

Sylvio Valença de Lemos Neto

Estudo da isquemia e reperfusão renal associados à hiperglicemia transitória e a ciclosporina A em ratos anestesiados com isoflurano ou com propofol

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

Orientador: Prof. Titular Pedro Thadeu Galvão Vianna

Botucatu – SP

2012

Dedicatória

Ao Professor Titular, Doutor Pedro Thadeu Galvão Vianna, pela oportunidade a mim concedida de cursar o doutorado junto a este único Departamento de Anestesiologia.

Meu respeito e admiração pela sua inquietude científica e pela serenidade no ensino da Ciência, inibindo sempre a vaidade em prol da simplicidade e eficiência.

Por seus ensinamentos, amizade, carinho, paciência e presença, essenciais para a obtenção dessa marcante conquista.

"Há pessoas que nos falam e nem as escutamos, há pessoas que nos ferem e nem cicatrizes deixam, mas há pessoas que simplesmente aparecem em nossas vidas e nos marcam para sempre."

Cecília Meireles

Agradecimentos

Aos professores do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela inestimável amizade, ajuda e apoio durante esses anos como aluno.

Aos funcionários do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela presteza e ajuda em todas as minhas demandas.

À Instituição UNESP, por ter me proporcionado ensino de qualidade e todas as condições necessárias para a realização dessa tese.

Aos professores e funcionários dos departamentos de Estatística, Patologia e Hematologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela grande colaboração na execução de toda a pesquisa.

Ao Sr. Cristiano Correia de Oliveira, funcionário do laboratório de Anestesiologia Experimental da FMB, pela incansável cooperação e constante otimismo.

Ao Instituto Nacional de Câncer, meu habitat profissional, pela oportunidade de desenvolvimento técnico e científico.

À Sra. Renata Giorgi, secretária do gabinete da Direção do Hospital do Câncer I, pela dedicação e inestimável colaboração.

Aos Drs. M. A. Gouveia e Gilda Labrunie, por me iniciarem cientificamente na Anestesiologia.

Agradecimentos Especiais

Aos meus pais Sylvio e Marly, que dignamente me apresentaram à importância do conhecimento e ao caminho da honestidade e da persistência.

À Maria Cláudia, pessoa com quem amo partilhar a vida. Pelo apoio incondicional e desmedido. Pelo carinho, pela paciência e por sua capacidade de me trazer paz na correria de cada dia.

Aos meus filhos, Guilherme e Gustavo, pela oportunidade de experimentar a mais pura forma de amor.

E por terem me acompanhado com paciência, no decorrer deste curso, revelando-me a certeza de que todos os dias, ao lado deles, são maravilhosos.

À minha querida irmã, Marília, companheira de profissão e especialidade, que me proporcionou a alegria de compartilhar a pós-graduação.

Epígrafe

“ No momento em que nos comprometemos, a providência divina também se põe em movimento. Todo um fluir de acontecimentos surge ao nosso favor. Como resultados da atitude seguem todas as formas imprevistas de coincidências, encontros e ajuda que nenhum ser humano jamais poderia ter sonhado encontrar. Qualquer coisa que você possa fazer ou sonhar, você pode começar. A coragem contém em si mesma, o poder, o gênio e a magia” .

Goethe

Lemos Neto SV. Estudo da isquemia e reperfusão renal associados à hiperglicemia transitória e a ciclosporina em ratos anestesiados com isoflurano ou com propofol Botucatu, 2012. 97p. Doutorado em Anestesiologia. Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

Justificativa e Objetivo: Hiperglicemia perioperatória é um preditor de morbimortalidade. A proposta desta pesquisa foi examinar o efeito da ciclosporina A (CsA) na lesão de isquemia/reperfusão renal durante hiperglicemia transitória.

Material e Métodos: Após aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa Animal da Instituição os ratos foram randomicamente distribuídos em seis grupos de seis animais cada: HISO (isoflurano =Iso + IRI); HP (Propofol =Prop + IRI); HISO CsA (Iso + IRI + CsA); HP CsA (Prop + IRI + CsA);SISO (Sham - Iso); S P (Sham -Prop);). Os animais receberam $1 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (equivalente a $0.16 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ para humanos) ou propofol (HP, HP CsA and SP) ou isoflurano (HISO, HISO CsA and SISO). Hiperglicemia foi induzida por injeção intraperitoneal de 2.5 g.kg^{-1} de glicose em todos os grupos. Ciclosporina 5 mg.kg^{-1} foi injetada i.v. 5 min antes da reperfusão nos grupos HISOCsA and HPCsA. Os dois grupos *sham* foram submetidos à nefrectomia direita e hiperglicemia somente. Os demais grupos foram submetidos à isquemia renal esquerda por 25 minutos. Os níveis de creatinina sérica foram determinados antes (T1) e após 25 minutos de isquemia (T2). Vinte e quatro horas após (T3) foi colhida nova amostra de sangue e realizada a nefrectomia esquerda para análise histológica, usando a tabela de lesão tubular (0 -5=lesão máxima). As células do rim esquerdo foram avaliadas, por citometria de fluxo (CMF), para apoptose, como percentual de apoptose inicial (APTi), necrose e células viáveis (CV).**Resultados e Discussão:** Creatinina sérica(mg/dL) foi diferente estatisticamente ($p < 0,0001$) em T3 in: 1.Grupo HISO (5.08 ± 0.76) em relação a outros grupos. 2.Grupos HP (4.23 ± 0.50), HISOCsA ($4,50 \pm 0.85$), HPCsA(4.19 ± 0.96) foram estatisticamente diferentes em comparação com os grupos SISO (0.65 ± 0.10) e SP (0.85 ± 0.10). O exame histológico mostrou que SISO (0[0;0]) and SP (0[0;0]) foram significativamente diferentes($P < 0,001$) dos grupos HISO (4.0[3;4]), HP (3[3;4]), HISO CsA (3[3;4]) e HPCsA(3[3;4]). CMF demonstrou que APTi nos grupos HISO ($86,29 \pm 8,98$) e HP ($79,28 \pm 11,44$) foram estatisticamente diferentes ($p < 0,001$) comparados com os grupos HISOCsA ($21,23 \pm 17,53$), HPCsA ($15,06 \pm 11,26$) SISO ($9,88 \pm 6,62$) and SP ($10,33 \pm 5,26$). A porcentagem de necrose celular foi maior em HP ($p < 0.02$). **Conclusão(ões):** Ciclosporina mostrou proteção contra a lesão de I/R nos grupos hiperglicêmicos avaliados principalmente pela citometria de fluxo. O mecanismo desta proteção foi, possivelmente, a inibição do poro mitocondrial de permeabilidade transitória provocado pela ciclosporina A (CsA).

Palavras-chave: hiperglicemia; isoflurano; isquemia; lesão renal; pré-condicionamento; propofol; rato; reperfusão; rim

Lemos Neto SV. The effect of cyclosporine in rats underwent hyperglycaemia and ischemia renal and anaesthesia with isoflurano or propofol. Botucatu, 2012. 97p. Doutoramento em Anestesiologia. Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

ABSTRACT

Background and Goal of Study: Perioperative hyperglycaemia is predictors of morbidity and mortality¹. The purpose of this investigation was to examine the effect of cyclosporine A (CsA) on renal ischemia/reperfusion injury (IRI) during and transient hyperglycemia. **Materials and Methods:** After approved by the institution's Committee of Animal Research Ethics rats were randomly assigned into six groups of six animals each: HISO (isoflurane =Iso + IRI); HP (Propofol =Prop + IRI); HISO CsA (Iso + IRI + CsA); HP CsA (Prop + IRI + CsA); SISO (Sham - Iso); S P (Sham -Prop);). The animals received 1 mg.kg⁻¹.min⁻¹ (equivalent to 0.16 mg.kg⁻¹.min⁻¹ for humans) of either propofol (HP, HP CsA and SP) or isoflurane (HISO, HISO CsA and SISO). Hyperglycaemia was induced by injecting 2.5 g.kg⁻¹ of glucose solution intraperitoneal for all groups. Cyclosporine 5 mg.kg⁻¹ was injected i.v. 5 min before reperfusion in groups HISO CsA and HP CsA. Both sham groups underwent right nephrectomy and hyperglycaemia induction only. The other groups were submitted to left renal ischemia for 25 minutes. Serum creatinine levels were determined before (T1) and after 25 minutes of ischemia (T2). Twenty four hours after (T3) blood collection and left kidney removal were performed for histological analysis, using a tubular injury score system (0 -5= injury maximum). In addition, cells from the left kidney were evaluated for apoptosis by flow cytometry (FCM) as a % of initial apoptosis (APTi), necrosis and viable cells (VC). **Results and Discussion:** Serum creatinine (mg/dL) was statistically different (p<0,0001) at T3 in: 1.Group HISO (5.08±0.76) versus others groups. 2.Groups HP (4.23±0.50), HISO CsA (4,50±0.85) HPCsA(4.19±0.96) were statistically different in comparison with the SISO (0.65±0.10) and SP (0.85±0.10). Histological examination showed that groups SISO (0[0;0]) and SP (0[0;0]) were significantly different (P<0,001) from groups HISO (4.0[3;4]), HP (3[3;4]), HISO CsA (3[3;4]) and HPCsA(3[3;4]). FCM showed that APTi in groups HISO (86,29 ± 8,98) and HP (79,28 ± 11,44) were statistically differed (p<0,001) compared with groups HISO CsA (21,23 ± 17,53), HPCsA (15,06 ± 11,26) SISO (9,88 ± 6,62) and SP (10,33 ± 5,26). Necrosis cells percentage was higher in HP (p<0.02). VC percentage was statistically lower (p<0.0001) in groups HISO and HP. **Conclusion(s):** Cyclosporine showed protection against IRI in the hyperglycemic groups evaluate mainly by flow cytometry. Possibly the mechanism of this protection was the inhibition mitochondrial permeability transition pore (mPTP) caused by cyclosporine A (CsA).

Keywords: hyperglycemia; ischemia; isoflurane; kidney injury; kidney; preconditioning; propofol; reperfusion; rat

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação simplificada do mecanismo de pré-condicionamento precoce.....	20
Figura 2	Representação simplificada do mecanismo de pré-condicionamento tardio.....	20
Figura 3	Representação simplificada das alterações na estrutura das células tubulares após lesão renal aguda.....	22
Figura 4	Representação simplificada das alterações da microvasculatura e da inflamação na LRA isquêmica.....	23
Figura 5 A	Mecanismo celular do pré-condicionamento isquêmico. Adaptado de Lorsomradee et al., 2008.....	25
Figura 5 B	Mecanismo celular do pré-condicionamento pelos anestésicos voláteis. Adaptado de Lorsomradee et al., 2008.....	25
Figura 6	Fórmula estrutural do 2,6 diisopropilfenol (propofol).....	29
Figura 7	Fórmula estrutural do alfa-tocoferol (vitamina E).....	29
Figura 8	Fórmula estrutural da ciclosporina.....	34
Figura 9	Fórmula do mecanismo de ação da ciclosporina.....	35
Figura 10	Figura adaptada de Cour et al., 2011.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	A avaliação da necrose tubular foi obtida de escores adaptados de Park et al. 2008 e explicitados abaixo.....	55
Tabela 2	Média e desvio-padrão referentes à PAM segundo grupos e momentos.....	58
Tabela 3	Média e desvio-padrão referentes à glicemia segundo grupos e momentos.....	60
Tabela 4	Média e desvio-padrão referentes à creatinina segundo grupos e momentos.....	62
Tabela 5	Mediana, 1 ^o e 3 ^o quartil, entre colchetes, referentes ao índice de lesão tubular, segundo grupos.....	64
Tabela 6	Média e desvio-padrão referentes às variáveis de apoptose inicial segundo grupos.....	66
Tabela 7	Média e desvio-padrão referente à variável necrose celular, segundo grupos.....	68
Tabela 8	Média e desvio-padrão referente à variável células viáveis, segundo grupos.....	70

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Medidas da PAM (mm Hg) nos momentos e grupos estudados.....	58
Gráfico 2	Valores de glicemia (mg.dL^{-1}) dos grupos e momentos estudados.....	60
Gráfico 3	Média e desvio-padrão referentes a creatinina segundo grupos e momentos.....	62
Gráfico 4	Mediana, 1 ^o e 3 ^o quartil, referentes ao índice de lesão tubular segundo grupos.....	64
Gráfico 5	Média e desvio-padrão referentes às variáveis de apoptose inicial segundo grupos.....	66
Gráfico 6	Média e desvio-padrão referentes às variáveis de necrose celular (%), segundo grupos.....	68
Gráfico 7	Média e desvio-padrão referentes à variável da porcentagem de células viáveis, segundo grupos.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Difosfato de Adenosina
ANT	Translocador de Nucleotídeo Adenina
ATP	Adenosina tri-fosfato
CAT	Catalase
COX₂	Ciclo-oxigenase 2
CsA	Ciclosporina A
CypD	Ciclofilina D
DAG	Diaglicerol
DMOS	Disfunção de múltiplos órgãos e sistemas
DNA	Desoxirribonucléico
eNOS	Sintase endotelial óxido nítrico (<i>endotelial Nitric Oxide Synthase</i>)
FSR	Fluxo sanguíneo renal
FTE	Função Tardia do Enxerto
GSK3β	Enzima glicogênio sintase cinase 3 β
HSP	Proteínas de choque térmico (<i>Heat Shock Protein</i>)
I/R	Isquemia-reperfusão
IFN-γ	Interferon gama
IL- 1 β	Interleucina 1 beta
IL-2, IL-4 IL-8	Interleucinas 2, 4 e 8.
iNOS	Sintase induzível Óxido nítrico (<i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>)
ITF	Trifosfato de inusitol
K_{ATP}	Canal de K ⁺ sensível à adenosina tri-fosfato
LRA	Lesão renal aguda
MAPK	Proteínas cinases ativadas por mitógenos (<i>Mitogen-Activated-Protein kinases</i>)
MDA	Malondialdeído
MEK1/ 2-ERK1/2	Cinase regulada pelo sinal extracelular
mito K_{ATP}	Canal de K ⁺ (mitocondrial) sensível à adenosina tri-fosfato
mPTP	Poros mitocondrial de transição da permeabilidade (<i>Mitochondrial permeability transition pore</i>)
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
Na K-ATPase	Canais de sódio e potássio atpase dependente

