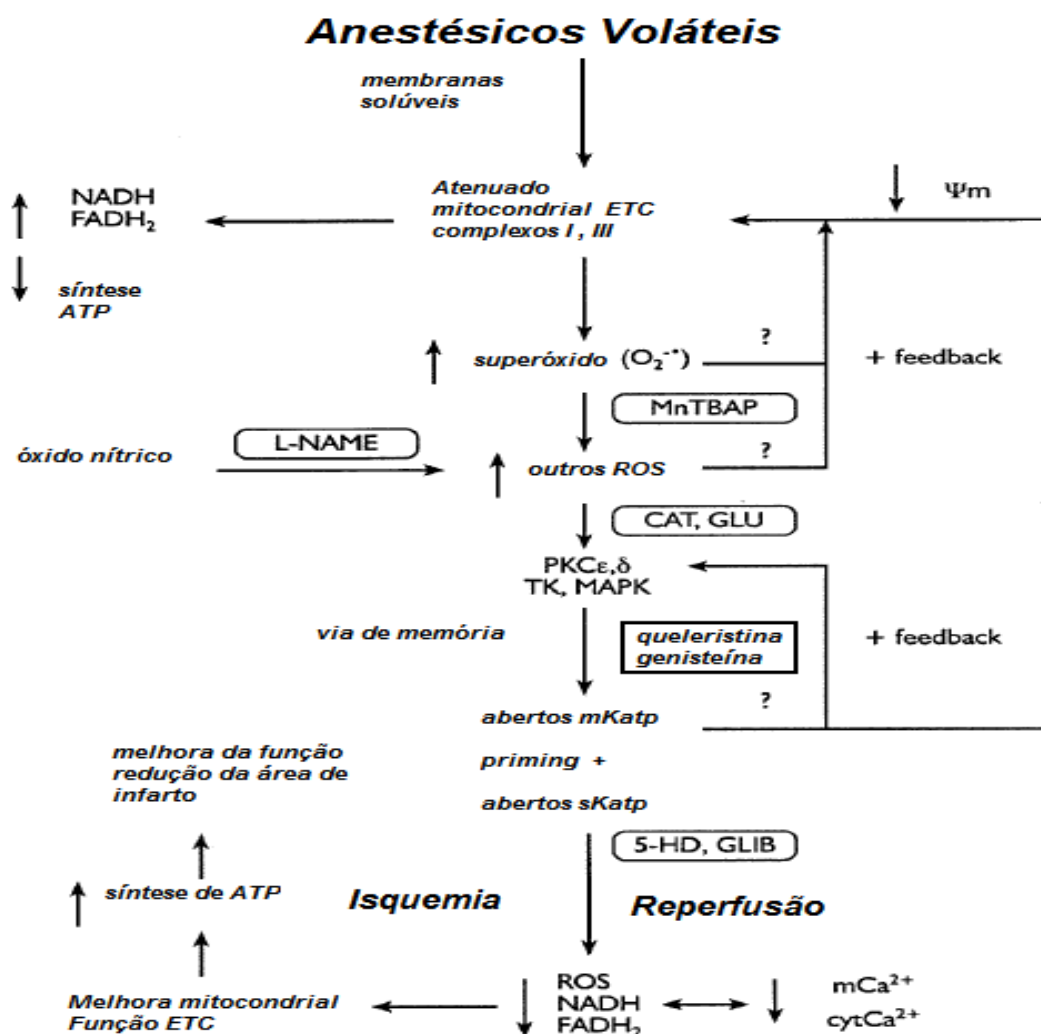


Figura 6 - Esquema do mecanismo de ação dos anestésicos voláteis no PCI segundo De Hert et al.¹¹.

Onde:

5 HD – ácido 5 hidroxidecanoico

δ ψ m - ícones de potencial de membrana mitocondrial

NADH – dinucleotídeo de adenina nicotinamida reduzida

FADH 2 – Flavina adenina nicotinamida reduzida

ETC - cadeia de transporte de elétrons **GLI** – glibenclamida

L -name – L nitroargininametilester (inibidor de óxido nítrico sintetase)

MnTBAP – dismutases (convertem H₂O₂ em OH)

GLU – Glutathione reduzida **TK** - Tirosina Cinase

MAPK – mitogenio ativada proteína cinase

PKC ε , δ - Isoformas da proteína cinase C

Os opióides também parecem ser capazes de causar pré-condicionamento cardíaco^{18, 17}.

Kuzume et al.¹⁵ demonstraram, no coração, que o remifentanil diminui a área de infarto se comparado com a anestesia com propofol.

Yu et al.¹⁶ observaram que o remifentanil conferia cardioproteção no episódio de isquemia tanto no período precoce, quanto no tardio.

Zaugg et al.⁴¹ propuseram o seguinte esquema para atuação dos opióides no PC precoce e tardia (Figura 7).

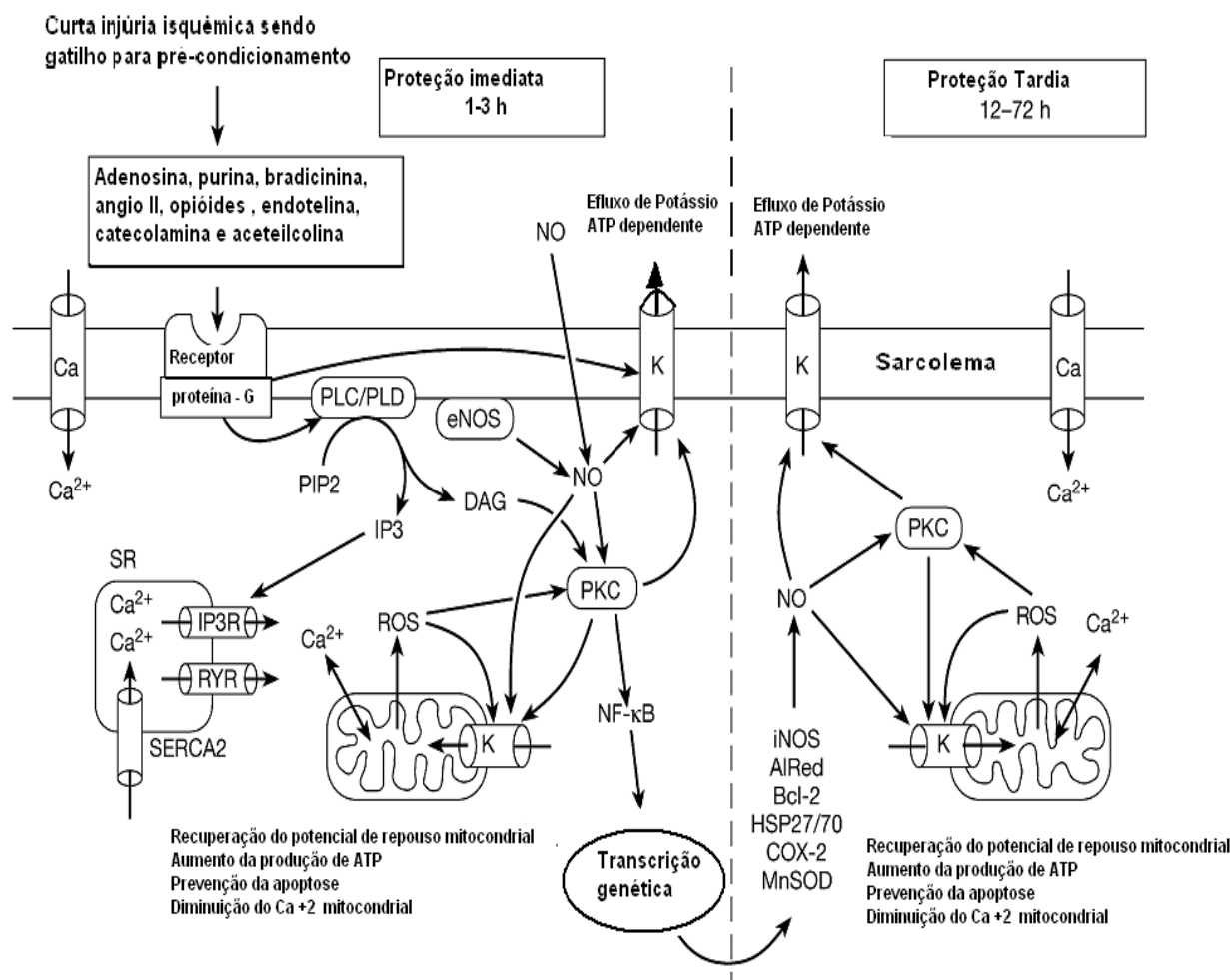


Figura 7 – Esquema da atuação dos opióides na PCI segundo Zaugg et al.⁴¹

Onde:

$\Delta\psi_m$ -> potencial de membrana mitocondrial; AlRed -> Aldose reductase; Bcl -2 -> anti-apoptotic protein; Ca -> canais de cálcio do sarcolema voltagem dependente; DAG -> diacilglicerol; COX 2 -> ciclooxigenase tipo 2; eNOS -> NO sintetase endotelial ; HSP 27 e HSP 70 -> proteínas de choque quente; iNOS-> NOS sintetase induzidas; IP3 -> trifosfato inositol ; IP3R-> receptor de trifosfato inositol; K-> canais de potássio do sarcolema e mitocondrial ; MnSOD -> superóxido magnésio dismutase ; NF-KB -> Fator nuclear KB ; NO -> óxido nítrico ; PIP2 -> bifosfato Fosfatidilinositol ; PKC -> proteína cinase C ; PLC/PLD -> fosfolipases C e D ; ROS -> espécies reativas do oxigênio; RyR -> canal de cálcio aberto por rianodina ; SERCA2 -> bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático ; SR -> Retículo sarcoplasmático.

Kim et al.⁴² demonstraram que o remifentanil consegue PC em diferentes formas de infusão, tanto pré, como durante e pós-isquemia, além de atuar em vias bloqueando a apoptose.

Ludwig et al.⁴³ utilizando a associação inalatórios e opióides conseguiram diminuir a área de infarto cardíaco em ratos após isquemia e reperfusão. Nesta mesma pesquisa, compararam um grupo que utilizava morfina com outro que utilizava a droga associada ao isoflurano e concluíram que a associação morfina e isoflurano foi capaz de reduzir mais a área de infarto no coração do que os outros Grupos que foram anestesiados com opióide ou com isoflurano.

Lee et al.¹³ relataram que o uso dos anestésicos inalatórios produziu maior proteção renal do que o pentobarbital ou a cetamina utilizados como anestésicos, mostraram também que para existir proteção renal seria necessário manter o uso do anestésico durante e após a isquemia-reperfusão.

2 Objetivo

O objetivo desta pesquisa foi comparar a proteção renal com isoflurano mantido durante a isquemia renal e a anestesia prolongada 90 minutos após a reperfusão, usando isoflurano e a associação isoflurano e remifentanil. Para obtenção desta resposta utilizou-se modelo de isquemia-reperfusão renal em rato.

3 Materiais e Métodos

Foram utilizados 40 ratos machos, da raça Wistar, pesando entre 340 e 500 gramas e distribuídos aleatoriamente em 4 Grupos.

- **Grupo Sham** (n=10).
- **Grupo IP** (n=10) - Isoflurano usado durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão
- **Grupo IRP** (n=10) - Isoflurano e remifentanil usados durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão
- **Grupo Iso** (n=10) - Isoflurano usado até o início da reperfusão

Todos os animais foram submetidos à intubação orotraqueal e ventilados mecanicamente com Ventilador Rodent Ventilator, model 683, da Harvard Apparatus.