NFAT	Fator Nuclear de células T ativadas
NF-κB	Fator nuclear kappa-Beta (<i>Nuclear Factor-kappaBeta</i>)
NO	Óxido nítrico (<i>Nitric Oxide</i>)
NOS	Óxido nítrico sintase (<i>Nitric Oxide Synthase</i>)
PAM	Pressão Arterial Média
PCI	Pré-condicionamento isquêmico
PCK	Proteína cinase C
PCK_(-E)	Proteína cinase C _(-E= ÉPSILON) (<i>Protein-kinase C_(-E)</i>)
PI3K	Enzima fosfatidilinositol-3-cinase (<i>Phosphatidyl-inositol-3-kinase</i>)
PIP2	Bifosfato de fosfatidil inositol (<i>Phosphatidyl</i>)
PLC	Fosfolipase C (<i>Phospholipase C</i>)
PMN	Polimorfonucleares
Proteína Gi	Proteína G inibitória ligada ao nucleotídeo guanina
Proteína Gs	Proteína G estimulante ligada ao nucleotídeo guanina
PTP	Poros de transição de permeabilidade
PTKs	Proteínas tirosina cinases (<i>Protein Tyrosine Kinases</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RVR	Resistência vascular renal
SOD	Superóxido dismutase
SR	Retículo Sarcoplasmático
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
TFG	Taxa de filtração glomerular
Th1	Células T- helper1
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa (<i>Tumoral Necrosis Factor-alfa</i>)
UTI	Unidade de terapia intensiva
VDAC	Canal aniônico voltagem dependente

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
Lista de Ilustrações	
Lista de Tabelas	
Lista de Gráficos	
Lista de Abreviaturas e Siglas	
1 INTRODUÇÃO E LITERATURA	14
1.1 LESÃO RENAL AGUDA (LRA)	15
1.2 ISQUEMIA E REPERFUSÃO (I/R)	16
1.3 PRÉ-CONDICIONAMENTO	18
1.3.1 Pré-condicionamento isquêmico	18
1.3.2 Pré-condicionamento precoce e tardio	19
1.3.3 Lesão e Reparação Renal	21
1.3.4 Pré-condicionamento farmacológico	23
1.4 CICLOSPORINA (CsA)	32
1.5 A LESÃO DA REPERFUSÃO	38
1.6 O PORO MITOCONDRIAL DE TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE	40
1.7 HIPERGLICEMIA	43
2 OBJETIVO	48
3 MATERIAL E MÉTODO	49
3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS	49
3.2 SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL	51
3.3 ATRIBUTOS ESTUDADOS	53
3.4 MOMENTOS ESTUDADOS	54
3.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	55
3.6 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR (APOPTOSE)	56
4 RESULTADOS	57
4.1 PAM - Pressão Arterial Média (mm Hg)	57
4.2 GLICEMIA (mg.dL ⁻¹)	59
4.3 CREATININA PLASMÁTICA (mg.dL ⁻¹)	61
4.4 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	63
4.5 CITOMETRIA DE FLUXO – PORCENTAGEM (%) DE APOPTOSE INICIAL	65
4.6 CITOMETRIA DE FLUXO - PORCENTAGEM (%) DE NECROSE CELULAR	67
4.7 CITOMETRIA DE FLUXO – PORCENTAGEM (%) DE CÉLULAS VIÁVEIS	69
5 DISCUSSÃO	71
6 CONCLUSÃO	78
7 REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO E LITERATURA

O rim é um dos órgãos mais sensíveis à isquemia. Sua consequente lesão, por vezes irreversível, causa grandes danos ao paciente. Na prática, a lesão renal aguda (LRA) é um quadro comum entre os pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos, como transplante renal, revascularização do miocárdio, cirurgias oncológicas extensas e cirurgias de aneurisma de aorta com interrupção de fluxo acima das artérias renais. A lesão isquêmica do rim é associada à alta morbidade e mortalidade, portanto, melhorar a capacidade desse órgão em tolerar a lesão isquêmica é de grande importância para a diminuição desses índices (Bonventre, 2002).

A hiperglicemia aguda está associada ao aumento da morbidade e da mortalidade em pacientes com trauma, colapso cardiovascular e submetidos à cirurgia cardíaca, pelo aumento do estresse oxidativo nos órgãos isquêmicos (Ouattara et al., 2005; Di Filippo et al., 2006; Esposito et al., 2006; Bemeur et al., 2007).

A escolha de técnicas anestésicas, com fármacos que propiciem melhor proteção contra os efeitos da isquemia e da reperfusão, tem sido objeto de estudo há várias décadas, desde os estudos iniciais de Spieckermann et al., em 1969.

Ao considerar o número crescente da população de pacientes diabéticos, sua maior vulnerabilidade aos efeitos nocivos dos episódios de isquemia-reperfusão (I/R) e conhecendo-se os efeitos protetores de fármacos anestésicos, estudos foram realizados para verificar a existência de proteção do propofol e do isoflurano nos rins de ratos hiperglicêmicos, usando um modelo renal de I/R (Carrareto, 2011).

A abertura do mPTP ocorre nos minutos iniciais da reperfusão e está associada com a patogênese da necrose e apoptose e deve ser considerada um passo determinante para a morte celular reversível ou irreversível (Crompton, 1999).

A inibição do mPTP com ciclosporina A no início da reperfusão mostrou proteger o miocárdio (Hausenloy et al., 2002; Argaud et al., 2005).

Krolkowski et al. (2005) demonstraram que a manutenção do mPTP fechado com ciclosporina A (CsA) aumentava a cardioproteção induzida pelo pós-condicionamento com isoflurano.

Em 2008, Huhn et al. demonstraram, ao avaliar a extensão do infarto, que a hiperglicemia bloqueava o pós-condicionamento induzido pelo sevoflurano no miocárdio de ratos e que a CsA era capaz de reverter essa perda da cardioproteção, por inibição do poro de transição da permeabilidade mitocondrial (mPTP).

Assim, resolvemos estudar se a ação da ciclosporina A se repetiria em rins de ratos hiperglicêmicos, submetidos a I/R e anestesiados com isoflurano ou propofol.

Para o melhor entendimento desta pesquisa, sua abordagem inicial será descrita em sete tópicos: Lesão Renal Aguda, O Fenômeno da Isquemia e Reperfusão, O Pré-condicionamento, A Ciclosporina A, A Lesão da Reperfusão, O Poro de Transição da Permeabilidade Mitocondrial e A Hiperglicemia.

1.1 LESÃO RENAL AGUDA

A isquemia renal prolongada resulta em insuficiência renal aguda (Bonventre, 1993).

A lesão isquêmica do rim está associada à alta morbidade e mortalidade (Bonventre, 2002).

A lesão renal aguda (LRA) é definida como uma rápida diminuição da taxa de filtração glomerular, por um período de minutos ou dias. Nessa situação, a produção de metabólitos excede a excreção renal, levando ao aumento de concentrações séricas de marcadores da função renal, como ureia e creatinina (Wang, 2004).

Embora a LRA seja uma doença grave e há muito conhecida, somente recentemente se tem admitido que pequenas mudanças na função renal tenham grande influência nos desfechos. Causa enorme impacto econômico pelo aumento da permanência hospitalar, sendo fator independente para aumento de mortalidade (Hoste, 2008).

A LRA ocorre em 1% a 5% de todos os pacientes hospitalizados, com crescente aumento nessa prevalência (Kheterpal, 2007).

A LRA pós-operatória continua sendo a maior causa de morbidade, mortalidade, permanência hospitalar prolongada e aumento dos custos hospitalares (Abelha, 2009).

Kheterpal et al. (2009) analisaram 75.952 pacientes submetidos a cirurgias não cardíacas, cuja frequência total de LRA pós-operatória foi de 1%, com elevação de oito vezes a possibilidade de morte, independentemente de outras comorbidades.

Em outros estudos, Kheterpal et al. identificaram como fatores de risco para o desenvolvimento de LRA a idade acima de 59 anos, índice de massa corporal acima de 32, cirurgia de emergência, doença hepática, doença pulmonar obstrutiva crônica com uso de broncodilatador e doença vascular periférica. A necessidade do emprego de vasopressor e sua dose administrada, assim como a utilização de diuréticos, foi identificada como fator de risco perioperatório para a ocorrência de LRA (Kheterpal, 2007; Kheterpal, 2009).

Embora recentes avanços tenham ocorrido, proporcionando melhor entendimento da fisiopatologia e da recuperação da lesão renal, particularmente da recuperação da lesão renal perioperatória, ainda não foi encontrada nenhuma terapia efetiva para evitá-la (Mahon, 2006).

1.2 ISQUEMIA E REPERFUSÃO (I/R)

A isquemia é a ausência ou diminuição do fluxo sanguíneo para o tecido e contribui para várias condições fisiopatológicas, como infarto do

miocárdio, insuficiência vascular periférica, acidente vascular cerebral e choque hipovolêmico. A restauração do fluxo sanguíneo para o órgão isquêmico (reperfusão), embora seja necessária para evitar a lesão celular irreversível, ocasiona maiores lesões celulares do que as causadas pela própria isquemia. Esse dano celular, após a reperfusão de um tecido previamente isquêmico, é denominado lesão de reperfusão. A lesão de isquemia e reperfusão (I/R) causa resposta inflamatória local e sistêmica, podendo resultar em disfunção múltipla de órgãos e sistemas (DMOS) e morte do paciente (Collard, 2001).

Transplantes renais estão, inevitavelmente, associados a um período de isquemia, que começa na captação do órgão do doador e se estende até sua reperfusão no receptor. A reintrodução do fluxo sanguíneo ao rim isquêmico, embora necessária para resgatar o órgão da necrose e da perda permanente da função, pode causar lesão celular e lesão renal (Snoeijs, 2010).

Dependendo da gravidade da lesão renal causada pela isquemia e pela reperfusão (I/R), 5% a 50% dos transplantes de rins de cadáveres necessitam de diálise na primeira semana após a cirurgia, devido ao funcionamento tardio do enxerto (FTE). O FTE está associado ao aumento do risco de rejeição aguda e de perda do enxerto, além de maiores níveis séricos de creatinina nos primeiros anos de seguimento pós-transplante (Yarlagadda, 2009).

Yang et al. mostraram a importância crucial dos leucócitos na lesão de isquemia e reperfusão. Após submeter rins de porcos à isquemia e reperfusão, com ou sem depleção de leucócitos, em um modelo de reperfusão do órgão isolado, observaram que os rins com depleção de leucócitos tiveram sua estrutura e função mais bem preservadas graças à redução da infiltração celular de mieloperoxidase. A mieloperoxidase está associada a diminuição da atividade da caspase-3, ativação da interleucina-1 β (IL-1 β) e aumento da apoptose (Yang, 2010).

A melhora da capacidade do rim em tolerar a lesão isquêmica tem importante implicação em sua recuperação (Bonventre, 2002).

1.3 PRÉ-CONDICIONAMENTO

1.3.1 Pré-condicionamento Isquêmico

Vários estudos têm mostrado que os rins e outros órgãos, quando expostos à isquemia intermitente por curtos períodos, se ajustam a essa situação e se tornam mais resistentes a insultos isquêmicos posteriores, sendo esse fenômeno denominado pré-condicionamento isquêmico (Murry, 1986; Chien, 1999; Chou, 2009).

Pré-condicionamento isquêmico (PCI) é um fenômeno bem estabelecido que descreve a adaptação tecidual ao estresse através de mecanismos de defesa intrínsecos, o que confere a esse tecido uma condição de maior resistência. Consiste em um pequeno período de isquemia seguido por reperfusão, o que protege o tecido de um subsequente e mais grave insulto de isquemia/reperfusão (Ambros, 2007).

Historicamente, foram Murry et al., em 1986, que conseguiram evidenciar que breves episódios de isquemia reduziram a velocidade de depleção da adenosina tri-fosfato (ATP) durante subsequentes episódios de isquemia miocárdica em cães, levando à diminuição do tamanho do infarto.

Posteriormente, em 1997, um estudo (Jenkins, 1997) mostrou evidências clínicas do pré-condicionamento isquêmico como proteção miocárdica, durante uma cirurgia de revascularização do miocárdio. Foram aplicados três minutos de isquemia seguidos por três minutos de reperfusão, através de clampeamento aórtico, antes de um período de isquemia maior (10 a 15 minutos), necessário para a realização da anastomose coronariana. Os resultados obtidos nesse estudo foram níveis séricos mais baixos de troponina nos pacientes que tiveram o miocárdio pré-condicionado.

Em estudos sobre os rins, Zager et al. demonstraram aumento da resistência à isquemia nos órgãos expostos à isquemia prévia. No entanto, acreditava-se que esse efeito protetor não se manifestava antes de 24 horas

após o evento isquêmico inicial, e que esse, muito provavelmente, não era subletal (Zager, 1984; Zager, 1985).

Desde a descrição inicial do PCI no miocárdio (Murry, 1986), seu mecanismo de ação tem sido elucidado e revisto. Algumas vias e aspectos são bem claros, mas outras ainda permanecem incertas e especulativas. Todo o conhecimento sobre esse mecanismo vem de estudos realizados em órgãos e espécies distintas e, embora alguns mecanismos sejam comuns, existem discrepâncias na literatura com relação às diferenças atribuídas a espécies, tecidos e modelos utilizados (Ambros, 2007).

Jia et al. (2009) utilizaram 36 ratos divididos em seis grupos de seis animais (três grupos de doadores e três grupos de receptores). Os grupos de doadores foram assim preparados: A - sham; B - transplante e C – pré-condicionamento com 15 minutos de isquemia seguidos por 10 minutos de reperfusão antes do transplante. Após 24 horas, os níveis de ureia e creatinina foram iguais nos grupos B e C e maiores que no grupo A. No entanto, os graus de lesão tubular foram significativamente maiores no grupo B, quando comparados ao grupo C, o que evidenciou redução da lesão do enxerto renal em sua fase precoce, quando existiu o pré-condicionamento isquêmico. A expressão do TNF- α mRNA também foi menor no grupo C, sugerindo que o PCI suprime a ativação do TNF- α que é induzida pela I/R.

1.3.2 Pré-condicionamento Precoce e Tardio

O pré-condicionamento é dividido em duas fases. Há uma fase precoce (pré-condicionamento precoce) que se instala logo após a lesão isquêmica e perdura por algumas horas (de três a quatro horas). E há uma fase tardia (pré-condicionamento tardio) que se inicia 24 horas depois. Essas fases têm mecanismos fisiológicos diferentes e estão resumidas nas Figuras 1 e 2 (Riksen, 2004).

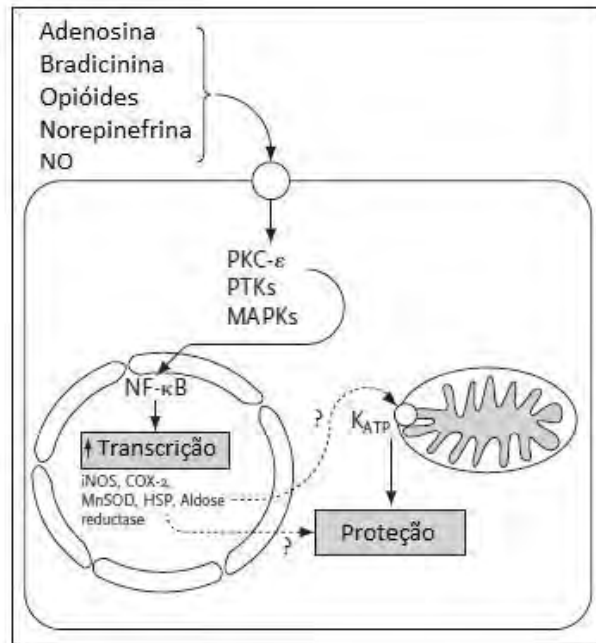


Figura1 - Representação simplificada do mecanismo de pré-condicionamento precoce. K_{ATP}= canal de potássio sensível à adenosina tri-fosfato; MAPKs= proteínas cinases ativadas por mitógenos; MPTP= poro de transição de permeabilidade mitocondrial; PI3K= enzima fosfatidilinositol-3-cinase; PKC= proteína cinase C; PTKs = proteínas tirosina cinases; ROS= espécies reativas de oxigênio (Adaptado de Riksen et al., 2004).

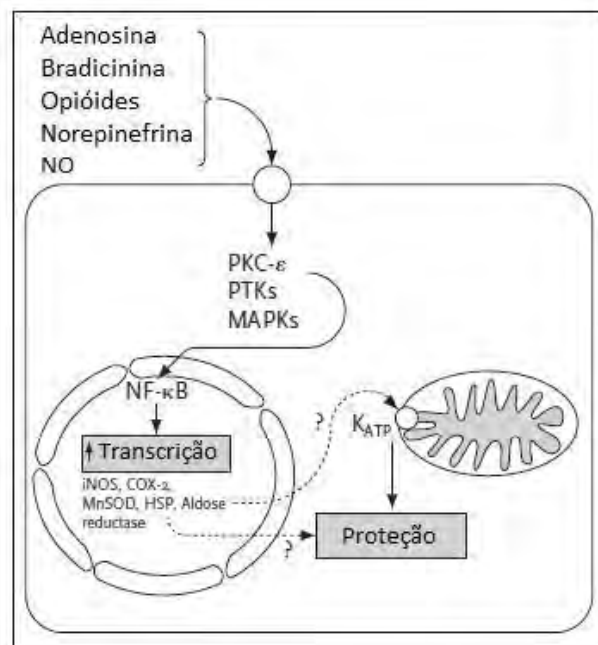


Figura 2 - Representação simplificada do mecanismo de pré-condicionamento tardio. COX-₂= ciclo-oxigenase 2; HSP= proteína de choque térmico; iNOS= óxido nítrico sintase induzível; K_{ATP}= canal de potássio sensível à adenosina tri-fosfato; MAPKs= proteínas cinases ativadas por mitógenos; MnSODsuperóxido dismutase manganês; NF-KB= fator de necrose tumoral kappa-beta; NO= óxido nítrico; PI3K=enzima fosfatidilinositol-3-cinase; PKC-ε= proteína cinase C épsilon; PTKs= proteínas tirosina cinases. Adaptado de Risken et al., 2004.

As cinases (como as citadas nas Figuras 1 e 2) são conhecidas como fosfotransferases, ou seja, um tipo de enzima que transfere grupos fosfatos de doadores de moléculas de grande energia, como o ATP, para substratos específicos, por um processo denominado fosforilação. Um dos maiores grupos de cinases são as proteínas cinases, que têm papel importante na transmissão de sinais e controle de processos celulares complexos (Manning, 2002).

1.3.3 Lesão e Reparação Renal

Os rins compartilham com a maioria dos órgãos a habilidade de reparar e repor suas estruturas, após estas serem submetidas a algum grau de lesão. Esse processo, conhecido como reparação celular, é intensificado pela reativação da mitose e proliferação das células vizinhas à lesão, podendo resultar na restauração de sua arquitetura normal após uma lesão aguda (Sharples, 2007).

A resposta estrutural das células tubulares a uma lesão isquêmica é multifacetada, incluindo as seguintes transformações celulares: perda da polaridade e da borda em escova, necrose e apoptose, indiferenciação das células viáveis, proliferação e restituição do epitélio normal. Ver Figura 3 (Devarajan, 2006).

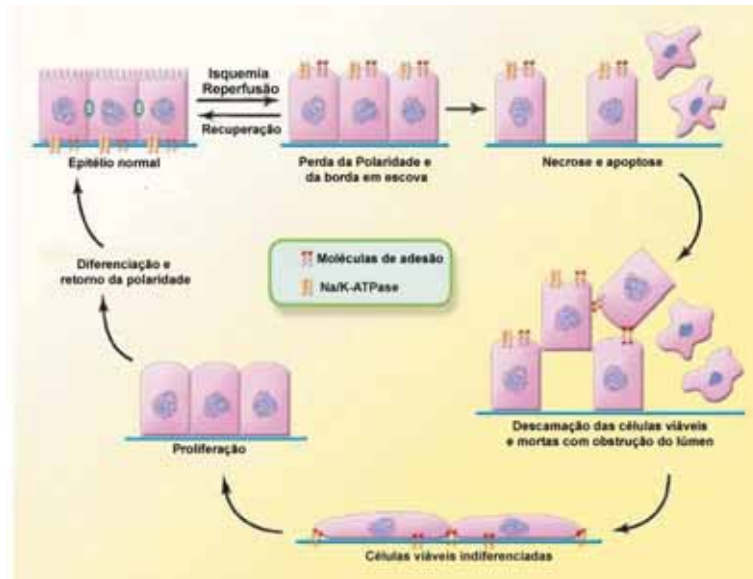


Figura 3 - Representação simplificada das alterações na estrutura das células tubulares após lesão renal aguda. Após a fase inicial segue-se lesão subletal, com perda da borda em escova, da polaridade e da estrutura. Se a lesão for aliviada nesse estágio, sucede-se completa recuperação. (Adaptado de Dejavaraajan, 2006.)

A apoptose, ou morte celular programada, é um processo ativamente regulado de suicídio celular (Kerr, 1972), com diferenças morfológicas e biológicas da necrose.

O processo requer energia, transcrição de genes e síntese proteica (Sellins, 1987). As células apoptóticas são encolhidas, têm a cromatina condensada que formam corpos apoptóticos e são englobadas pelas células a sua volta. Diferentemente da necrose, a apoptose não provoca liberação do conteúdo celular para os tecidos adjacentes, nem reações inflamatórias.

Se a lesão isquêmica das células renais é mantida, uma sequência de eventos é desencadeada, com consequente desequilíbrio entre a restauração e a morte das células tubulares renais. Ver Figura 4 (Devarajan, 2006).

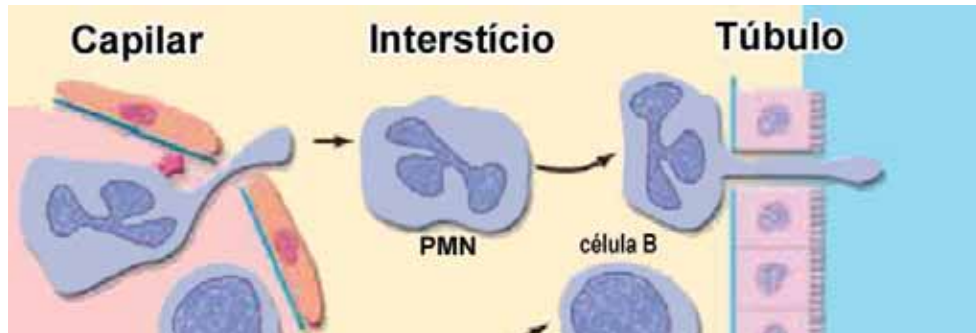


Figura 4 - Representação simplificada das alterações na estrutura das células tubulares após lesão renal aguda. Se a lesão isquêmica das células renais é mantida, uma sequência de eventos é desencadeada, com consequente desequilíbrio entre a restauração e a morte das células tubulares renais (Devarajan, 2006).

A isquemia resulta na desintegração de duas proteínas polarizadas denominadas NaK-ATPase e integrinas. Essa desintegração das NaK-ATPase acontece graças a uma hiperfosforilação, resultando em diminuição da reabsorção de sódio pelas células tubulares renais. A perda da polaridade das integrinas leva ao descolamento das células viáveis da membrana basal (descamação) e, conseqüentemente, à adesão excessiva às células tubulares (Woroniecki, 2003).

As integrinas do tipo B são consideradas essenciais para a manutenção da integridade das células tubulares renais (Molina, 2005).

1.3.4 Pré-condicionamento Farmacológico

O pré-condicionamento de um órgão também pode acontecer através da administração de fármacos, que confere a ele uma tolerância temporária a posteriores insultos de mesma origem ou de origem similar, sendo denominado pré-condicionamento farmacológico (Sadovnikoff, 2001).

Bonventre, em um artigo de revisão, faz uma descrição histórica de quando Suzuki, ainda no início do século passado, observou que o epitélio do túbulo proximal regenerou depois de uma lesão nefrotóxica causada por urânio, observando ainda que, após essa primeira lesão, havia resistência aumentada

a uma subsequente nefrotoxicidade provocada por esse elemento. De acordo com Bonventre, além de Suzuki, outros autores relataram a mesma ocorrência e mais alguns ainda narraram fatos semelhantes provocados pela nefrotoxicidade do glicerol (Bonventre, 2002).

Para preservar a função e a integridade morfológica do órgão após I/R, tem-se tentado várias técnicas, como a indução das proteínas de choque térmico (Heat Shock Protein - HSP) por estimulação térmica (Marber, 1995) ou administração de fármacos (Lopez-Neblina, 1996). A ciclosporina, objeto desse estudo, é um dos fármacos que tem sido utilizado em muitas pesquisas, na tentativa de mostrar sua função protetora orgânica em situações de sofrimento hipóxico nos vários tecidos (Abdelrahman, 2004; Guneli, 2007; Jia, 2009; Kim, 2010).

Portanto, a terapia com o pré-condicionamento pode oferecer uma nova via para o tratamento dos pacientes críticos, seja ela realizada através de métodos clássicos ou por agentes farmacológicos, especialmente nos pacientes com septicemia ou disfunção múltipla de órgãos e sistemas (DMOS) (Rock, 2002).

Spieckermann et al. (1969) revelaram os benefícios do uso dos anestésicos voláteis durante a isquemia miocárdica. Durante a anestesia com o halotano, foram observados tolerância prolongada à isquemia global e aumento da preservação de componentes de alta energia em coração de cães.

Estudos demonstraram que os anestésicos voláteis reduzem a demanda de oxigênio durante a isquemia, reduzindo a lesão isquêmica (Davis et al., 1983; Buljubasic et al., 1992, 1993).

Como não se conseguiu relacionar os efeitos anti-isquêmicos de anestésicos voláteis com a melhora no equilíbrio miocárdico entre suprimento e demanda de oxigênio, levantou-se o conceito de que tais agentes poderiam ter propriedades cardioprotetoras diretas (Kersten et al., 1996).

Autores relataram uma proteção específica contra a lesão de reperfusão do miocárdio conferida pelo halotano; enquanto os estudos

anteriores não discriminaram entre os efeitos anti-isquêmicos e os efeitos protetores contra a lesão de I/R, esse estudo demonstrou, pela primeira vez, uma modificação das condições de reperfusão pela administração de um anestésico que reduziu o grau da lesão de reperfusão (Schlack et al., 1996).

Muitos fármacos utilizados na anestesia conferem proteção aos órgãos por meio de mecanismos semelhantes ou dividem as vias de ativação-inibição ao pré-condicionamento isquêmico.

Lorsomradee et al. (2008) propõem algumas semelhanças entre o pré-condicionamento isquêmico e o pré-condicionamento farmacológico produzido pelos anestésicos voláteis (Figuras 5A e 5B).