A anestesia inalatória e o uso do oxigênio foram feitos usando o aparelho de anestesia Ohmeda, Excel 210 SE e o vaporizador calibrado Isotec 5, Ohmeda.

A pressão arterial média (PAM), a pressão venosa central (PVC), a capnografia, a oximetria digital e a cardioscopia foram monitorizados por meio do monitor Datex Engstrom. Os ratos tiveram temperatura retal mantidas entre 36 e 38° Celsius com auxílio de bolsas térmicas.

Os atributos foram anotados em protocolo individual para cada animal com intervalo de 15 minutos (PAM, temperatura retal, saturação de oxigênio).

Os procedimentos foram realizados pelo mesmo pesquisador.

A pesquisa obedeceu ao seguinte protocolo:

Os ratos foram anestesiados em recipiente fechado com fluxo de oxigênio de 2 litros por minuto e isoflurano na concentração de 4% durante cinco a dez minutos até perderem a consciência (Figura 8).

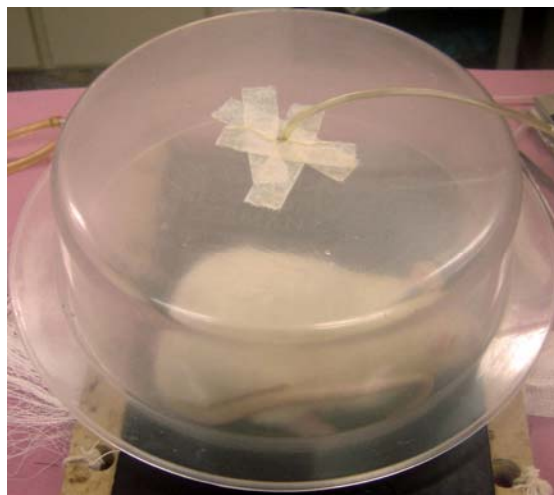


Figura 8 – Animal na campânula com isoflurano na concentração de 4%. Após inconsciência os ratos foram submetidos à intubação orotraqueal, colocados em ventilação mecânica com volume corrente variando entre 1,5 a 2,5 ml e com a frequência respiratória variando entre 60 a 90 incursões por minuto (inc/min).

A manutenção da anestesia foi obtida com isoflurano na concentração de 1,5% a 3% com fluxo de oxigênio a 0,4 litros por minutos. A veia jugular interna foi dissecada iniciando uma hidratação de 3 mL/h de solução de Ringer lactato injetados com auxílio da bomba de infusão Harvard Pump 22, via endovenosa (Figura 9). Após este procedimento foi dissecada a artéria carótida esquerda para monitorização de pressão arterial média (PAM) e a coleta de sangue arterial (1 mL) para análise do hematócrito e a dosagem sérica de creatinina sérica. A primeira dosagem foi feita no início do experimento denominando-se de momento um (M1). Após a coleta de sangue arterial, houve reposição com 2 mL de solução de Ringer lactato pela via venosa. As gasometrias arteriais foram feitas aleatoriamente para descartar distúrbios de ventilação.



Figura 9 –Rato durante o experimento, monitorizado, ventilado mecanicamente e hidratado com infusão de Ringer lactato com auxílio da bomba Harvard. Foi usada bolsa térmica para manutenção da temperatura corporal entre 36° e 38° C.

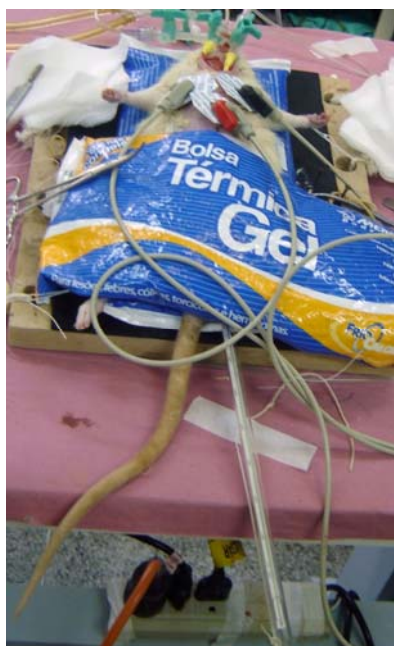


Figura 10 – Rato durante o experimento, com monitorização.



Figura 11 - Monitor utilizado durante o experimento para avaliação da frequência e ritmo cardíaco, capnografia das curvas de pressão arterial, pressão venosa central e oximetria digital. A curva de oximetria digital alterava com grande frequência por diminuição da temperatura corporal do rato e próximo de 36°C de temperatura retal a curva do oxímetro desaparecia.

3.1 Sequência Experimental

Após a monitorização e coleta de sangue os animais foram sorteados e alocados nos seguintes Grupos:

3.1.1 Grupo Sham

1. Indução da anestesia com isoflurano a 4% sob campânula e ventilação espontânea durante 5 minutos.
2. Intubação traqueal e instalação da ventilação controlada.
3. Anestesia mantida com isoflurano na concentração inspirada entre 1,5% e 3,0% durante todo experimento (a concentração do anestésico foi determinada pelo vaporizador calibrado do aparelho de anestesia Datex-Ohmeda e pelo analisador de gás do mesmo aparelho, sendo feito em todos os grupos: Sham, IP,IRP e Iso da mesma forma).

4. Dissecção à esquerda da artéria carótida interna e da veia jugular interna.
5. Coleta da primeira amostra de sangue arterial (1 mL) para hematócrito e dosagem de creatinina sérica (M1). Após a coleta de sangue foi feita a reposição volêmica com o bolus de 2 mL de solução de Ringer lactato pela via endovenosa.
6. Hidratação com solução de Ringer lactato 3 mL/h por via endovenosa.
7. Laparotomia e nefrectomia à direita.
8. Fechamento de peritônio e parede abdominal.
9. Infiltração da ferida operatória com bupivacaína 0,2% na quantidade de 0,4 mL
10. No final da pesquisa, coleta da segunda amostra de sangue arterial (1 mL) para medida do hematócrito e dosagem de creatinina sérica (M2). Após a coleta foi feita a reposição volêmica com o bolus de 2 mL de solução de Ringer lactato pela via endovenosa.
11. Retirada dos cateteres, ligando-se a carótida e a jugular interna esquerda.
12. Interrupção do anestésico inalatório.
13. Aspiração de vias aéreas e extubação retornando o animal para a gaiola com água e alimento ofertados livremente.
14. 24 horas após o termino do procedimento os ratos foram novamente anestesiados com isoflurano a 4% sob campânula e ventilação espontânea, sendo colhida nova amostra de sangue (M3) para análise de hematócrito e dosagem de creatinina sérica.
15. Laparotomia e nefrectomia do rim esquerdo que foi usado para exame histológico e citometria de fluxo.
16. Sacrifício do animal com injeção intracardíaca de 10 mL de tiopental sódico na concentração de 2,5%.

3.1.2 Grupo IP

1. Indução da anestesia com isoflurano a 4% sob campânula e ventilação espontânea durante 5 minutos.
2. Intubação traqueal e instalação da ventilação controlada
3. Dissecção à esquerda da artéria carótida interna e da veia jugular interna.
4. Coleta da primeira amostra de sangue arterial (1 mL) para a medida do hematócrito e dosagem de creatinina sérica (M1). Após a coleta de sangue foi feita reposição volêmica com o bolus de 2 mL de solução de Ringer lactato pela via endovenosa.
5. Hidratação com solução de Ringer lactato 3 mL/h por via endovenosa.
6. Anestesia mantida com isoflurano entre 1,5% e 3% durante o experimento e 90 minutos após a reperfusão.
7. Laparotomia e nefrectomia à direita.
8. Após 30 minutos, dissecção da artéria renal a esquerda e clampeamento total da artéria durante 45 minutos.
9. Após o desclampeamento arterial, coleta 1 mL de sangue arterial (M2) para medida do hematócrito e da dosagem de creatinina sérica. (com esta amostra de sangue foi feita aleatoriamente a gasometria arterial. Após a coleta de sangue foi feita reposição volêmica com o bolus de 2 mL de solução de Ringer lactato pela via endovenosa.
10. Fechamento do peritônio e da parede abdominal.
11. Infiltração da ferida operatória com bupivacaína 0,2% na quantidade de 0,4 mL.
12. Retirada dos cateteres, ligando-se a carótida interna esquerda e a jugular interna esquerda.
13. Interrupção do anestésico inalatório 90 minutos após a reperfusão.

14. Aspiração de vias aéreas e extubação traqueal retornando o animal para a gaiola com água e alimento ofertados livremente.
15. 24 horas após o termino do procedimento os ratos foram novamente anestesiados com isoflurano a 4% sob campânula e ventilação espontânea, sendo colhida nova amostra de sangue, momento três (M3) para análise de hematócrito e dosagem de creatinina sérica.
16. Nefrectomia do rim esquerdo para exame histológico e citometria de fluxo.
17. Sacrifício do animal com injeção de 10 mL de tiopental sódico na concentração de 2,5% por via intracardíaca.

3.1.3 Grupo IRP

1. Indução da anestesia com isoflurano a 4% sob campânula e ventilação espontânea durante 5 minutos.
2. Intubação traqueal e instalação da ventilação controlada.
3. Dissecção à esquerda da artéria carótida interna e da veia jugular interna.
4. Coleta da primeira amostra de sangue arterial (1 mL) para hematócrito e dosagem de creatinina sérica (M1). Após a coleta foi feita reposição volêmica com o bolus de 2 mL de solução de Ringer lactato pela via endovenosa.
5. Anestesia mantida com isoflurano entre 1,5% e 3% associado ao remifentanil em infusão contínua $2 \mu\text{g kg}^{-1}\text{min}^{-1}$ pela via endovenosa durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão. O remifentanil foi diluído na seringa de hidratação sendo feito o cálculo para que o volume ofertado (3 mL/h) para esse grupo fosse igual aos dos demais animais.

6. Laparotomia e nefrectomia à direita.
7. Após 30 minutos, dissecação da artéria renal esquerda (Figura 12) e clampeamento total desta artéria, durante 45 minutos.
8. Após o desclampeamento arterial, coleta 1 mL de sangue arterial (M2) para medida do hematócrito e da dosagem de creatinina sérica. Com esta amostra de sangue foi feita aleatoriamente a gasometria arterial. Após a coleta de sangue foi feita reposição volemica com o bolus de 2 mL de solução de Ringer lactato pela via endovenosa.
9. Fechamento do peritônio e da parede abdominal.
10. Infiltração da ferida operatória com bupivacaína 0,2% na quantidade de 0,4 mL.
11. Retirada dos cateteres, ligando-se a carótida e a jugular interna esquerda.
12. Interrupção do anestésico inalatório e da infusão de remifentanil 90 minutos após a reperfusão.
13. Aspiração de vias aéreas e extubação traqueal retornando o animal para a gaiola com água e alimento ofertados livremente (Figura 13).
14. 24 horas após o termino do procedimento os ratos foram novamente anestesiados com isoflurano a 4% sob campânula e ventilação espontânea, sendo colhida nova amostra de sangue, momento três (M3) para análise de hematócrito e dosagem de creatinina sérica.
15. Nefrectomia do rim esquerdo para exame histológico e citometria de fluxo.
16. Sacrifício do animal com injeção de 10 mL de tiopental sódico na concentração de 2,5% por via intracardíaca.