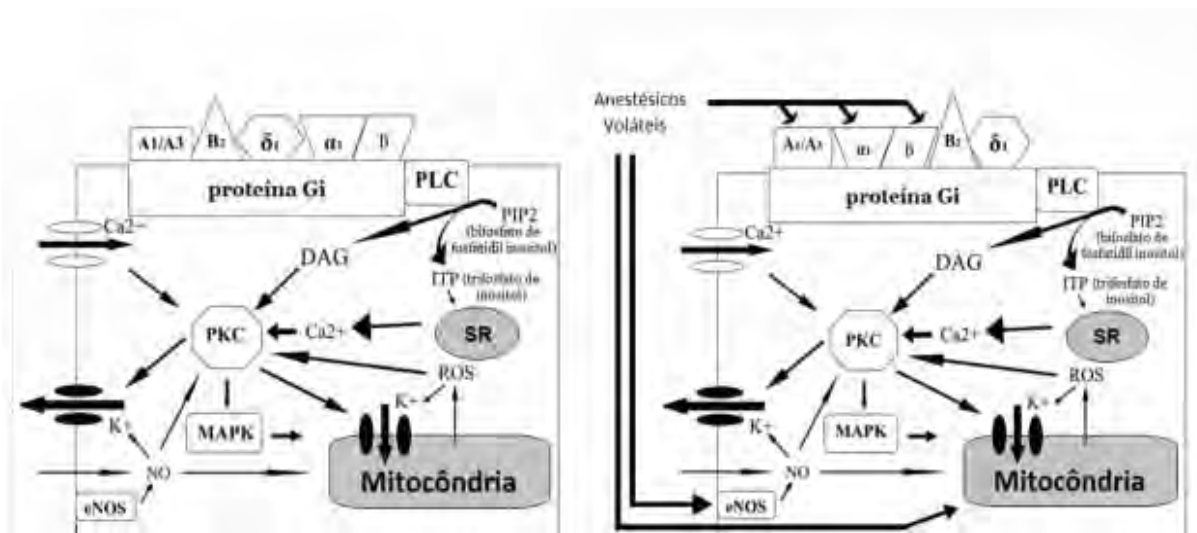


Figura 5A - Mecanismo celular do pré-condicionamento isquêmico. Adaptado de Lorsomradee et al., 2008.

Figura 5B -Mecanismo celular do pré-condicionamento pelos anestésicos voláteis. Adaptado de Lorsomradee et al., 2008.

A1/ A3 = receptores de adenosina A₁ e A₃, B2 = bradicinina, δ₁ = receptor opióide, α₁ = receptor adrenérgico, β = receptor adrenérgico, DAG = diacilglicerol, Gi = proteína G inibitória ligada ao nucleotídeo guanina, PLC = fosfolipase C, ITP = 1,4,5 trifosfato de inositol, MAPK = proteína cinase ativada por mitógeno, NO = óxido nítrico, eNOS = óxido nítrico sintase endotelial, PIP2 = biofosfato de fosfatidil inositol, PKC = proteína cinase C, ROS = espécies reativas de oxigênio, SR = retículo sarcoplasmático, Ca²⁺ = cálcio, K⁺ = potássio (adaptada de Lorsomradee et al, 2008).

A ativação dos receptores de adenosina A_1 e A_3 (A_1/A_3), bradicinina (B_2), δ_1 opioide (δ_1), α_1 – adrenérgico (α_1) e β -adrenérgico estimulam a fosfolipase C (PLC) por meio da inibição da proteína G_i (proteína G_i = nucleotídeo de guanina ligado a proteínas). A PLC produz diacilglicerol (DAG) e 1,4,5 trifosfato de inusitol (ITF). O DAG e o ITF ativam a proteína cinase C (PCK). A PCK atua abrindo canais de potássio sensíveis a ATP (canais K_{ATP}) e, provavelmente via proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) (Lorsomradee et al., 2008).

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

A abertura dos canais mitocondriais de K_{ATP} , o aumento de espécies reativas de oxigênio mitocondriais (ROS), a ativação ou a translocação da proteína cinase C, da proteína tirosina cinase e proteína cinase p38 ativada por mitógeno diminuem a entrada mitocondrial do cálcio (Figuras 6A e 6B) (Lorsomradee et al., 2008).

Os anestésicos voláteis aumentam a abertura dos canais de K_{ATP} pela ativação da fosfolipase C (PLC), por meio da adenosina A_1 e A_3 (A_1/A_3), pela estimulação do receptor adrenérgico e pela ativação da sintase do NO endotelial (eNOS) (Lorsomradee et al., 2008).

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

A utilização dos anestésicos voláteis durante a isquemia do miocárdio parece suprimir a ativação de neutrófilos, a interação neutrófilo-endotélio e as respostas inflamatórias que causam a disfunção miocárdica (Louvier & Lancon, 1994; Kowalski et al., 1997; Heindl et al., 1998, 1999a, 1999b; Hu et al., 2003).

Demonstrou-se que os anestésicos voláteis pré-condicionam diretamente (Kersten et al., 1996; Cason et al., 1997) ou aumentam o PCI

indiretamente, resultando em proteção cardíaca contra infarto do miocárdio, e o canal K_{ATP} tem papel importante (Kersten et al., 1997). Assim, o pré-condicionamento farmacológico produzido por anestésicos voláteis, incluindo isoflurano, desflurano e sevoflurano, é muito similar ao PCI (Julier et al., 2003; Tanaka et al., 2004) e compartilha com o PCI muitos dos elementos transdutores de sinais.

O coração tem sido um dos órgãos mais estudados com relação à proteção pelos anestésicos voláteis. A gravidade da lesão isquêmica depende da duração da isquemia, mas ela pode ser modificada por intervenção antes que ocorra a isquemia (Kato & Foex, 2002; Sommerschild & Kirkeboen, 2002; Tanaka et al., 2004; De Hert et al., 2005).

A pesquisa de Zaugg et al. (2002a) demonstrou que os anestésicos voláteis mimetizam o pré-condicionamento cardíaco por iniciar a ativação dos canais de potássio mitocondriais ($mitoK_{ATP}$), por meio de múltiplas vias de sinalização. Em outro estudo, esses autores agruparam os anestésicos de acordo com seu efeito de potencialização ou de inibição da atividade protetora sobre miócitos cardíacos isolados de ratos adultos. Desse modo, aumentariam a proteção, o sevoflurano, o isoflurano, o fentanil, o tricloroetanol e o uretano. O efeito inibitório, que diminui a proteção, seria exercido pelo tiopental sódico, pentobarbital sódico e *R(-)*cetamina. Não foi observado efeito na atividade do canal com o etomidato, o propofol, a *S(+)*cetamina, o midazolam e a xilazina (Zaugg et al., 2002b). Um estudo mais recente mostra maior proteção renal, ao fenômeno I/R, com o uso do tiopental e do propofol (Dogan et al., 2010).

Julier et al. (2003) observaram que o pré-condicionamento do sevoflurano, em cirurgias de revascularização do miocárdio, foi associado à redução da liberação da cistatina C, um marcador da função renal.

Diferentes modalidades de administração do sevoflurano, antes (pré-condicionamento), durante e após a cirurgia de revascularização do miocárdio, foram investigadas. Nesse estudo, somente a administração do sevoflurano,

durante todo o procedimento, teve efeito significativo na diminuição da liberação do marcador de lesão, a troponina I (De Hert et al., 2004).

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

Kong et al. (2010) estudaram a função renal em modelo de transplante hepático em ratos e compararam o sevoflurano com o hidrato de cloral. Com base nessa avaliação, concluíram que o sevoflurano pode modular cascatas inflamatórias e atenuar a lesão renal.

Com relação aos opioides, Zhang et al. (2005) observaram que, no pré-condicionamento pelo remifentanil, os receptores opioides cardíacos delta e kappa são os responsáveis pela mediação cardioprotetora, e não os receptores mu. Estariam envolvidos nesse efeito a proteína cinase C e o canal K⁺ mitocondrial. Em um experimento com um modelo animal semelhante ao desse estudo, ao examinar o efeito do isoflurano, do remifentanil e da associação de ambos no PCI renal, não foi observada proteção no grupo do isoflurano, mas quando o isoflurano foi associado ao remifentanil, ocorreu um efeito benéfico, demonstrado pela avaliação dos valores da creatinina plasmática e do estudo da citometria de fluxo (Vianna et al., 2009).

Desde 1985, McCord já havia determinado que os radicais livres derivados de oxigênio desempenham um importante papel em muitos modelos de I/R experimentalmente induzido em laboratórios. Em vários modelos experimentais, os tecidos reperfundidos foram protegidos por varredores de radicais superóxidos. A disfunção induzida pelos radicais livres pode ser um componente importante nas doenças isquêmicas do coração, do intestino, do fígado, do cérebro e dos rins.

O propofol é um hipnótico lipofílico com atividade antioxidante comprovada *in vitro* e *in vivo*. Murphy et al. (1992) observaram o efeito antioxidante do propofol (2,6 diisopropilfenol) pela reação com radicais livres (para formar um radical fenoxil), uma propriedade comum das substâncias do tipo fenóis varredoras de radicais livres. Mesmo as baixas concentrações examinadas, de 10^{-6} a 10^{-5} mol.L⁻¹, foram capazes de varrer duas espécies de radicais livres. Os autores concluíram que as propriedades de varredura de radicais livres do propofol aproximam-se das do antioxidante endógeno alfa-tocoferol, a vitamina E. As Figuras 6 e 7 mostram as semelhanças químicas estruturais entre o propofol e a vitamina E.

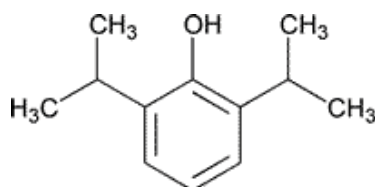


Figura 6 - Fórmula estrutural do 2,6 diisopropilfenol (propofol)

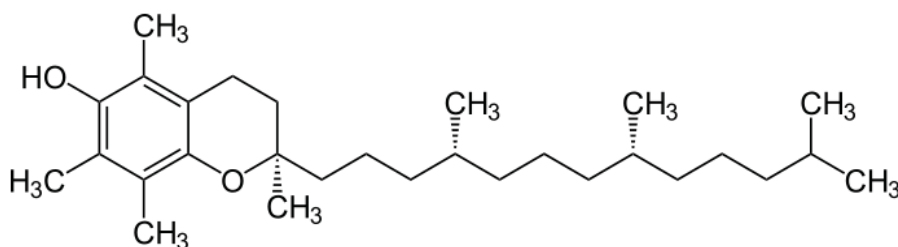


Figura 7 - Fórmula estrutural do alfa-tocoferol (vitamina E).

A varredura dos radicais livres de oxigênio reduz as ligações sulfídricas nas proteínas e inibe a peroxidação lipídica induzida pelo estresse oxidativo durante o período de isquemia e reperfusão do órgão.

Em um estudo experimental, em suínos, em que o propofol ($4 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e o sevoflurano (concentração expirada final de 1,5%) foram comparados, foi

encontrada proteção renal com o propofol, em episódio de isquemia e reperfusão causado pelo clampeamento da aorta durante 30 minutos, acima da bifurcação das artérias renais. No pós-operatório, os valores da creatinina plasmática foram significativamente menores no grupo de animais anestesiados com o propofol quando comparado com o grupo do sevoflurano. Os animais anestesiados com o propofol apresentaram menor infiltração de neutrófilos, menores níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias, menor produção de radicais livres derivados de oxigênio, menor peroxidação lipídica e redução da atividade da sintase do NO induzível (iNOS), quando comparados com os anestesiados com o sevoflurano (Rodriguez-Lopez et al., 2006).

Em um estudo realizado em ratos hiperglicêmicos, o propofol foi capaz de causar proteção ao tecido cerebral pela inibição da peroxidação lipídica, reduzir o acúmulo de lactato e o edema do tecido cerebral isquêmico (Yamaguchi et al., 2000).

O papel do propofol na imunidade, durante a sepse, foi investigado com base no estudo da citotoxicidade e da apoptose em células mononucleares. Não ocorreram alterações na citotoxicidade e na apoptose em concentrações clinicamente aceitáveis de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Diferenças significativas na citotoxicidade ($p < 0,04$) e na apoptose ($p < 0,02$) foram encontradas com doses de propofol de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os autores concluíram que, em termos de citotoxicidade e apoptose, em condições de sepse, o propofol permitiu às células mononucleares reterem a citotoxicidade protegendo-as da apoptose (Song & Jeong, 2004).

Em um modelo de isquemia e reperfusão intestinal, foi observado que o propofol reduziu a intensidade da lesão da mucosa do intestino. Os autores atribuíram essa ocorrência ao efeito antioxidante do propofol e à inibição do aumento da produção do NO e dos níveis de endotelina-1 (Liu et al., 2007).

O efeito antioxidante do propofol, avaliado pela inibição da produção de peroxidase lipídica, também foi comprovado em um experimento realizado com plaquetas de pacientes submetidos à cirurgia (De La Cruz et al., 1999).

Em um estudo comparativo com 24 pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea, entre o uso do fentanil ou do propofol para a manutenção da anestesia em cirurgias cardíacas, mostrou que os pacientes anestesiados com o fentanil tiveram os níveis de peroxidação lipídica significativamente maiores ($p < 0,05$) do que os dos pacientes anestesiados com o propofol, que não apresentaram aumento ($p > 0,05$). Os autores concluíram que, em doses clínicas de 3 a 6 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, o propofol atenua significativamente a peroxidação lipídica (Sayin et al., 2002).

Estudo com células endoteliais de aorta bovina submetidas à hiperglicemia observou que concentrações anestésicas de propofol preveniram o comprometimento da produção de NO dependente do cálcio. Atribuíram o efeito, principalmente, à redução do acúmulo de superóxido (O_2^-) e, pelo menos em parte, à inibição da captação celular da glicose (Karashima et al., 2002).

Tsuchiya et al. (2002) demonstraram, em pacientes submetidos a gastrectomia, que o propofol protege os eritrócitos do estresse oxidativo e também do estresse físico, aumentando a fluidez da membrana. Após a cirurgia, a hemólise foi menor no grupo do propofol quando se comparou este a um grupo de pacientes anestesiados com sevoflurano. Os autores consideraram o propofol como um fármaco de alto potencial e eficiência antioxidante.