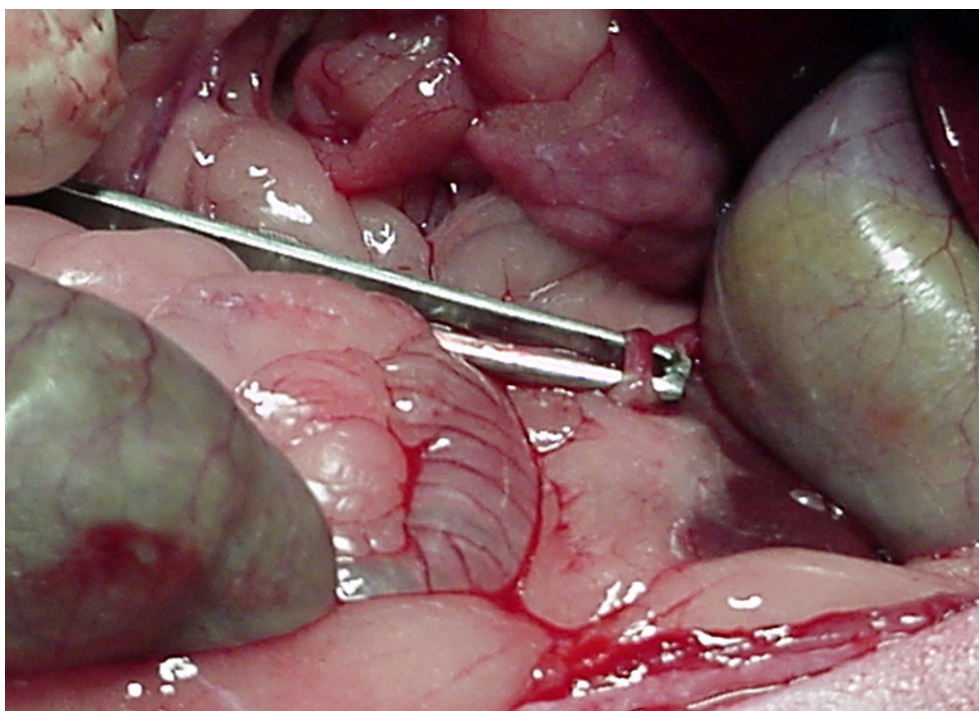


Figura 12 – Artéria renal esquerda dissecada e isolada pronta para ser clampeada.



Figura 13– Animal após a extubação traqueal aguardando o período de 24 horas para o momento 3 (M3).

3.1.4 Grupo Iso

1. Indução da anestesia com isoflurano a 4% sob campânula e ventilação espontânea durante 5 minutos.
2. Intubação traqueal e instalação da ventilação controlada.
3. Anestesia mantida com isoflurano na concentração inspirada entre 1,5% e 3,0% durante todo o experimento.
4. Dissecção à esquerda da artéria carótida interna e da veia jugular interna.
5. Coleta da primeira amostra de sangue arterial (1 mL) para a medida do hematócrito e dosagem de creatinina sérica (M1). Após a coleta de sangue foi feita reposição volêmica com o bolus de 2 mL de solução de Ringer lactato pela via endovenosa.
6. Hidratação com solução de Ringer lactato 3 mL/h por via endovenosa
7. Laparotomia e nefrectomia à direita.
8. Após 30 minutos, dissecção da artéria renal à esquerda com clampeamento total da artéria durante 45 minutos.
9. Após o desclampeamento coleta da segunda amostra de sangue arterial (1 mL) para a medida do hematócrito e dosagem de creatinina sérica (M2). Após a coleta de sangue foi feita reposição volêmica com o bolus de 2 mL de solução de Ringer lactato pela via endovenosa.
10. Fechamento de peritônio e da parede abdominal.
11. Infiltração da ferida operatória com bupivacaína 0,2% na quantidade de 0,4 mL.
12. Retirada dos cateteres, ligando-se a carótida e a jugular interna esquerdas.
13. Interrupção do anestésico inalatório.

14. Aspiração de vias aéreas e extubação retornando o animal para a gaiola com água e alimento ofertados livremente.
15. 24 horas após o termino do procedimento os ratos foram novamente anestesiados com isoflurano a 4% sob campânula e ventilação espontânea, sendo colhida nova amostra de sangue, momento três (M3) para análise de hematócrito e dosagem de creatinina sérica.
16. Nefrectomia do rim esquerdo que foi enviado para exame histológico e para citometria de fluxo.
17. Sacrifício do animal injetando-se 10 mL de tiopental sódico na concentração de 2,5% por via intracardíaca.

Nesse grupo, após a nefrectomia direita, um rato morreu sendo seus dados desprezados e substituído por outro. Também foi desprezado um animal por ter o rim direito com sinais macroscópicos de lesão renal, sendo substituído por outro (Figura 14).

A pressão arterial média (PAM) e a temperatura foram registradas a cada 10 minutos no protocolo, mas, para efeito de estatística foram utilizados os seguintes períodos após a dissecação da artéria carotídea interna esquerda:

P0 – Imediatamente depois

P30 – Com 30 minutos

P60 – Com 60 minutos

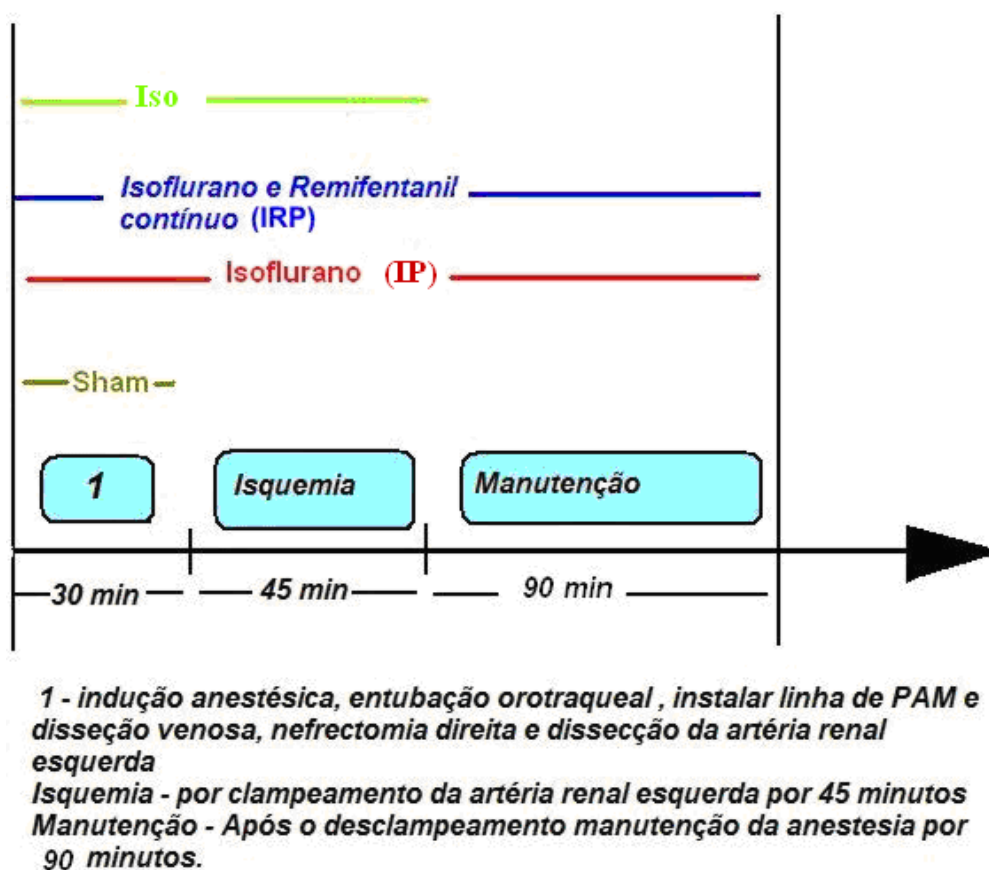


Figura 14 - Metodologia da pesquisa e tempos dos grupos

3.2 Estudo histológico

Os rins dos animais foram retirados e a metade destes colocados em solução de Duboscq-Brasil, durante 24 horas, sendo, a seguir, armazenados em álcool a 70% para posterior estudo histológico. A solução de Duboscq-Brasil foi utilizada com o intuito de preservar e fixar as estruturas renais para aumentar a fidedignidade da análise histológica. É preparada na seguinte proporção: 6 mL de formol 40%, 12 mL de álcool absoluto, 1,5 mL de ácido acético e 8 mL de ácido pícrico em solução saturada.

Após o preparo das lâminas dos rins dos animais, realizado através de fixação em parafina, as mesmas foram avaliadas quanto à presença de congestão vascular, dilatação tubular e necrose. Foram aplicados escores correspondentes ao grau de intensidade das lesões renais, sendo atribuído valor zero à ausência de necrose, valor 1 para as leve, 2 para as moderadas e 3 para as intensas. O patologista que observou as lesões não teve conhecimento a qual Grupo pertenciam os rins.

A outra metade do rim esquerdo foi enviada para estudo da apoptose e necrose pela citometria de fluxo.

3.3 Avaliação da viabilidade celular (apoptose) pelo método da citometria de fluxo^{44, 45}

Os rins dos animais foram retirados e a metade do rim esquerdo foi colocada em cultura apropriada. Com as células extraídas destes rins foi utilizado “kit” para detecção de apoptose constituído de anexina V-FITC e iodeto de propídeo (Pharmlingen[®]) permitindo determinar quantitativamente o percentual de viabilidade (células viáveis, necróticas e em processo apoptótico inicial e tardia) em determinada população celular, a qual foi definida pelos parâmetros de tamanho e granulosidade celular. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo modelo FACSCalibur[®] (Becton DicksonTM), constituído de três detectores de fluorescências com uso dos programas CellQuest[®] e Paint-a-gate (BD).

A citometria de fluxo teve a finalidade de avaliar a apoptose em estágio inicial, por meio do marcador anexina-V, a necrose celular, pelo marcador iodeto de propídeo e a apoptose tardia (estágio final) ou a necrose secundária, pela marcação conjunta de anexina-V com iodeto de propídeo.

A citometria de fluxo permite a quantificação das células viáveis.

Em estágios iniciais do processo apoptótico, ocorrem alterações da membrana plasmática e entre estas se destaca a translocação da fosfatidilserina da superfície interior da membrana expondo-a na superfície celular externa⁴⁴.

Alguns fosfolipídios, como fosfatidilcolina (PC) estão principalmente no folheto externo da membrana celular. Outros como o ácido fosfatídico (PA), fosfatidilserina (PS) e fosfatidiletanolamina (PE) são segregados no folheto interno. A exposição da fosfatidilserina no folheto externo é conhecida como importante sinal biológico. Ativação plaquetária e lesão de células endoteliais, por exemplo, causam rápida translocação da PS na superfície externa da membrana celular⁴⁵. As células normais apresentam a proteína fosfatidilserina no interior de suas membranas celulares. Essa proteína é essencial para manter a conformação e o fluido da membrana celular. Nos estágios iniciais da apoptose (morte celular programada), a fosfatidilserina é exposta pela célula (lado exterior da membrana celular) como marcador de apoptose para as células fagocíticas. A anexina V tem alta afinidade pela fosfatidilserina, portanto liga-se a ela intensamente.

Com relação à marcação com iodeto de propídeo, sabe-se que todas as células são impermeáveis ao mesmo. Portanto, ele só penetra na célula se há ruptura de membrana celular. O iodeto de propídeo liga-se, então, ao DNA celular. Na apoptose, não ocorre ruptura de membrana, somente na morte celular por necrose.

Quando ocorre marcação conjunta de anexina V com iodeto de propídeo, é porque a membrana celular está rompida e ao mesmo tempo a fosfatidilserina está exposta.

A anexina V marcada com fluorocromo (por exemplo, isotiocianato de fluoresceína-FITC) permite identificar células apoptóticas pela ligação à

fosfatidilserina exposta na superfície externa e em combinação com fluorocromos de DNA, como iodeto de propídeo (PI), possibilitando a discriminação de células viáveis (FITC⁻/PI⁻), células em processo apoptótico precoce (FITC⁺/PI⁻) e células mortas (FITC⁺/PI⁺)⁴⁶.

O pesquisador que realizou a citometria de fluxo não teve conhecimento do Grupo ao qual pertencia o rim.

Durante o experimento dois ratos do Grupo IRP e um do Grupo IP morreram durante o procedimento sendo excluídos do trabalho e substituídos imediatamente pelo subsequente para não alterar a ordem de randomização.

Por um problema técnico não foram feitos exames histológicos em dois animais do Grupo IP. Foi feita citometria de fluxo em 24 ratos, ou seja, nos seis primeiros animais de cada Grupo.

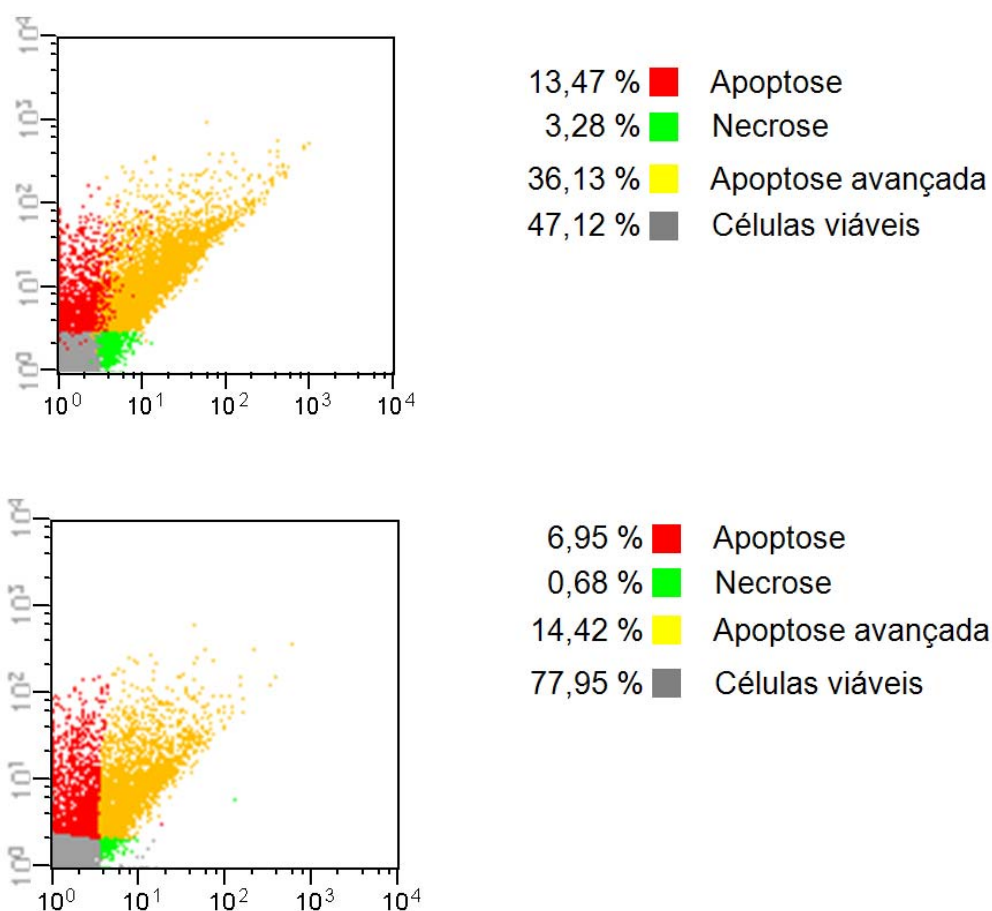


Figura 15 - Exemplos de resultados da citometria de fluxo

3.5 Metodologia estatística

Para a variável peso foi utilizada a análise de variância no delineamento inteiramente ao acaso.

Para as variáveis PAM, hematócrito, temperatura e creatinina, cujo interesse era estudar efeito de Grupo, momento e interação momento x Grupo foi utilizada a análise de perfil.

Para as variáveis da histologia e citometria de fluxo foram utilizados o teste de Kruskal –Wallis.

4 Resultados

4.1 Temperatura corporal (°C)

Tabela 1 - Média e desvio-padrão referente à temperatura segundo momentos (P0 = início, P30 = 30 minutos e P60 = 60 minutos) e grupos: **Sham** (n=10); **IP** (n=10) - isoflurano durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão; **IRP** (n=10) - isoflurano e remifentanil durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão e **Iso** (n=10) – isoflurano, durante o experimento

Grupos	P0	P30	P60
Sham	37,10±0,8	36,9±1,0	37,2±0,8
IP	37,0±0,1	36,9±0,3	37,0±0,1
IRP	37,4±0,7	37,4±0,9	37,2±0,6
Iso	37,2±0,6	37,0±0,6	37,2±0,4

P>0,05

Não houve efeito de momento e nem da interação momento x grupo.

4.2 Pressão arterial média (PAM - mm Hg)

Tabela 2 - Média e desvio-padrão referente à PAM segundo momentos (P0 = início, P30 = 30 minutos e P60 = 60 minutos) e grupos: **Sham** (n=10); **IP** (n=10) - isoflurano, durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão; **IRP** (n=10) - isoflurano e remifentanil durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão e **Iso** (n=10) – isoflurano, durante o experimento

Grupos	P0	P30	P60
Sham	101±25 a A	100±17 a A	109±11 a A
IP	97±19 a A	73±27 b B	58±13 b B
IRP	101±14 a A	81±17 b AB	73±21b B
Iso	116±26a A	99±16 a A	100±18 a A

P < 0,05

Letras minúsculas comparam médias de momentos em cada grupo

Letras maiúsculas comparam médias de grupos em cada momento

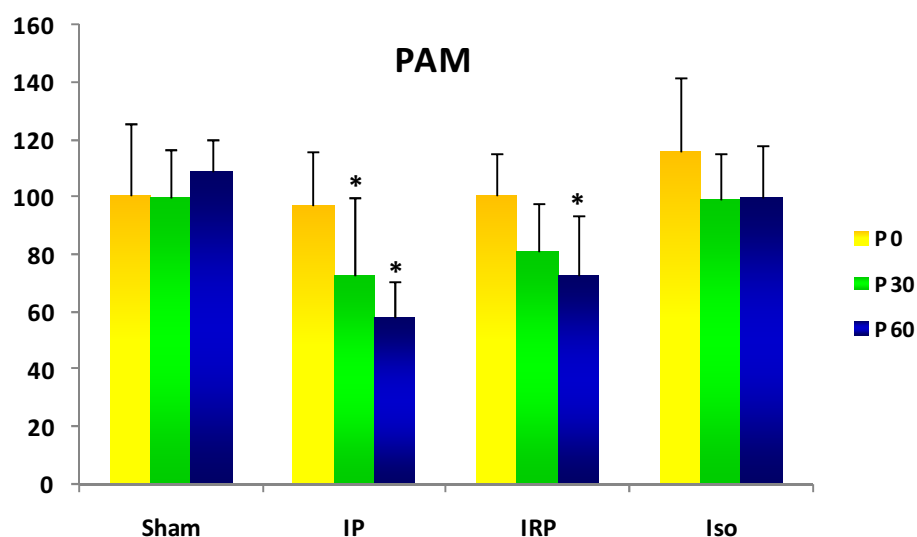


Gráfico 1 - Média e desvio-padrão referente à PAM (mm Hg) segundo momentos e grupos, durante o experimento.

4.3 Hematócrito (%)

Tabela 3 - Média e desvio-padrão referente ao hematócrito segundo momentos (P0 = início, P30 = 30 minutos e P60 = 60 minutos) e grupos: **Sham** (n=10); **IP** (n=10) - isoflurano, durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão; **IRP** (n=10) - isoflurano e remifentanil durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão e **Iso** (n=10) – isoflurano, durante o experimento

Grupos	P0	P30	P60
Sham	37±5	39±6	39±3
IP	42±5	44±4	38±9
IRP	41±4	41±6	39±4
Iso	34±6	37±6	35±4

(P<0,05)

Não houve efeito de grupo e nem da interação momento x grupo, mas somente efeito de momento

4.4 Creatinina sérica (mL/dL)

Tabela 4 - Média e desvio-padrão referente à creatinina segundo momentos (P0 = início, P30 = 30 minutos e P60 = 60 minutos) e grupos: **Sham** (n=10); **IP** (n=10) - isoflurano, durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão; **IRP** (n=10) - isoflurano e remifentanil durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão e **Iso** (n=10) – isoflurano, durante o experimento

Grupos	M1	M2	M3
Sham	0,4±0,1a A	0,5±0,2 a A	0,8±0,2 a B
IP	0,4±0,1 b A	0,6±0,1 b A	4,0±2,2 a A
IRP	0,4±0,1 b A	0,6±0,1 b A	4,3±2,5 a A
Iso	0,4±0,1 b A	0,5±0,1 b A	3,9±1,5 a A

. P<0,05

Letras minúsculas comparam médias de momentos em cada grupo

Letras maiúsculas comparam médias de grupos em cada momento

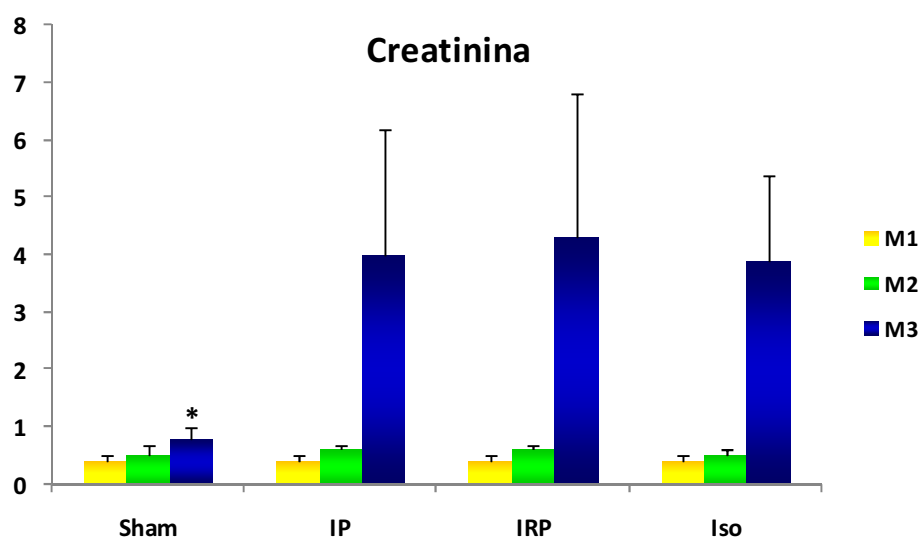


Gráfico 2 - Média e desvio-padrão referente à creatinina segundo momentos e grupos, durante o experimento.