Em cirurgia cardíaca, o propofol na dose de 120 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, iniciada 10 minutos antes da circulação extracorpórea, reduziu as concentrações de troponina I e elevou os índices cardíacos no pós-operatório, quando comparado com isoflurano ou com doses menores de propofol de 60 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (Xia et al., 2006).

Estudos mostram que, após a isquemia, o propofol diminui a insuficiência miocárdica, o tamanho do infarto e a degeneração histológica (Ko et al., 1997; Kokita et al., 1998; Mathur et al., 1999; Yoo et al., 1999; Javadov et al., 2000). Esse fármaco atenua o influxo do cálcio na célula (Yoo et al., 1999; Nakae et al., 2000) e suprime a atividade dos neutrófilos (Skoutelis et al., 1994;

Buljubasic et al., 1996). Tais informações sugerem que o propofol pode atuar na fase crítica da lesão de reperfusão reduzindo os radicais livres, o influxo do cálcio celular e a atividade dos neutrófilos, sem agir como agente pré-condicionante (Kato & Foex, 2002). Um estudo demonstrou proteção quando o coração foi tratado com o propofol somente na fase de reperfusão (Kokita et al., 1998). A adição da glibenclamida, bloqueador do canal de K_{ATP} , não aboliu o efeito protetor do propofol (Mathur et al., 1999).

Dogan et al. (2010) compararam a injeção de tiopental, propofol, solução de intralipid, etomidado e cetamina 15 minutos antes do período de isquemia, em um modelo experimental de I/R renal, em ratos, com tempos de isquemia de 60 minutos e reperfusão de 60 minutos. Com a avaliação dos valores sorológicos do malondialdeído (MDA), da atividade da catalase (CAT) e do superóxido dismutase (SOD) concluíram que o propofol e, especialmente, o tiopental são eficientes na proteção contra a lesão de I/R no rim.

Yuzbasioglu et al. (2010), em um modelo experimental de I/R em ratos, com tempos de isquemia de 60 minutos e reperfusão de 60 minutos, estudaram os efeitos protetores da injeção intraperitoneal de uma solução de intralipid a 10% (250 mg.kg^{-1}) ou propofol (25 mg.kg^{-1}), com avaliação histológica e valores sorológicos do malondialdeído (MDA), da atividade da catalase (CAT) e do superóxido dismutase (SOD). A avaliação histológica do grupo de controle submetido apenas ao episódio de I/R mostrou comprometimento renal com edema das células tubulares, edema intersticial, congestão medular e dilatação tubular. Os níveis de MDA e os escores de avaliação histológica foram menores no grupo que recebeu o propofol do que nos grupos controle e intralipid. Os autores atribuíram ao efeito antioxidante do propofol a proteção funcional, bioquímica e morfológica contra a lesão da I/R.

1.4 CICLOSPORINA (CsA)

Nos últimos 25 anos, a ciclosporina tem melhorado a sobrevivência de transplantados de fígado, coração e rim. Entretanto, com seu uso crescente,

apareceram evidências que a terapia com CsA proporcionava efeitos colaterais, sendo a toxicidade renal o mais importante (Cattaneo et al., 2004).

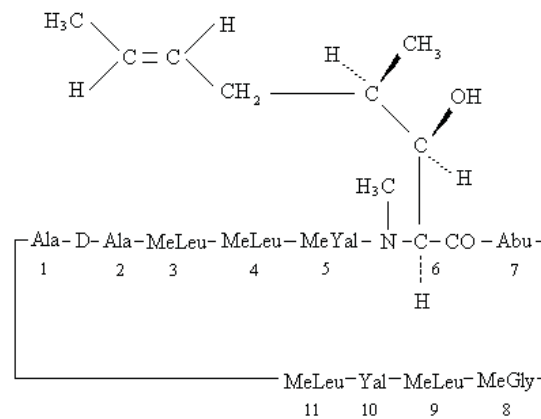
A CsA é um potente agente imunossupressor utilizado para prevenir a rejeição em transplantes de órgãos, sendo efetiva em doses relativamente baixas no tratamento de várias doenças autoimunes como artrite reumatoide, psoríase e Doença de Crohn. É um metabólito polipeptídico cíclico extraído de um fungo do solo, *Tolypocladium inflatum*, originalmente isolado na Noruega.

A CsA, com base no sítio de ação imunorregulatório, é classificada como inibidora da transcrição do primeiro sinal para ativação do linfócito T (Foxwell et al., 1990; Graham, 1994).

A ação supressora depende da formação de um complexo heterodimérico com seu receptor no citoplasma das células T, a ciclofilina A. A ciclofilina A é uma peptil-propil-isomerase que se liga à atividade da fosfatase da calcineurina e a inibe, resultando no bloqueio da expressão de genes de proteínas nucleares envolvidas na ativação celular e na formação do linfócito T citotóxico. Uma dessas proteínas, o fator nuclear de células T ativado (NFAT), se desloca para o núcleo, onde se liga com a região promotora de genes interleucina 2(IL2), interleucina 4(IL4) e interferon gama(IFN- γ) causando a transcrição deles e a secreção das referidas citocinas. O bloqueio do NFAT é considerado, portanto, o principal efeito da CsA (Kahan, 1989; Fruman et al., 1992). Independentemente de sua ação imunossupressora, a CsA inibe fortemente a abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial (mPTP), através da modulação da ligação da ciclofilina D (CypD) com outros componentes do poro (Gateau-Roesch et al., 2006). A ciclosporina é considerada uma inibidora da abertura do mPTP por evitar a ligação da CypD ao translocador do nucleotídeo adenina (ANT). Essas duas proteínas, juntamente com o canal aniônico voltagem dependente (VDAC), são especuladas como integrantes da conformação do mPTP.

A CsA circula associada às lipoproteínas, sendo metabolizada por meio do citocromo P450 em, pelo menos, 25 metabólitos. O uso da CsA introduziu a

monitorização farmacocinética na imunossupressão. Foi demonstrada uma correlação entre o nível residual mínimo de CsA com a eficácia e a toxicidade (Klintmalm et al., 1985; Irschik et al., 1994; Oellerich et al., 1998). A concentração elevada de CsA durante os primeiros 30 dias pós-transplante reduz marcadamente a incidência de rejeição aguda (Nankivell et al., 1994; Salomon et al., 2004;), e a nefrotoxicidade pode ser predita com concentrações maiores que $400 \mu\text{g.L}^{-1}$, enquanto a rejeição, com concentrações menores que $150 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Tedesco et al., 1992).



Ciclosporina A

Figura 8 - Fórmula estrutural da ciclosporina.

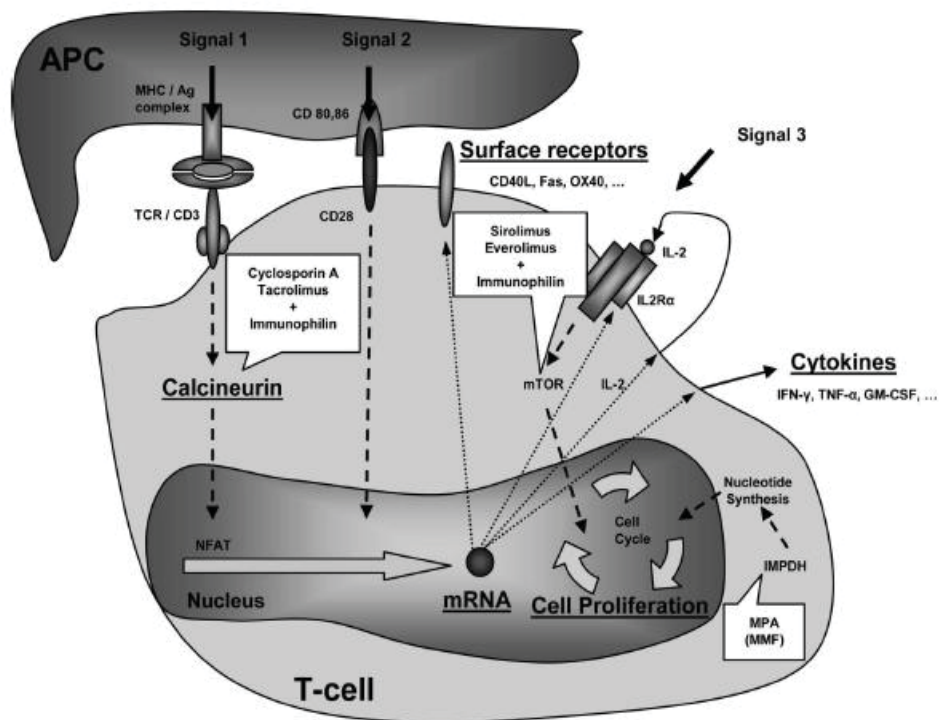


Figura 9 - Fórmula do mecanismo de ação da ciclosporina.

A CsA pode levar a um amplo espectro de danos à função renal, incluindo uma marcante e rapidamente reversível diminuição da hemodinâmica renal (nefrotoxicidade aguda) e uma forma crônica de lesão que progride irreversivelmente para o estágio final da doença renal (nefrotoxicidade crônica). Essas manifestações são consequência dos efeitos tóxicos do fármaco nos vasos renais e no interstício tubular (Cattaneo et al., 2004).

O termo “nefrotoxicidade da CsA” compreende duas formas particulares e bastante distintas de lesão renal. A nefrotoxicidade aguda é um fenômeno mediado hemodinamicamente, caracterizado pela ausência de alterações estruturais permanentes e pela reversibilidade, com a diminuição ou interrupção do fármaco. Já a nefrotoxicidade crônica é um processo de lesão insidioso associado com fibrose intersticial renal progressiva e irreversível, seguida por importante diminuição da função renal.

A nefrotoxicidade aguda induzida pela CsA se apresenta mais comumente por um aumento da creatinina sérica, assintomático e dose-

dependente, que pode ocorrer mesmo quando os níveis de ciclosporina no sangue estão ainda dentro da faixa terapêutica. Nesse paciente, a histologia renal geralmente é normal ou apresenta alterações inespecíficas, com vacuolização ou presença de mitocôndrias gigantes nas células tubulares. O parâmetro diagnóstico definitivo é a elevação da creatinina sérica uma semana após a redução da dose ou da interrupção do medicamento (De Mattos et al., 1996).

A nefrotoxicidade aguda é uma anormalidade funcional relacionada com o desequilíbrio local entre mediadores vasodilatadores e vasoconstritores que promove intensa vasoconstrição renal e que resultará, posteriormente, em diminuição do fluxo sanguíneo renal (FSR) e aumento da resistência vascular renal (RVR), com redução variável da taxa de filtração glomerular (TFG). A vasoconstrição ocorre preferencialmente na arteríola aferente e também em pequenas artérias adjacentes.

A interação da CsA com o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) parece ser fator fundamental na nefrotoxicidade aguda. Em ratos, o tratamento com CsA aumentou a atividade de renina plasmática, provocando hipertrofia e hiperplasia justaglomerular (Lee, 1997). Foram encontrados níveis elevados de pró-renina e renina total, em pacientes submetidos a transplantes de coração e fígado e tratados com ciclosporina A (Julien et al., 1993).

Existem várias evidências de que a CsA causa dano à célula endotelial vascular em pacientes transplantados tratados com CsA, comprovadas pelos níveis aumentados de muitos marcadores de lesão endotelial (Malyszko et al., 1996).

Substâncias produzidas por meio da ciclo-oxigenase, como as prostaciclina (vasodilatadora) e o tromboxano A₂ (vasoconstritor), têm papel importante no controle local do fluxo sanguíneo renal. A CsA provoca um desequilíbrio na relação vasoconstrição/vasodilatação desses metabólitos, favorecendo a vasoconstrição o que, provavelmente, está relacionado com o desenvolvimento das alterações funcionais associadas à nefrotoxicidade aguda

da CsA. O aumento na produção de tromboxano induzido pela CsA foi relacionado com a infiltração de plaquetas ativadas e macrófagos no tecido renal, aumento da peroxidação lipídica renal e produção de ROS (sigla em inglês que significa espécies reativas de oxigênio), com consequente lesão endotelial. Em receptores de transplante renal, a administração de inibidor de tromboxano-sintase foi associada com o crescimento da taxa de filtração glomerular (Koller-Strametz et al., 1999).

Scherrer et al., em 1990, demonstraram que a CsA era capaz de estimular o sistema nervoso simpático, relacionando isso à hipertensão arterial e às anormalidades hemodinâmicas renais e sistêmicas provocadas pela droga. A CsA aumenta a liberação de epinefrina, bloqueia calcineurina neuronal, ativa reflexos neuronais excitatórios e eleva a concentração de catecolaminas plasmáticas, fatores envolvidos ativamente na lesão renal.

A inibição da produção de radicais livres por antioxidantes resulta em melhora da função renal, em modelos experimentais de nefrotoxicidade aguda induzida pela CsA.

A nefrotoxicidade crônica induzida pela CsA está relacionada com a exposição prolongada e é caracterizada por fibrose intersticial tubular, que começa na medula e progride para o córtex renal. A lesão tem sido associada, classicamente, com alterações hialinas degenerativas nas paredes da arteríola aferente.

O estudo desse tipo de disfunção renal, induzida pela CsA, foge ao escopo desta pesquisa, que utilizou a ciclosporina A em dose baixa e única, conforme preconizado na literatura, com intenção de promover a inibição do mPTP e, assim, avaliar a possibilidade de proteger o rim da lesão da isquemia/reperfusão, em regime de hiperglicemia.

Estudos recentes demonstraram que o polo mitocondrial de permeabilidade transitória (mPTP) está envolvido no pós-condicionamento induzido pelo isoflurano, por meio da fosforilação e da inibição da GSK3 β (Feng et al., 2005).

Lie et al., em 2010, compararam o efeito cardioprotetor da ciclosporina A após oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda durante 40 minutos e o pré-condicionamento isquêmico, com dois períodos de 10 minutos de isquemia e 30 minutos de reperfusão; a conclusão desta pesquisa foi que, na dose de $20 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{kg}$, em *bolus*, a ciclosporina não reduziu a extensão do infarto.