4.5 Avaliação histológica

Tabela 5 - Mediana, 1º e 3º quartis, entre colchetes, referentes aos escores de patologia segundo grupos: **Sham** (n=10); **IP** (n=10) - isoflurano, durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão; **IRP** (n=10) - isoflurano e remifentanil durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão e **Iso** (n=10) – isoflurano, durante o experimento

Grupos	Congestão vascular	Dilatação tubular	Cilindros	Necrose tubular
Sham	1,0[1,0;2,0]	1,0[1,0;2,0]	2,0[1,0;2,0]	0,0[0,0;0,0] B
IP	2,0[1,0;3,0]	0,0[0,0;10]	3,0[2,0;3,0]	3,0[2,0;3,0] A
IRP	1,0[0,0;1,0]	1,0[1,0;2,0]	3,0[1,0;3,0]	3,0[2,0;3,0] A
Iso	1,0[1,0;3,0]	1,0[1,0;3,0]	2,0[2,0;3,0]	3,0[2,0;3,0] A
P	0,06	0,08	0,08	< 0,001

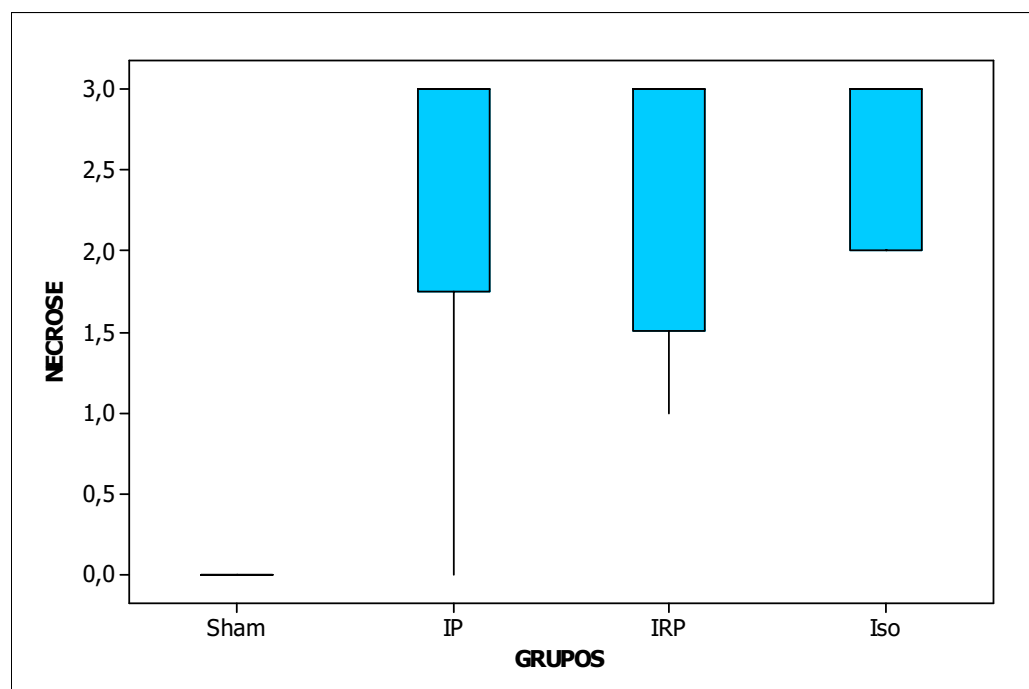


Gráfico 3 - Box plot da necrose tubular segundo os Grupos durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão.

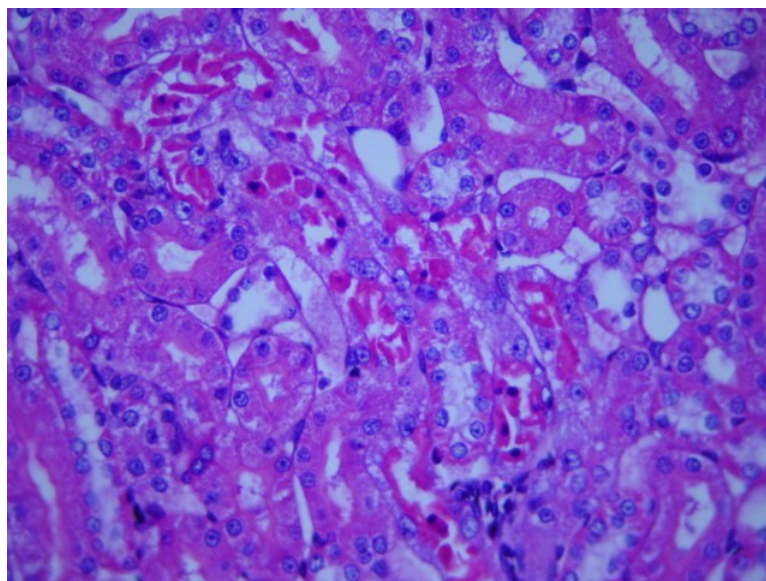


Figura 16 - Necrose tubular discreta (grau 1) rato do grupo IRP (n=10) - isoflurano e remifentanil durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão.

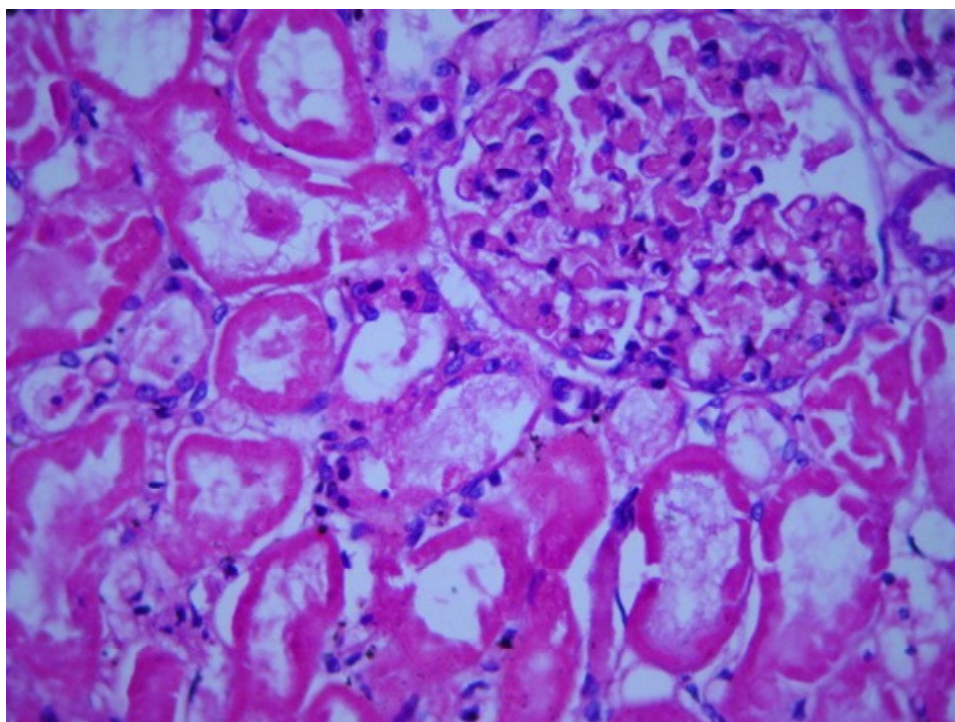


Figura 17 - Necrose intensa (grau 3) em rato do grupo IRP (n=10), isoflurano e remifentanil durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão.

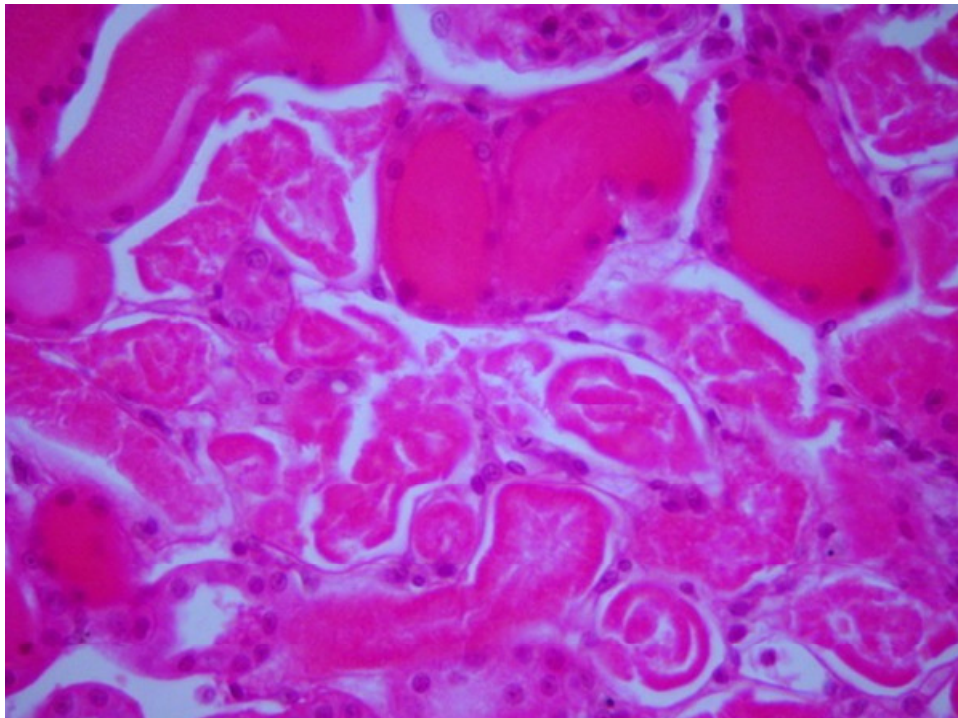


Figura 18 - Necrose tubular intensa com presença de cilindros em rato do grupo Iso (n=10) - isoflurano, durante o experimento.

4.6 Citometria de fluxo

4.6.1 Citometria de fluxo - ANEXINA V - apoptose precoce

Tabela 6 - Mediana, 1º e 3º quartis, entre colchetes, referentes à citometria de fluxo segundo os grupos: **Sham** (n=10); **IP** (n=10) - isoflurano, durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão; **IRP** (n=10) - isoflurano e remifentanil durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão; **Iso** (n=10) - isoflurano, durante o experimento

Grupos	Anexina V
Sham	2,3[1,8;2,9]
IP	10,6[9,0;11,8]
IRP	10,3[2,9;16,6]
Iso	15,5[13,1;19,2]
P	0,001

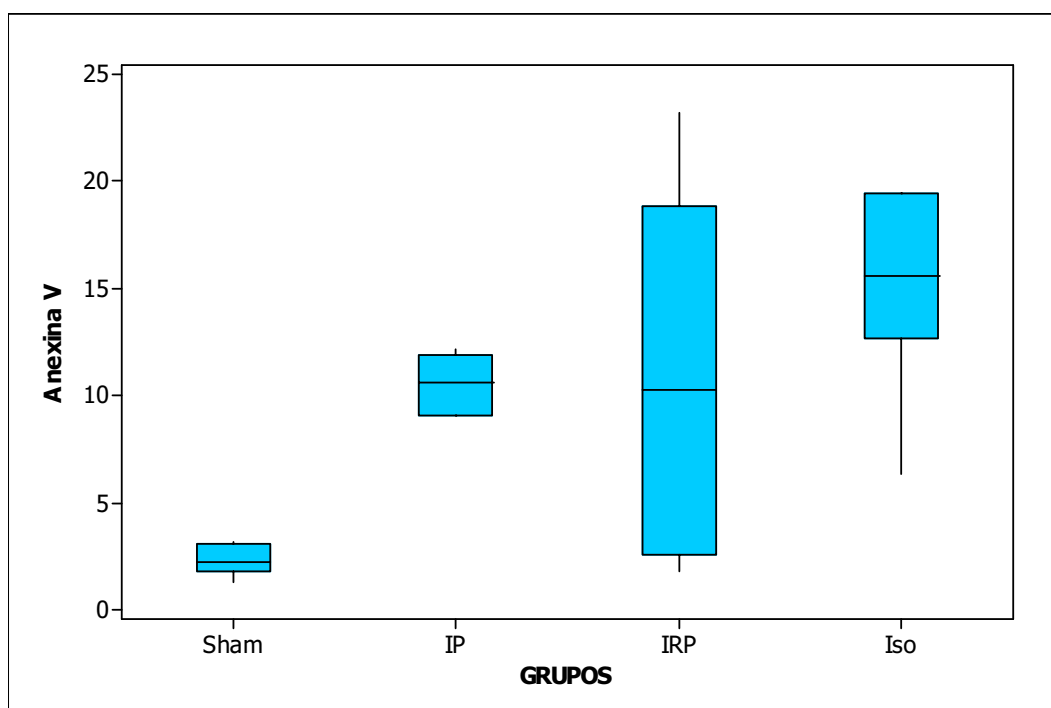


Gráfico 4 - Box Plot da citometria de fluxo: ANEXINA V - apoptose precoce dos grupos, durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão.

4.6.2 Citometria de fluxo - PI = Necrose - membrana degradada

Tabela 7 - Mediana, 1º e 3º quartis, entre colchetes, referentes à citometria de fluxo segundo os grupos: **Sham** (n=10); **IP** (n=10) - isoflurano, durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão; **IRP** (n=10) - isoflurano e remifentanil durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão e **Iso** (n=10) – isoflurano, durante o experimento

Grupo	PI
Sham	0,5[0,0;1,9]
IP	0,1[0,1;0,2]
IRP	0,3[0,2;0,7]
Iso	0,0[0,0;2,1]
P	0,52

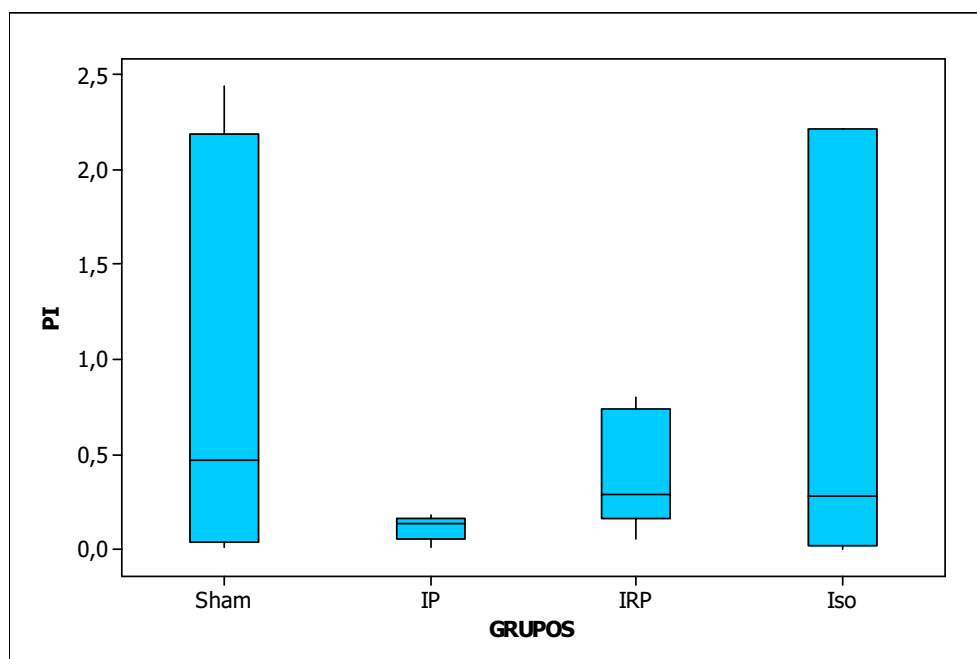


Gráfico 5 - Box Plot da citometria de fluxo - PI = Necrose - membrana degradada dos grupos durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão.

4.6.3 Citometria de fluxo - ANEXINA + PI: = apoptose avançada

Tabela 8 - Mediana, 1º e 3º quartis, entre colchetes, referentes à citometria de fluxo segundo os grupos: **Sham** (n=10); **IP** (n=10) - isoflurano, durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão; **IRP** (n=10) - isoflurano e remifentanil durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão e **Iso** (n=10) – isoflurano, durante o experimento

Grupos	Anexina + PI
Sham	4,8[3,6;5,4]
IP	0,1[0,1;0,1]
IRP	0,2[0,1;0,2]
Iso	23,3[9,5;32,8]
P	0,001

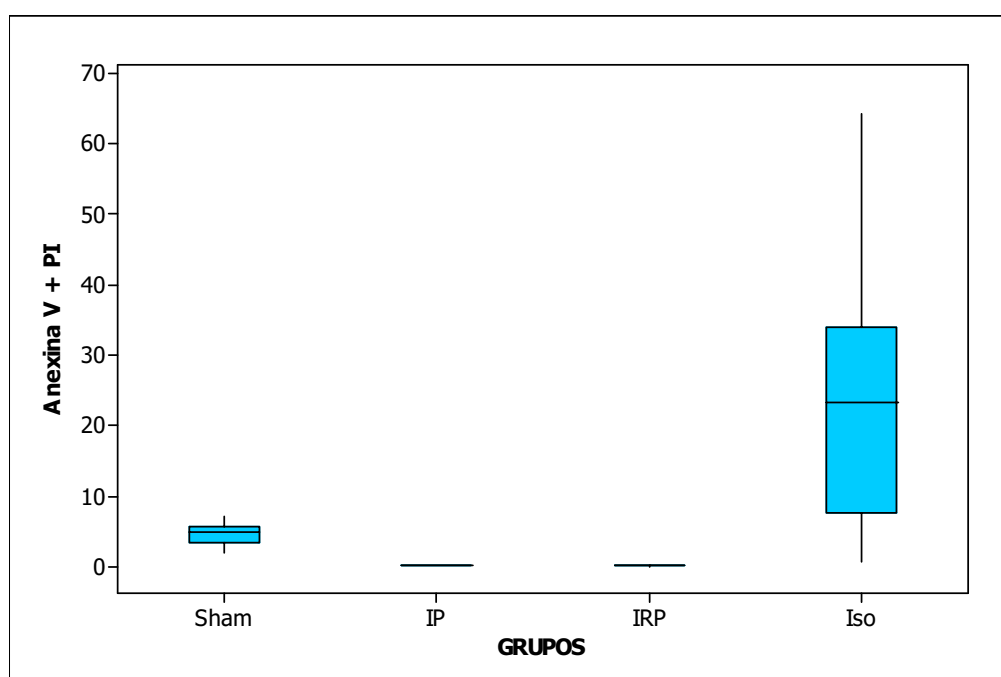


Gráfico 6 - Box Plot da citometria de fluxo - ANEXINA + PI: = apoptose avançada.

4.6.4 Citometria de fluxo - células viáveis

Tabela 9 - Mediana, 1º e 3º quartis, entre colchetes, referentes à citometria de fluxo segundo os grupos: **Sham** (n=10); **IP** (n=10) - isoflurano, durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão; **IRP** (n=10) - isoflurano e remifentanil durante o experimento e 90 minutos pós-reperfusão e **Iso** (n=10) – isoflurano, durante o experimento

Grupos	Células viáveis
Sham	89,9[85,5;92,5]
IP	90,2[88,1;90,9]
IRP	88,9[83,0;96,2]
Iso	51,2[49,6;72,9]
P	0,06

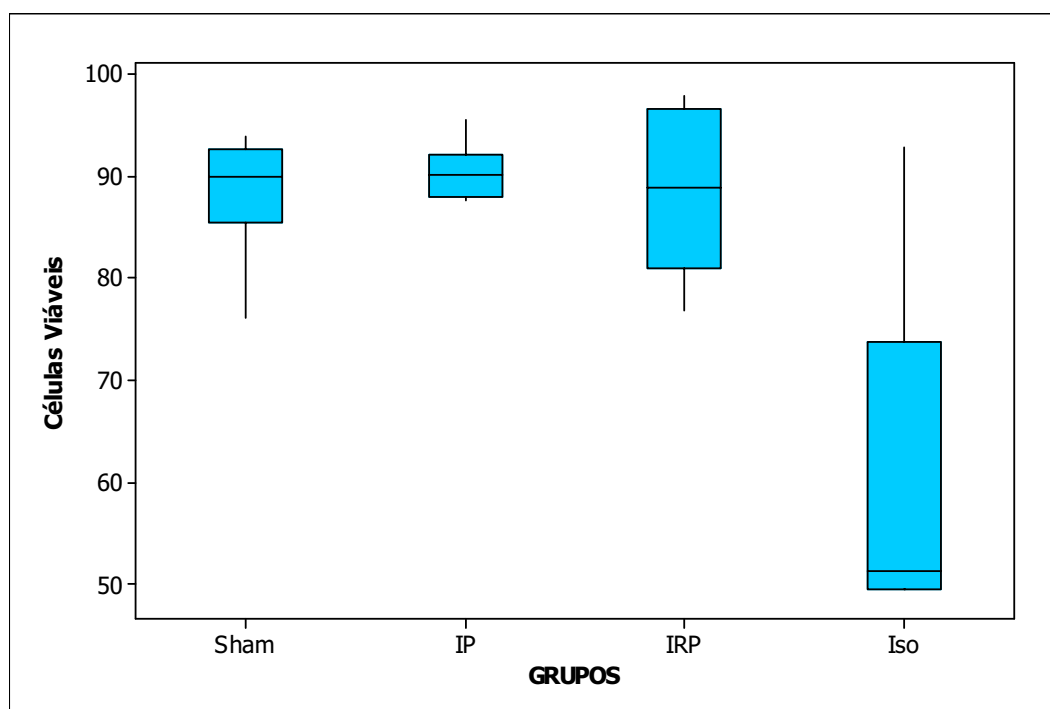


Gráfico 7 - Box Plot das células viáveis dos grupos.

5 Discussão

Não houve alteração de temperatura entre os grupos. Os animais perdiam calor rapidamente e a alteração da temperatura corporal seria um fator determinante para a proteção do órgão, já não existe dúvida que a isquemia seria menos lesiva ao rim com uma temperatura a 32 graus do que isquemia com a temperatura em 38 graus. Por isso, a colocação de bolsas térmicas para manutenção da temperatura do animal demonstrou ter um resultado eficiente conforme podemos analisar na tabela 1 (Temperatura). Podemos verificar que as temperaturas ficaram bem homogêneas não tendo interação entre o tempo ou entre os Grupos. Delbridge et al.⁴⁷ demonstraram que a hipotermia pode causar proteção em rins de ratos submetidos a IR em relação a normotermia e hipertermia.

No parâmetro PAM, houve diferença significativa durante o P60 nos Grupos IRP (58 ± 13 mmHg) e IP (73 ± 21 mmHg), sendo menor que os Grupos Iso (100 ± 18 mmHg) e SHAM (109 ± 11 mmHg). Nos outros momentos não houve diferenças significativas entre os Grupos. Isso talvez seja justificado pelo diferente momento cirúrgico dos Grupos, durante o P60, enquanto os Grupos Iso e SHAM estavam com estímulo cirúrgico de fechamento de cavidade abdominal, os Grupos IRP e IP estavam sem este estímulo cirúrgico.