Hirose et al. (2008) demonstraram que a hiperglicemia transitória ocorrida durante a isquemia/reperfusão provocou lesão renal mais grave quando comparada com a ocorrida em regimes de normoglicemia e quando a hiperglicemia se deu após a reperfusão renal.

Huhn et al. (2008) demonstraram que o pós-condicionamento realizado com isoflurano é abolido pela hiperglicemia e que essa cardioproteção pode ser restabelecida pela inibição do mPTP, com CsA, em animais hiperglicêmicos.

Krolikowski et al. (2005) evidenciaram que, ao se manter o mPTP fechado com ciclosporina A (CsA), a cardioproteção induzida pelo pós-condicionamento com isoflurano encontrava-se aumentada.

1.5 A LESÃO DA REPERFUSÃO

A lesão da reperfusão do miocárdio é um fenômeno complexo que envolve diversos mecanismos. A maioria dos efeitos deletérios da reperfusão é desencadeado nos primeiros minutos seguintes à reabertura do vaso obstruído (Piper et al., 2004). Entretanto, os problemas que ocorrem no período de reperfusão são determinados e criticamente dependentes das anormalidades isquêmicas prévias.

Durante a isquemia, o aumento da glicólise anaeróbica promove acúmulo progressivo de prótons e ácido láctico e, eventualmente, inibição do fluxo glicolítico e da síntese de ATP (Cour et al., 2010). A tentativa de corrigir a acidose através da bomba de Na^+ / H^+ provoca sobrecarga de Na^+ , que não pode ser extrusado do citosol, uma vez que a bomba de Na^+ / K^+ ATPase falha sem ATP suficiente. Ocorre, então, ativação da bomba de $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$, em seu

modo invertido, que ajuda a bombear Na^+ para fora da célula mas favorece o acúmulo de Ca^{2+} no citosol. Assim, a isquemia prolongada acarretará falência progressiva da homeostase iônica, com acúmulo intracelular de Na^+ e Ca^{2+} , diminuição dos níveis de ATP, extravasamento lisossomal, desarranjo do citoesqueleto, dano da membrana fosfolipídica e desenvolvimento de contratura isquêmica.

A reoxigenação resgatará a maioria das células comprometidas pela interrupção desses mecanismos citados anteriormente. Entretanto, muitos fatores podem contribuir para provocar lesões adicionais. Durante os minutos iniciais da reperfusão, a rápida correção da acidose, através da bomba de Na^+/H^+ , do cotransportador de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ e pela lavagem do lactato, causa uma ativação secundária da bomba de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, na direção invertida, agravando o acúmulo de Ca^{2+} no citosol. A re-exposição súbita da cadeia respiratória, inibida pela isquemia, ao oxigênio gera um potencial de membrana mitocondrial que promove a síntese de ATP, que leva a uma rápida sobrecarga de Ca^{2+} citosólico e, conseqüentemente, ao acúmulo de cálcio intracelular. Além disso, a reativação do metabolismo energético induz a produção maciça de ROS. Logo, na reperfusão, a sobrecarga de Ca^{2+} e a explosão de ROS podem ter conseqüências nocivas na integridade de estruturas celulares vitais. Esses fatores, associados à rápida correção do pH, promovem a perda da integridade mitocondrial graças à súbita alteração na permeabilidade da membrana, um evento conhecido como transição da permeabilidade mitocondrial (Crompton, 2000). Essa abrupta alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial interna provoca colapso energético incompatível com a sobrevivência celular.

Sem dúvida, a reperfusão limita lesões irreversíveis seguintes à isquemia prolongada; entretanto, ela tem sido considerada uma “faca de dois gumes”, uma vez que, por si só, pode ser responsável por lesões irreversíveis provocadas no tecido previamente isquemiado.

1.6 O PORO MITOCONDRIAL DE TRANSIÇÃO DA PERMEABILIDADE

Desde a descrição original do pré-condicionamento que uma gama de investigações experimentais foram realizadas para definir vias e sinais moleculares e celulares que esclareçam a redução da extensão do infarto. Existem evidências que o pré-condicionamento, através de autacóides, é capaz de ativar receptores de membrana na superfície celular. Estes autacóides recrutam vias de transdução de sinal tais como a *fosfatidilinositol-3-cinase-Akt* (PI3K-Akt) ou a *cinase regulada pelo sinal extracelular* (MEK1/2-ERK1/2) e várias isoformas da proteína cinase C (Ytrehus et al., 1994; Hausenloy et al., 2005). Estas vias convergem nas mitocôndrias e modulam suas funções, incluindo seu envolvimento na morte celular apoptótica ou necrótica.

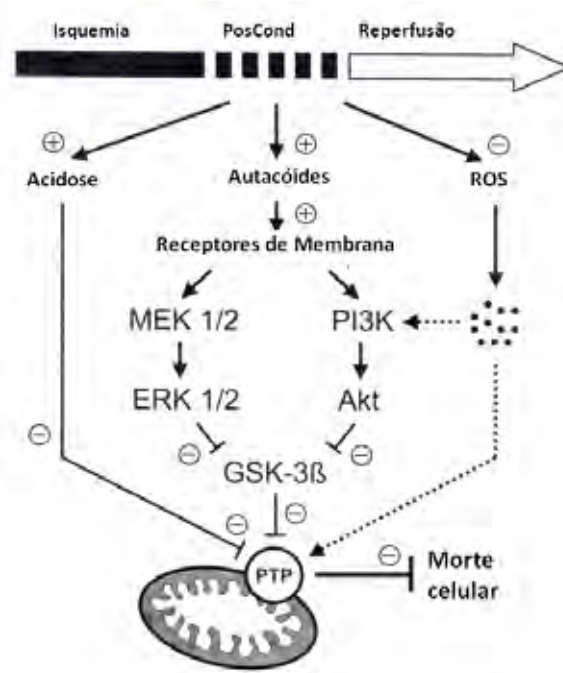


Figura 10 - Figura adaptada de Court et al., 2011.

Vários estudos experimentais demonstraram um papel fundamental da mitocôndria e do poro de transição da permeabilidade (mPTP) no processo da lesão de reperfusão (Kroemer et al., 1998; Weiss et al., 2003; Gateau-Roesch et al., 2006). Em condições fisiológicas normais, a membrana interna mitocondrial é impermeável a quase todos os íons e metabólitos e o mPTP encontra-se fechado. Sob condições de estresse, como aquelas em que ocorrem sobrecarga de Ca^{+2} e ROS, o mPTP pode se abrir e permitir a passagem de moléculas de até 1.500 D pela formação de grandes poros não seletivos. Esse fenômeno é chamado de transição da permeabilidade. Nesse caso, a força osmótica das proteínas intracelulares resulta em edema, levando à ruptura da membrana externa e liberação de fatores pró-apoptóticos, como citocromo c, no citosol. Além disto, a ruptura do potencial de membrana mitocondrial resulta numa alteração de comportamento da ATP sintase que passa a agir como ATPase, que acelera a depleção de energia.

Não se tem conhecimento pleno da estrutura molecular do mPTP. Acredita-se que o mPTP seja um complexo multiproteico de alta condutância e voltagem dependente que abrange as membranas interna e externa e envolve um canal aniônico de voltagem dependente (VDAC), um translocador de adenina nucleotídeo (ANT) e a ciclofilina D (CypD). O papel preciso do VDAC e do ANT ainda é obscuro e questionado (Koskoza et al., 2004; Baines et al., 2007). No entanto, a CypD é a única proteína definitivamente reconhecida como um componente molecular-chave do mPTP (Basso et al., 2005). De fato, foi relatado que, na presença de grande concentração de Ca^{+2} intracelular, a CypD modificava a conformação das proteínas da membrana interna mitocondrial, formando um megacanal e promovendo a transição da permeabilidade.

A abertura do mPTP é favorecida pelo potencial de membrana interna diminuído, baixos teores de ADP e ATP, acúmulo de fosfato inorgânico, sobrecarga de Ca^{+2} intracelular, estresse oxidativo e alcalinização e é inibida pela acidose e por alguns cátions intracelulares, como o Mg^{+2} . Como vemos, a I/R combina todas essas condições capazes de desencadear a abertura do

mPTP. Enquanto a isquemia, por si só, não parece capaz de provocar a abertura do mPTP, provavelmente em razão dos efeitos protetores da acidose intracelular, ela cria condições para que isso ocorra durante a reperfusão. Griffith et al. e Di Lisa et al. demonstraram que, de fato, a abertura do poro se dá nos minutos iniciais da reperfusão após prolongado período de isquemia. O tempo de abertura do poro parece corresponder à rápida correção do pH que ocorre na reperfusão.

Hausenloy et al., 2002, demonstraram que a CsA administrada na reperfusão limitou a extensão do infarto, em um modelo de coração de ratos isolados. Ao usar um modelo de infarto do miocárdio em coelhos vivos, Argaud et al., 2005, demonstraram que o pós-condicionamento isquêmico ou farmacológico com CsA administrada um minuto antes da reperfusão limitou em 50% a extensão do infarto.

Para associar o pós-condicionamento com o mPTP, o grupo da Universidade de Lyon (Argaud et al., 2005; Argaud et al., 2008; Argaud et al., 2010) estabeleceu um modelo para quantificar a sobrecarga de Ca^{+2} necessária para desencadear a abertura do mPTP. O pré ou pós-condicionamento ocorreu *in vivo* e, então, a mitocôndria era isolada da área de risco respectiva para avaliar a abertura do PTP *in vitro*. A seguir, a mitocôndria era exposta à administrações repetidas de CaCl_2 e, assim, era avaliada a quantidade de cálcio necessária para a abertura do poro.

Além disso, camundongos que apresentavam deficiência de CypD não puderam ser pós-condicionados, sugerindo que a lesão de reperfusão era mediada pela abertura do mPTP (Baines et al., 2005; Nakagawa et al., 2005).

1.7 HIPERGLICEMIA

Alguns fatores de risco conhecidos da doença cardiovascular (como hipercolesterolemia, hipertensão e diabetes) parecem aumentar muitas alterações da isquemia-reperfusão. Os mediadores inflamatórios liberados pela reperfusão podem ativar células endoteliais a distância, em órgãos remotos que não foram submetidos à lesão isquêmica inicial. Essa resposta a distância leva à lesão microvascular leucócito dependente, que é característico da síndrome de falência de múltiplos órgãos e sistemas (Carden & Granger, 2000).

A diabetes mellitus bloqueia a proteção do pré-condicionamento isquêmico precoce em cães (Kersten et al., 2000) e o tardio em coelhos (Ebel et al., 2003). Existe evidência clínica de bloqueio relevante do pré-condicionamento isquêmico em pacientes diabéticos (Ishihara et al., 2001).

A hiperglicemia aguda apresenta muitos efeitos deletérios, como a diminuição da vasodilatação, o comprometimento da geração de NO endotelial reativo, a diminuição de complementos, o aumento da expressão leucocitária e a adesão endotelial de moléculas, o aumento dos níveis de citocinas, o comprometimento da quimiotaxia e da fagocitose, levando ao aumento da inflamação, à vulnerabilidade, à infecção e à falência múltipla de órgãos (Turina et al., 2005).

Quando comparada com um grupo de controle, a diabetes experimentalmente induzida está associada ao aumento significativo no recrutamento de leucócitos aderentes e migrantes, maior extravasamento de albumina e a formação acelerada de oxidantes nas vênulas expostas à isquemia-reperfusão.

Os pacientes hiperglicêmicos têm níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias que podem levar à lesão tecidual. A mais proeminente, entre essas citocinas, é o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que pode causar lesão pulmonar ou renal (Yu et al., 2003). Esposito et al. (2002) demonstraram aumento dos níveis plasmáticos de TNF- α , interleucina-1, interleucina β e

interleucina-8 durante a hiperglicemia aguda; e a redução dessas citocinas inflamatórias após a administração de insulina.

Em 2001, Van den Berghe et al. publicaram um estudo randomizado, com 1.500 pacientes em Unidades de Terapia Intensiva cirúrgica, submetidos à terapia intensiva de insulina para manter os níveis de glicemia entre 80-110 mg.dL⁻¹, em que observaram a diminuição da morbidade, quando comparados com os pacientes submetidos ao tratamento padrão (níveis de glicemia entre 180-200 mg.dL⁻¹).

Em 2003, Furnary et al. preconizaram a infusão contínua de insulina para a manutenção de níveis glicêmicos normais, em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio, para diminuir a mortalidade hospitalar associada a diabetes.

Outros estudos mostram que o controle da glicemia, em cirurgia cardíaca, diminuiu a frequência de infecções, com a melhora da sobrevivência dos pacientes (Furnary et al., 2003; Doenst et al., 2005; Gandhi et al., 2005; Ouattara et al., 2005).

Van den Berghe et al. (2001) e Vanhorebeek et al. (2005) também propõem o controle estrito da glicemia para os pacientes críticos que possuem o risco de episódios de I/R.

Vários estudos demonstraram que a insulino-terapia intensiva, para a manutenção de níveis adequados da glicemia, melhorou os resultados dos pacientes com lesões neurológicas e infarto agudo do miocárdio (Malmberg et al., 1996; Azevedo et al., 2007; Bilotta et al., 2007).

Em um estudo internacional, realizado pelo grupo NICE-SUGAR, com 6.104 pacientes randomizados, em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), foi encontrado um aumento da mortalidade, em pacientes submetidos ao controle estrito (81-108 mg.dL⁻¹), quando comparados aos pacientes com níveis de glicemia abaixo de 180 mg.dL⁻¹. Os autores não sabem precisar se a redução dos níveis de glicose, o aumento da dose de insulina, a ocorrência de hipoglicemia ou fatores da metodologia do estudo influenciaram nos resultados,

porém não recomendam o uso do controle estrito da glicemia (81-108 mg.dL⁻¹) para pacientes de UTI (Finfer et al., 2009).