A associação isoflurano com remifentanil apresentou menores valores de PAM, apesar de não ter diferença estatística entre o Grupo IRP e IP. Entretanto, a PAM destes grupos valores baixos capazes de causar hipoperfusão renal. A ação do remifentanil em relação à PAM é controversa, em doses analgésicas ele pareceu causar vasodilatação, porém sem alteração da PAM⁴⁸. Entretanto, nesse mesmo trabalho, Noiser et al.⁴⁸

cita que em associações (propofol e inalatórios e benzodiazepínicos) ele causa hipotensão, tanto em regime de bolus quanto em infusão contínua.

Os valores de creatinina sérica e a avaliação histológica (necrose tubular) apresentaram diferenças significativas no momento 3, entre os Grupos IRP, IP e Iso quando comparados com o Grupo Sham que não sofreu nenhuma isquemia.

Quando analisamos a citometria de fluxo, podemos verificar na tabela 6 (CF), não ocorreu diferença significativa de células viáveis entre os Grupos, mas o grupo Iso apresentou menores valores de células viáveis.

Quanto a Anexina V, que avalia o grau de apoptose inicial o Grupo Sham teve menor porcentagem de células com apoptose e os valores intermediários ficaram nos Grupos IP e IRP. O Grupo Iso apresentou de maneira significativa a maior porcentagem de apoptose inicial.

A Anexina V + PI, marcador para a apoptose tardia não apresentou diferença entre Grupos.

Talvez a diferença de dose utilizada por Zhang et al.¹⁷ conseguiram uma maior proteção a lesão por IR em coração, com o uso de remifentanil isolado na dose de $6 \mu\text{g kg}^{-1}\text{min}^{-1}$ apesar de ter bons resultados com a dose de $2 \mu\text{g kg}^{-1}\text{min}^{-1}$. Talvez o uso de isoflurano possa competir pelos mecanismos de PC com os opióides saturando o sistema, e sendo mais potente não conseguiríamos perceber o efeito do remifentanil.

A hipótese mais provável seja pelo remifentanil ter baixa afinidade pelos receptores κ e δ e sendo este os mecanismos de estímulo da Proteína cinase e desencadeiam a proteção celular^{14,49}. Os mecanismos descritos nestes trabalhos foram em coração e talvez não consiga se extrapolar as doses e a exatidão do mecanismo para rim.

O remifentanil tem alta afinidade pelo receptor μ ($\text{EC}_{50}=2,6 \text{ nM}$) e afinidades menores pelos receptores δ ($\text{EC}= 66 \text{ nM}$) e κ ($\text{EC}_{50} = 6,1 \mu \text{ M}$)⁵⁰.

Assim, nesta pesquisa procurou-se empregar a dose de $2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, ou seja, a maior dose utilizada na clínica. À semelhança do coração^{51,52}, o rim também possui os receptores κ e δ ^{53,54} e desse modo os opióides podem atuar na proteção renal

Ludwig et al.⁴³ quando perceberam que a morfina associada ao isoflurano melhorava o PC cardíaco, a dose de isoflurano utilizada foi baixa 0,5 a 1 CAM (0,5 a 1%), tornando assim o efeito da morfina mais importante. Outro fator que pode também explicar é a maior afinidade da morfina pelos receptores κ e δ em relação ao remifentanil.

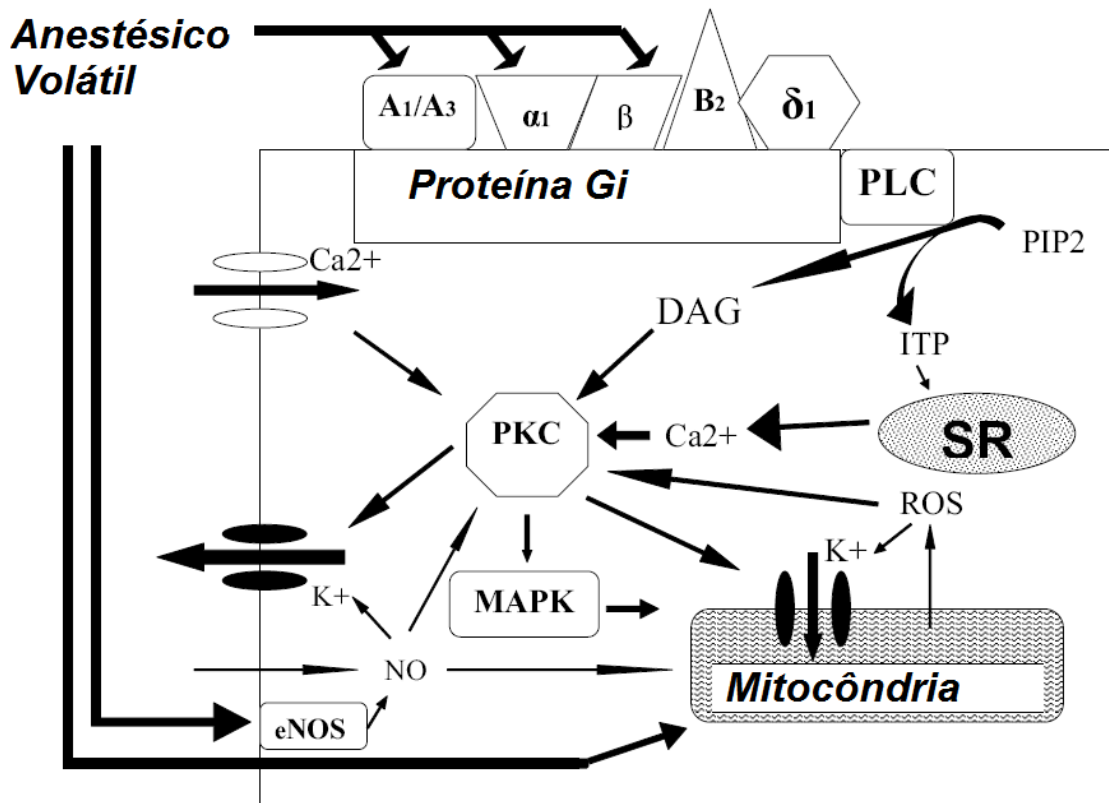


Figura 19 - Mecanismo celular do pré-condicionamento por anestésico voláteis (Adaptada de Lorsonradee et al.¹²).

Os anestésicos inalatórios abrem o canal de potássio sensível a ATP (canais K_{atp}) por ativação da fosfolipase C (PLC) via adenosina A_1 e A_3 (A_1/A_3) e estimulação adrenérgica e por ativação da óxido nítrico sintetase (NOS)

B_2 -> receptor de bradicinina 2, Gi proteína -> guanina inibidora de proteína ligadas a nucleotídeos, DAG -> diacilglicerol ITP -> 1,4,5 trifosfato inusitol, PIP2 -> bifosfato de fosfatidilinositol, PKC-> proteína cinase C, ROS -> espécie reativa de oxigênio, SR -> retículo sarcoplasmático, α_1 -> α_1 receptor adrenérgico, β -> β receptor adrenérgico e δ_1 -> δ_1 receptor opióide.

O provável ponto de competição seja na proteína Gi e PLC, pois o mesmo é estimulado pelo receptor opióide.

Kim et al.⁴², em 2009, relataram que o remifentanil confere cardioproteção através de PCI por via anti-apoptótica, atenuando expressão de genes SR e preservação da fosforilação da ERK.

Em 2005, Zhang et al.⁴⁹ relataram a cardioproteção relacionada ao PCI pelo remifentanil com a ativação da Proteína Cinase C.

Hashiguchi et al.⁵⁵ (2005) relataram que o isoflurano confere proteção renal contra IR por PCI através da inibição das proteínas cinases ERK e JNK.

Nesse ponto encontramos um ponto de conflito, uma vez que o isoflurano através da inibição da ERK irá conferir proteção renal e o remifentanil por manter a sua fosforilação conferirá proteção cardíaca. Ao invés de competirem pelo mesmo ponto de estímulo eles terão efeitos opostos.

Outro fator a ser avaliado, é que no nosso trabalho, assim como no de Lee et al.¹⁴, encontramos um pior resultado com o isoflurano pré-reperfusão, fato que não parece ocorrer com o remifentanil que consegue conferir proteção se usado somente na pré-reperfusão, durante ou pós, segundo Yu et al.¹⁶ sendo interessante avaliar em um outro trabalho se o isoflurano associado ao remifentanil teria melhor efeito protetor que o isoflurano sozinho se usados ambos apenas no período pré-reperfusão.

Seria necessário outro estudo comparando isoflurano isolado com remifentanil isolado para poder elucidar esta dúvida. Este estudo teria uma metodologia um pouco complexo pela dificuldade de usarmos o remifentanil como agente único durante anestesia.

E como fator fundamental é que o coração e o rim são órgãos com mecanismos fisiológicos, sobretudo durante períodos de isquemia, totalmente diferentes por isso não podemos extrapolar os resultados de um órgão para o outro sendo necessários estudos específicos para cada órgão.

Um resultado importante também foi a piora da proteção contra IR a nível celular, demonstrado pela CF se usarmos o isoflurano somente durante período de IR e foi demonstrado ser importante a manutenção do isoflurano pós-reperusão. Resultado semelhante ao encontrado por Lee et al.¹³.

A proteção a lesão por IR dos inalatórios parece depender da manutenção do uso destes, por um período após a reperusão.

6 Conclusão

Não foi encontrada diferença entre os Grupos IP e IRP, sendo a associação de remifentanil ao isoflurano incapaz de atenuar a lesão renal por IR em comparação ao uso do isoflurano isolado. Vale à pena ressaltar, que também não houve efeito deletério pela associação. Novos trabalhos avaliando doses diferentes de isoflurano e remifentanil devem ser feitos para corroborar os resultados encontrados. Para elucidar, seria interessante a realização de pesquisa com uso de morfina ao invés de remifentanil associado ao Isoflurano para PC renal e o uso isolado do remifentanil e compará-lo ao isoflurano para PC renal.

Foi encontrada proteção renal nos Grupos IP e IRP ao Grupo ISO em relação à citometria de fluxo conforme o já descrito previamente na literatura¹³.

7 Referências

1. Rosner MH, Okusa MD. Acute kidney injury with associated with cardiac surgery. Clin J Am Soc Nephrol. 2006; 1: 19-32.
2. Karkouti K, Wijeyesundera DN, Yau TM, Callum JL et al. Acute Kidney injury after cardiac surgery: focus on modifiable risk factors. Circulation. 2009; 119; 495-502.
3. Kheterpal S, Tremper KK, Englesbe MJ et al. Predictors of postoperative acute renal failure after noncardiac surgery in patients with previously normal renal fuction. Anesthesiology. 2007; 107; 892-902 .
4. Abelha FJ, Botelho M, Fernades V, Barros H. Determinants of postoperative acute kidney injury. Critical Care. 2009; 13: 3 R79.
5. Heise D, Sundermann D, Braeuer A, Quintel M. Validation of a clinical score to determinate the risk of acute renal failure after cardiac surgery. Eur J Cardiothoracic Surg. 2010 ;37:710-6.
6. Zager RA, Baltes LA, Sharma HM, Jurkowitz MS. Responses of the ischemic acute renal failure kidney to additional isquemic events. Kidney Int. 1984; 26: 689- 700
7. Murry CE; Jennigs RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation. 1986; 74: 1124 -36.
8. Tapuria N, Kumar Y, Habib M, Abu-Amara M Seifalian AM, Davidson BR. Remote ischemic precondiotioning: A novel protective method from isquemia reperfusion injury – A review. J Surg Res. 2008; 150: 304-30.
9. Cason BA, Gamperl AK, Slocum RE, Hickey RF. Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurano decrease myocardial infarct size in rabbits; Anesthesiology. 1997; 87: 1182-90.