O papel da hiperglicemia em induzir disfunção renal ainda não é bem entendido. Estudos realizados em animais hiperglicêmicos com deficiência insulínica por destruição celular mostraram uma evolução mais grave da isquemia renal, quando comparados aos animais com normoglicemia (Di Filippo et al., 2005; Hartner et al., 2005; Chow et al., 2006).

O aumento da lesão renal parece estar relacionado com o exagerado estresse oxidativo e o aumento das respostas inflamatórias nos rins de animais hiperglicêmicos. Todavia, ainda não é muito claro como a hiperglicemia em animais não diabéticos pode ser lesiva para a função renal (Hirose et al., 2008).

A abertura dos canais de K⁺ mitocondriais resulta na liberação de radicais livres que ativam várias cinases, incluindo as proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPK) (Pain et al., 2000). Essas cinases têm demonstrado o envolvimento no PCI (Ping & Murphy, 2000; Yellon & Downey, 2003).

Em um estudo sobre o controle glicêmico, nas primeiras 100 horas após o transplante renal, com rim de cadáver, Thomas et al. (Thomas et al., 2001) observaram que, nos pacientes com controle da glicemia (média da glicemia < 11,2 mmol.L⁻¹), a rejeição ocorreu em apenas 11% deles (n = 3), enquanto nos pacientes com valores de glicemia maiores de 11,2 mmol.L⁻¹, a rejeição foi de 58%. Todos os pacientes sem controle glicêmico adequado tiveram infecção. Os autores concluem que a hiperglicemia pode estar associada com aumento do risco de rejeição e infecção pós-operatória em pacientes submetidos a transplante renal.

Ganji et al. (2007) verificaram maior incidência de episódios de rejeição aguda pós-transplante renal em pacientes com níveis glicêmicos mais elevados (249,67 ± 61,78 mg.dL⁻¹), quando comparados com pacientes portadores de menores níveis de glicemia (184,82 ± 73,35 mg.dL⁻¹), sugerindo que a

monitoração e o controle dos níveis glicêmicos no peri e pós-operatório podem reduzir a rejeição aguda.

A hiperglicemia aguda induzida em ratos, submetidos, por 45 minutos, à isquemia hepática parcial (70%), seguida de reperfusão, piorou a função hepática, aumentou o estresse oxidativo hepático, aumentou a resposta inflamatória e suprimiu a ativação de proteínas de choque térmico (Heat Shock Protein - HSP) (Behrends et al., 2010).

Em 2002, Tanaka et al., para testar a hipótese de que a diabetes mellitus interfere com o pré-condicionamento induzido pelo isoflurano, estudaram o efeito de um episódio de I/R no coração de cães e concluíram que o tamanho do infarto foi diretamente relacionado com as concentrações de glicose, mas essa relação foi abolida com altas concentrações de isoflurano. Kehl et al. (2002), em um estudo semelhante, porém com hiperglicemia aguda induzida pela injeção de solução de glicose a 15%, demonstraram o bloqueio do pré-condicionamento, induzido por isoflurano, pela hiperglicemia aguda.

A hiperglicemia induzida em cães, pela infusão de glicose, bloqueou o pré-condicionamento induzido pelo isoflurano, provavelmente devido à formação de quantidades excessivas de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Kehl et al., 2002, 2003).

Os antidiabéticos orais, como a glibenclamida, podem bloquear os canais K_{ATP} e evitar a proteção conferida pelo pré-condicionamento. Evidências recentes sugerem que os pacientes portadores de diabetes tipo II e doença coronariana podem ser beneficiados pela substituição da glibenclamida pela insulina, com menor grau de disfunção miocárdica induzida pela isquemia (Scognamiglio et al., 2002). O aumento da mortalidade por doença cardíaca isquêmica, observado em pacientes diabéticos com o uso de alguns hipoglicemiantes orais, levou a uma revisão no tratamento de pacientes diabéticos com angina, desde que as sulfonilureias, os hipoglicemiantes orais mais utilizados, bloqueiam os canais K_{ATP} e os possíveis efeitos cardioprotetores do pré-condicionamento isquêmico.

Com um coração de rato isolado e perfundido, Yellon & Downey (2003) mostraram que a glibenclamida bloqueia o efeito protetor do pré-condicionamento, diretamente atribuído aos canais mitoK_{ATP}, enquanto a glimeperida, com menor cardioespecificidade, não bloqueou esse efeito. Esses estudos têm implicações importantes no tratamento de pacientes diabéticos tipo II com doença cardíaca isquêmica ou que serão submetidos à isquemia miocárdica.

2 OBJETIVO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito da ciclosporina A (CsA) na lesão isquemia/reperfusão renal durante hiperglicemia transitória em ratos anestesiados com isoflurano e propofol.

3 MATERIAL E MÉTODO

A pesquisa foi realizada após autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp.

O estudo foi desenvolvido com 36 ratos da raça Wistar, machos, com pesos superiores a 250 gramas, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu, Unesp, que foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos.

3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram anestesiados com isoflurano, concentração inspirada de 3% na indução. A manutenção se deu com isoflurano em concentração de 1,5% a 2% ou com propofol $1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.

Todos os animais foram submetidos a intubação orotraqueal e ventilados mecanicamente com ventilador Rodent Ventilator model 683, da Harvard Apparatus, com frequência respiratória entre 60 e 90 incursões por minuto e volume corrente entre 1,5 ml a 2,5 ml. O ajuste da ventilação foi auxiliado pela capnometria e capnografia. Alterações na forma do capnograma, que indicassem obstrução do tubo traqueal, eram prontamente corrigidas com manobras de aspiração e limpeza, até a obtenção de uma ventilação adequada.

A anestesia inalatória, com aporte de oxigênio, foi implementada com utilização do aparelho de anestesia Ohmeda Excel 210 SE, com vaporizador calibrado Isotec 5 Ohmeda.

A manutenção venosa da anestesia com propofol se deu através de bomba de infusão ANNE® – Abbott Laboratories.

Grupo HISO (n = 6): anestesia com isoflurano. Injeção de 2,5 g de glicose intraperitoneal + SF 0,9% IV em igual volume à dose de ciclosporina cinco minutos antes da reperfusão. Após 30 minutos, laparotomia, nefrectomia direita e isquemia do rim esquerdo durante 25 minutos. Suspensão dos fármacos e despertar do animal. Após 24 horas, sob anestesia com isoflurano, nefrectomia esquerda para exame.

Grupo HP (n = 6): anestesia com propofol. Injeção de 2,5 g de glicose intraperitoneal + SF 0,9% IV em igual volume à dose de ciclosporina cinco minutos antes da reperfusão. Após 30 minutos, laparotomia, nefrectomia direita e isquemia do rim esquerdo durante 25 minutos. Suspensão dos fármacos e despertar do animal. Após 24 horas, sob anestesia com isoflurano, nefrectomia esquerda para exame.

Grupo HISOCsA (n = 6): anestesia com isoflurano. Injeção de 2,5 g de glicose intraperitoneal + 5 mg.kg⁻¹ de ciclosporina (CsA) IV cinco minutos antes da reperfusão. Após 30 minutos, laparotomia, nefrectomia direita e isquemia do rim esquerdo durante 25 minutos. Reperfusão do rim esquerdo. Suspensão dos fármacos e despertar do animal. Após 24 horas, sob anestesia com isoflurano, nefrectomia esquerda para exame.

Grupo HPCsA (n = 6): anestesia com propofol. Injeção de 2,5 g de glicose intraperitoneal + 5 mg.kg⁻¹ de CsA IV cinco minutos antes da reperfusão. Após 30 minutos, laparotomia, nefrectomia direita e isquemia do rim esquerdo durante 25 minutos. Reperfusão do rim esquerdo. Suspensão dos fármacos e despertar do animal. Após 24 horas, sob anestesia com isoflurano, nefrectomia esquerda para exame.

Grupo SISO Sham (n = 6): anestesia com isoflurano. Injeção de 2,5 g de glicose intraperitoneal. Após 30 minutos, foram realizadas a laparotomia e a nefrectomia direita. Suspensão dos fármacos e despertar do animal. Após 24 horas, sob anestesia com isoflurano, nefrectomia esquerda para exame.

Grupo SP Sham (n = 6): anestesia com propofol. Injeção de 2,5 g de glicose intraperitoneal. Após 30 minutos, foram realizadas a laparotomia e a

nefrectomia direita. Suspensão dos fármacos e despertar do animal. Após 24 horas, sob anestesia com isoflurano, nefrectomia esquerda para exame.

3.2 SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL

1. Jejum alimentar.
2. Pesagem dos animais.
3. Indução anestésica em recipiente fechado, com fluxo de oxigênio de 2 litros por minuto e isoflurano na concentração de 3% a 4%, por período de 5 a 10 minutos, até a perda de consciência.
4. Intubação traqueal e ventilação mecânica controlada.
5. Ventilação artificial dos pulmões com fração inspirada de oxigênio de 0,33; para tanto, os animais serão conectados a ventilador artificial 683 Rodent Ventilador, Harvard Apparatus, Inc (USA).
6. Colocação de mantas aquecidas para a manutenção da temperatura retal em aproximadamente 37°C.
7. Colocação de transdutor térmico no reto do animal para medida contínua da temperatura.
8. Dissecção e canulação, com cateter 24 GA, da veia jugular direita, para a manutenção com solução de Ringer com lactato, 3 ml.h⁻¹, para reposição de perda de fluídos, através de bomba de infusão ANNE ® – Abbott Laboratories.
9. Dissecção e canulação, com cateter 24 GA, da artéria carótida esquerda para monitorização da frequência cardíaca e pressão arterial média, através do aparelho Datex, Engstron, Finlândia, para a manutenção de estabilidade hemodinâmica e adequação ao plano anestésico.

10. Coleta de 1 ml de sangue arterial (M1) para a leitura da concentração sanguínea de creatinina e da glicemia, seguida de reposição com o dobro da quantidade colhida com solução de Ringer lactato.
11. Infusão venosa da solução de Ringer lactato, 3 ml.h^{-1} , para a reposição de perdas de fluidos, imediatamente após o cateterismo da veia jugular.
12. Injeção de $2,5 \text{ g.kg}^{-1}$ de peso corporal de glicose, pela via intraperitoneal.
13. Após 30 minutos da injeção de glicose, laparotomia mediana e nefrectomia à direita.
14. Exposição da artéria renal esquerda para posterior colocação de clamp vascular atraumático.
15. Realização de clampeamento da artéria renal esquerda por período de 25 minutos; a isquemia renal será avaliada pela coloração do rim.
16. Após 20 minutos de isquemia, os grupos HISO, HP, SISO e SP receberam, por via intravenosa, SF 0,9% em igual volume à dose correspondente de CsA e os grupos HISOCsA e HPCsA receberam, pela mesma via, a dose de 5 mg. kg^{-1} de CsA.
17. Após os 25 minutos de isquemia, a artéria renal foi liberada do clampeamento; após o desclampeamento, houve restabelecimento completo da coloração renal em todos os animais.
18. Fechamento da parede abdominal com sutura em dois planos.
19. Infiltração da pele e subcutâneo com 0,7 ml de solução de bupivacaína a 0,3%.

20. Após a reperfusão, momento dois (M2), foi realizada colheita de 1 ml de sangue arterial para medida da concentração sanguínea de creatinina e glicemia, seguida de reposição com o dobro da quantidade colhida com solução de Ringer lactato.
21. Infiltração da pele e do subcutâneo do pescoço com 0,3 ml de solução de bupivacaína a 0,3%. Ligadura da veia jugular externa, sutura da pele.
22. Interrupção dos fármacos, recuperação dos animais e extubação deles ao reassumirem a respiração espontânea.
23. Manutenção dos animais em gaiolas de contêiner climatizado, com alimentação e analgesia, por 24 horas.
24. Após 24 horas de reperfusão, sob anestesia com isoflurano a 4%, em recipiente fechado, até a perda da consciência, foram retiradas amostras sanguíneas, por punção intracardíaca, para dosagens de glicose e creatinina plasmáticas, sendo esse denominado momento três (M3).
25. A seguir, após nova laparotomia mediana, o rim esquerdo foi retirado para exame histológico e citometria de fluxo.
26. Na sequência, o animal foi sacrificado com administração de 250 mg de tiopental sódico, por via intracardíaca.
27. Todas as amostras sanguíneas colhidas foram imediatamente submetidas à centrifugação para separação e congelamento do plasma para dosagem de creatinina e glicose.

3.3 ATRIBUTOS ESTUDADOS

Os atributos estudados em cada um dos animais dos seis grupos foram:

- Pressão arterial média (PAM);

- Creatinina plasmática;
- Glicose plasmática;
- Citometria de fluxo dos rins (avaliação do grau de apoptose);
- Exame histológico dos rins.

3.4 MOMENTOS ESTUDADOS

A creatinina e a glicose plasmáticas foram obtidas no início do experimento (M1), cinco minutos após a reperfusão renal (M2) e 24 horas após o episódio de isquemia/reperfusão (M3), imediatamente antes ao sacrifício do animal.

A temperatura retal foi mantida entre 37°C e 38°C.

Para fins de estatística, usou-se a PAM obtida no momento inicial da pesquisa, após o cateterismo arterial, cerca de 10 minutos após o início da anestesia (T1); 30 minutos após a injeção de glicose intraperitoneal (T2) e imediatamente antes da ligadura da artéria carótida esquerda, cerca de 60 minutos após o início da anestesia (T3).

A variável citometria de fluxo foi avaliada usando-se a análise de variância no delineamento inteiramente ao acaso, seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas entre as médias.

Para as variáveis PAM, glicemia e creatinina, cujo interesse foi estudar efeito de grupo, momento e interação e momento x grupo, foi utilizada a análise de perfil.

Para as variáveis de análise histológica, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas entre os grupos.