10. Kersten JR, Schmelting TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC. Isoflurane mimics ischemic preconditioning via of K (ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology*. 1997; 87: 361-70.
11. De Hert SG, Turani F, Mathur S, Stowe DF. Cardioprotection with volatile anesthetics: Mechanisms and clinical implications; *Anesth Analg*. 2005; 100: 1584-92.
12. Lorsomradee S, Croomheeck S Lorsomradee S, De Hert SG. Cardioprotection with volatile anesthetics in cardiac surgery. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. 2008; 16: 256-64.
13. Lee HT, Ota-Setlik A, Fu Y, Nasr SH, Emala CW. Differential protective effects of volatile anesthetics against renal ischemia - reperfusion injury in vivo. *Anesthesiology*. 2004; 101: 1313 – 1324
14. Zhang Y, Irwin MG, Wong TM, Chen M, Cao CM . Remifentanil preconditioning confers cardioprotection via cardiac κ and δ opioid receptors. *Anesthesiology*. 2005; 102: 371-8.
15. Kuzume K, Wolff RA, Chien GL, Van Winkle DM. Remifentanil limits infarct size but attenuates preconditioning infarct limitation. *Coron Artery Dis*. 2004; 15: 449- 55.
16. Yu CK, Li YH, Wong GTC, Wong TM, Irwin MG. Remifentanil preconditioning confers delayed cardioprotection in the rat. *Br J Anaesth*. 2007; 99: 632-8.
17. Zhang Y, Irwin MB, Wong TM. Remifentanil preconditioning protects against ischemic injury in the intact rat heart. *Anesthesiology*. 2004; 101; 918-23.
18. Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: Underlying mechanisms and clinical application. *J Atherosclerosis*. 2008.10.29.
19. Birbaum Y, Hale SL, Kloner RA. Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined

- with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation*. 1997; 96: 1641-6.
20. Gunaydin B, Cakici I, Soncul H, et al. Does remote organ ischemia trigger cardiac preconditioning during coronary artery surgery? *Pharmacol Res* 2000; 41: 493-6.
 21. Liu KD. Molecular mechanisms of recovery from renal failure. *Crit Care Med*. 2003; 31; 8: s572-s81.
 22. Chien CT, Chen CF, Hsu SM, Lee PH, Lai MK. Protective mechanism of preconditioning hypoxia attenuates apoptosis formaton during renal ischemia / reperfusion phase. *Transplant Proc*. 1999; 31: 2012-3.
 23. Chien CT, Chen CF, Hsu SM, Lee PH, Lai MK. Hypoxic preconditioning reduces ischemia/reperfusion apoptosis cell death in rat kidney. *Transplant Proc*. 2000; 32: 1653-4.
 24. Thornton JD, Liu GS, Olsson, RA, Downey JM. Intravenous pretreatment with A₁ – selective adenosine analogue protects the heart against infarction. *Circulation*. 1992; 85: 659 - 65
 25. Li FZ, Kimura S, Nishyama A, Rahmana M, Zhang GX, ABE Y. Ischemic preconditioning protects post-ischemic renal function in anesthetized dogs : role of adenosine and adenine nucleotides. *Acta Pharmacol Sin*. 2005; 26: 851-9.
 26. Van Winkle DM, Chien GL, Wolff RA, Soifer BE, Kuzume K, Davis RF. Cardioprotection provided by adenosine receptor activation is abolished by blockade of the K_{atp} channel. *Am J Physiol*. 1994; 266:H829- H39.
 27. Miura T, Ogawa T, Iwamoto T, Shimamoto K, Limura O. Dipyridamole potentiates the myocardial infarct size limiting effect of the ischemic preconditioning. *Circulation*. 1992; 86: 979-85.
 28. Hawaleshka A, Jacobsohn E. Ischaemic preconditioning: mechanisms and potential clinical applications. *Can J Anaesth*. 1998; 45: 670-82.

29. Ricksen NP, Smits P, Rogen GA. Isquemic preconditioning: from molecular characterization to clinical application. Part I. *Neth J Med*. 2004a ; 62: 353-63.
30. Ricksen NP, Smits P, Rogen GA. Isquemic preconditioning: from molecular characterization to clinical application. Part II. *Neth J Med*. 2004 b; 62: 409-23.
31. Jefayri MK, Grace PA, Mathie RT. Attenuation of reperfusion injury by renal ischaemic preconditioning: the role of nitric oxide. *BJU Int*. 2000; 85; 1007-13.
32. Joo JD, Kim M, D'Agati VD, Lee HT. Ischemic preconditioning provides both acute and delayed protection against renal ischemia and reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17; 3115-23.
33. Julier K, Silva R, Garcia C, Bestmann L et al. Preconditioning by sevoflurano decreases biochemical markers for myocardial and renal dysfunction in coronary artery bypass graft surgery: a double-blinded placebo controlled multicenter study. *Anesthesiology* 2003; 98; 1315-27.
34. Jia RP, Zhu JG, Wu JP, Xie JJ, Xu LW. Experimental study on early protective effect of ischemic preconditioning on rat kidney graft. *Transplant Proc*. 2009; 41: 69-72.
35. Yang CW et al. Preconditioning with cyclosporine A or FK506 differentially regulates mitogen-activated protein kinase expression in rat kidney with ischemia reperfusion injury. *Transplantation*. 2003; 75; 20.
36. Obal D, Dettwiler S, Favoccia C, Rascher K, Preckel B, Schlack W. Effect of sevoflurane preconditioning on ischaemia / reperfusion injury in the rat kidney in vivo. *Eur J Anaesthesiol*. 2006; 23; 319-26.
37. Ambros JT, Herrero-Fresneda I, Borau OG, Boira JMG. Ischemic preconditioning in solid organ transplantation from experimental to clinics. *Transpl Int*. 2007; 20: 219-29.

38. Yin DP, Sankary HN, Chong AS, Ma LL, Shen J, Foster P, Williams JW. Protective effect of ischemic preconditioning on liver preservation- reperfusion injury in rats. *Transplantation*. 1998; 66: 52.
39. Nellgard B, Mackensen B, Massey G, Pearlstein RD, Warner DS .The effects of anesthetics on stress responses to forebrain ischemia and reperfusion in the rat. *Anesth Analg*. 2000; 91; 145-51.
40. Zhang J, Yang ZJ, Klaus JA, Koehler RC, Huang J. Delayed tolerance with repetitive transient focal ischemic preconditioning in the mouse. *Stroke*. 2008; 39: 967-74.
41. Zaugg M, Luchinetti E, Uecker M, Pash T, Schaub MC. Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part I. Signalling and cytoprotective mechanisms. *Brit J Anaesth*. 2003; 91: 551-65.
42. Kim HS, Cho JE, Hong SW, Shim JK, Kwa YL. Remifentanil protects myocardium via activation of anti-apoptotic pathways of survival in ischemia-reperfused rat heart. *Physiol Res*. 2009 Aug 12. [Epub ahead of print]
43. Ludwig LM, Patel HH, Gross GJ, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC. Morphine enhances pharmacological preconditioning by isoflurane. *Anesthesiology*. 2003; 98: 705-11.
44. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995; 184:39-51.
45. Seaton BA, Dedman JR. Annexins. *Biometals*. 1998; 11:399-404.
46. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994; 84: 1415-20.

47. Delbridge M S, Shrestha B M, Raftery A T, El Nahas A M and Haylor JL. The effect of body temperature in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc.* 2007; 39: 2983-5.
48. Nosier RK, Ficke DJ, Kundu A, Arain SR, Ebert TJ. Sympathetic and vascular consequences from remifentanil in Humans. *Anest Analg.* 2003; 96:1645-50.
49. Zhang Y, Chen ZW, Irwin MG, Wong TM. Remifentanil mimics cardioprotective effect of ischemic preconditioning via protein Kinase C activation in open chest of rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2005; 26: 546-50.
50. James MK, Feldman PL, Schuster SV, Bilotta JM, Brackeen MF, Leighton HJ. Opioid receptor activity of GI 87084B, a novel ultra-short acting analgesic, in isolated tissues. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991; 259:712-8.
51. Wong TM, Lee AY, Tai KK. Effects of drugs interacting with opioid receptors during normal perfusion or ischemia and reperfusion in the isolated rat heart: An attempt to identify cardiac opioid receptor subtype(s) involved in arrhythmogenesis. *J Mol Cell Cardiol.* 1990; 22: 1167-75.
52. Ventura C, Spurgeon H, Lakatta EG, et al. Kappa and delta opioid receptor stimulation affects cardiac myocyte function and Ca^{2+} release from an intracellular pool in myocytes and neurons. *Circ Res* 1992; 70: 66-81.
53. Dissanayake VU, Hughes J, Hunter JC. Opioid binding sites in the guinea pig and rat kidney: radioligand homogenates bindings and autoradiography. *Mol Pharmacol.* 1991; 40:93-100.
54. Sezen SF, Kenigs VA, Kapusta DR. Renal excretory responses produced by the delta opioid agonist BW373U86, in conscious rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; 287: 238-45.
55. Hashiguchi H, Morooka H, Miyoshi H, Matsumoto M, Koji T, Sumikawa K. Isoflurane protects renal function against ischemia and reperfusion through inhibition of protein kinases, JNK and ERK. *Anesth Analg.* 2005; 101:1584-9.

56. Warltier DC, Mahmood H, Al-Wathiqui, Kampine JP, Schmeling WT. Recovery of contractile function of stunned myocardium in chronically instrumented dogs is enhanced by halothane or isoflurane. *Anesthesiology*. 1988; 69: 552-65.
57. Minguet G, Joris J, Lamy M. Preconditioning and protection against ischemia-reperfusion in non cardiac organs: a place for volatile anaesthetics? *Eur J Anesthesiol* 2007; 24:733-45.
58. Schultz JE, Rose E, Yao Z, Gross GJ. Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Am J Physiol*. 1995, 268: H2157- H61.
59. Benedict PE, Benedict MB, Su TP, Bolling SF. Opiate drugs and delta-receptor-mediated myocardial protection. *Circulation*. 1999; 100: II 357-60.
60. Chan Y, Walmsley RP. Learning and understanding the Kuskal-Wallis one-way analysis-of-variance-by-ranks test for differences among three or more independent groups. *Phys Ther*. 1997; 77: 1755-61.
61. Tasdemir O. Acute renal failure following open heart surgery: risk factors and prognosis. *Perfusion*. 2005; 20: 317-22.
62. Stallwood M, Grayson AD, Mills K, Scawn ND. Acute renal failure in coronary artery bypass surgery: independent effect of cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. 2004; 77:968-72.
63. Zaugg M, Luchinetti E, Garcia C, Pash T, Spahn DR, Schaub MC. Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part II. Clinical implications. *Br J Anaesth*. 2003; 91: 566-76.
64. Aravindan N, Cata JP, Hoffman L, Dougherty PM, Riedel BJ, Price KJ, Shaw AD. Effects of isoflurane, pentobarbital, and urethane on apoptosis and apoptotic signal transduction in rat kidney. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2006; 50: 1229-37.

65. Vianna PTG, Castiglia YMM, Braz JRC et al. Remifentanil, Isoflurane, and Preconditioning attenuate renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Transplant Proc.* 2009; 41:4080-2.
66. Curtis FG. Sevoflurano e Dexmedetomidina em isquemia e reperfusão renais no rato. [Tese] Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Neto, 2008.