Os dados foram expressos como médias \pm (desvio standard = SD) ou medianas e quartis. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

3.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

O rim esquerdo do animal foi retirado e uma metade deste foi colocado em solução de Duboscq-Brasil durante 24 horas, sendo, a seguir, armazenado em álcool a 70% para posterior avaliação histológica. A solução de Duboscq-Brasil foi utilizada para preservar, fixar as estruturas renais e aumentar a fidedignidade da análise histológica. O corante usado para a análise histológica foi a hematoxilinaeosina e os cortes foram verificados sob diversos aumentos na microscopia óptica. Após o preparo das lâminas dos rins, com fixação em parafina, estas foram avaliadas quanto à porcentagem de necrose tubular e classificadas com o uso de um escore descrito por Park et al., 2008, apresentado na tabela a seguir:

Tabela 1 - A avaliação da necrose tubular (obtida de escores adaptados de Park et al., 2008)

Escore dos graus de lesão celular atribuídos aos exames histológicos		
GRAU	TIPO	% DE LESÃO
0	Sem Lesão	
1	Leve	< 10% necrose
2	Moderado	10 a 25%
3	Moderado a Grave	25 a 50%
4	Grave	50 a 75%
5	Muito grave	> 75%

O patologista que realizou a avaliação histológica não sabia a qual grupo o rim pertencia.

3.6 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR (APOPTOSE)

A outra metade do rim esquerdo foi colocada em cultura apropriada para a avaliação da viabilidade celular pelo método da citometria de fluxo. Com as células extraídas desses rins, foi utilizado um kit para detectar a apoptose constituída de anexina V-FITC e iodeto de propídeo (Pharmlngen®), o que permitiu determinar quantitativamente o percentual de viabilidade (células vivas, mortas e em processo apoptótico inicial) na população celular, definida pelos parâmetros de tamanho e granulosidade celular. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo modelo FACSCalibur® (Becton, Dickinson and Company, EUA), constituído de três detectores de fluorescências com uso dos programas CellQuest® e Paint-a-gate® (Becton, Dickinson and Company, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 PAM - Pressão Arterial Média (mm Hg)

Os valores da PAM (mm Hg) não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos: **HISO** - Anestesia com isoflurano. **HP** - Anestesia com propofol. **HISOCsA** - Anestesia com isoflurano + injeção de 5 mg.kg⁻¹ de ciclosporina A (CsA) IV. **HPCsA** - Anestesia com propofol + injeção de 5 mg.kg⁻¹ de CsA IV. **SISO** (sham do isoflurano) - Anestesia com isoflurano. **SP** (sham do propofol) - Anestesia com propofol. Todos os grupos foram submetidos à injeção de 2,5 g.kg⁻¹ de glicose IP. Os grupos **HISO**, **HP**, **HISO CsA** e **HPCsA** foram submetidos à isquemia do rim esquerdo durante 25 minutos. Para tratamento estatístico as medidas de PAM foram realizadas nos momentos M1 (início do experimento), M2 (30 minutos após a injeção intraperitoneal de glicose) e M3 (imediatamente antes da ligadura da artéria carótida esquerda) (Tabela 2 e Gráfico 1).

Tabela 2 - Média e desvio-padrão referentes a PAM segundo grupos e momentos

Momentos			
Grupo	M1	M2	M3
HISO	94,50 ± 16,13	92,00 ± 17,89	95,83 ± 20,09
HP	99,17 ± 3,31	92,00 ± 16,99	94,67 ± 19,17
HISOCsA	106,14 ± 5,90	97,71 ± 15,57	107,00 ± 10,94
HPCsA	101,67 ± 20,83	106,00 ± 14,72	110,67 ± 12,94
SISO	90,50 ± 27,19	95,67 ± 15,82	93,50 ± 23,51
SP	105,50 ± 17,24	110,17 ± 20,00	87,50 ± 29,45

Não houve efeito de momento ($p = 0,92$), nem de grupo ($p = 0,43$), nem da interação momento x grupo ($p = 0,31$).

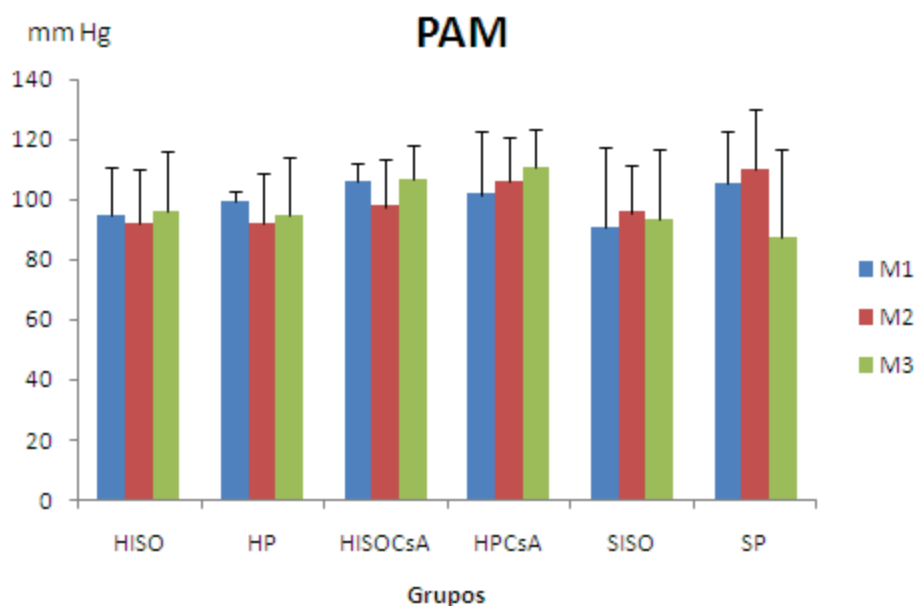


Gráfico1 - Medidas da PAM (mm Hg) nos momentos e grupos estudados.

4.2 GLICEMIA (mg.dL⁻¹)

Os valores de glicemia foram obtidos em T1 (início do experimento), T2 (5 minutos após a reperfusão) e T3 (24 horas após a reperfusão). Em T2, os valores de glicemia foram maiores que nos demais momentos em todos os grupos: **HISO** - anestesia com isoflurano; **HP** - anestesia com propofol; **HISOCsA** - anestesia com isoflurano + injeção de 5 mg.kg⁻¹ de CsA IV; **HPCsA** - anestesia com propofol. Injeção de 5 mg.kg⁻¹ de CsA IV; **SISO** (sham do isoflurano) - anestesia com isoflurano; **SP** (sham do propofol) - anestesia com propofol.

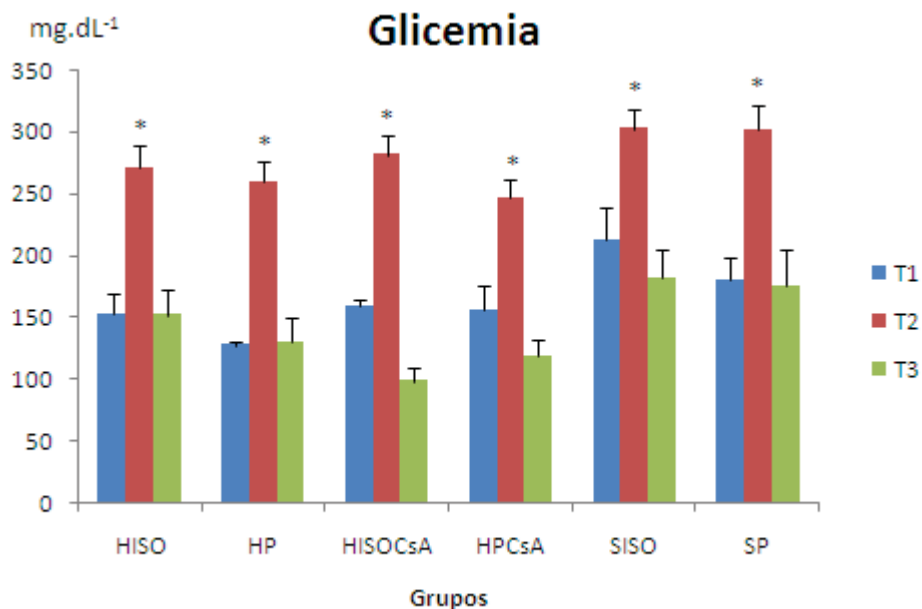
Todos os grupos receberam a injeção de 2,5 g.kg⁻¹ de glicose IP. Os grupos **HISO**, **HP**, **HISOCsA** e **HPCsA** foram submetidos à isquemia do rim esquerdo durante 25 minutos (Tabela 3 e Gráfico 2).

Tabela 3 - Média e desvio-padrão referentes à glicemia (mg.dL⁻¹) segundo grupos e momentos

Momentos			
Grupo	T1	T2	T3
HISO	152,67 ± 38,22 b	271,00 ± 45,42 a	152,00 ± 35,20 b
HP	127,60 ± 30,96 b	259,83 ± 26,16 a	130,17 ± 24,13 b
HISOCsA	158,83 ± 33,80 b	281,83 ± 75,80 a	98,33 ± 41,17 b
HPCsA	155,57 ± 32,73 b	246,86 ± 67,48 a	118,71 ± 34,06 b
SISO	212,33 ± 48,38 b	302,50 ± 79,97 a	181,83 ± 12,69 b
SP	180,67 ± 48,99 b	301,83 ± 42,98 a	175,67 ± 16,73 b

Houve efeito de momento (p < 0,0001).

Letras minúsculas comparam médias de momentos em cada grupo.

**Gráfico 2** - Valores de glicemia (mg.dL⁻¹) dos grupos e momentos estudados. *p<0,0001

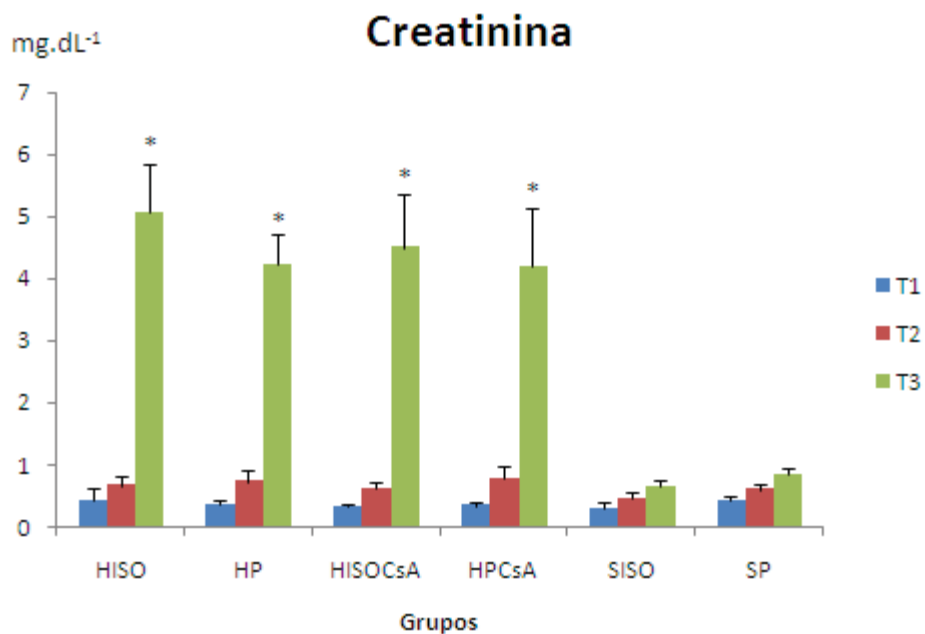
4.3 CREATININA PLASMÁTICA (mg.dL⁻¹)

Os valores de creatinina plasmática foram obtidos em T1 (início do experimento), T2 (5 minutos após a reperfusão) e T3 (24 horas após a reperfusão) dos grupos: **HISO** - Anestesia com isoflurano. **HP** - Anestesia com propofol. **HISOCsA** - Anestesia com isoflurano + injeção de 5 mg.kg⁻¹ de CsA IV. **HPCsA** - Anestesia com propofol + injeção de 5 mg.kg⁻¹ de CsA IV. **SISO** (sham do isoflurano) - Anestesia com isoflurano. **SP** (sham do propofol) - Anestesia com propofol. Todos os grupos foram submetidos à injeção de 2,5 g.kg⁻¹ de glicose IP. Os grupos **HISO**, **HP**, **HISOCsA** e **HPCsA** foram submetidos à isquemia do rim esquerdo durante 25 minutos. Os níveis da creatinina foram similares entre os grupos em T1 e T2. E estatisticamente diferentes em T3 nos grupos **HISO**, **HP**, **HISOCsA** e **HPCsA**. Os valores de **HISO** foram maiores e estatisticamente diferentes dos demais grupos (Tabela 4 e Gráfico 3).

Tabela 4 - Média e desvio-padrão referentes a creatinina (mg.dL⁻¹) segundo grupos e momentos

GRUPO	Momentos		
	T1	T2	T3
HISO	0,43 ± 0,19 bA	0,67 ± 0,16 bA	5,08 ± 0,76 aA
HP	0,37 ± 0,05 cA	0,73 ± 0,18 bA	4,23 ± 0,50 aB
HISOCsA	0,32 ± 0,04 bA	0,62 ± 0,10 bA	4,50 ± 0,85 aAB
HPCsA	0,34 ± 0,05 bA	0,79 ± 0,19 bA	4,19 ± 0,96 aB
SISO	0,30 ± 0,09 aA	0,45 ± 0,10 aA	0,65 ± 0,10 aC
SP	0,42 ± 0,08 aA	0,60 ± 0,09 aA	0,85 ± 0,10 aC

Houve efeito da interação momento x grupo ($p < 0,0001$).
 Letras minúsculas comparam médias de momento em cada grupo.
 Letras maiúsculas comparam médias de grupo em cada momento.

**Gráfico 3** - Média e desvio-padrão referentes a creatinina (mg.dL⁻¹) segundo grupos e momentos ($p < 0,0001$).

4.4 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

A avaliação histológica do índice de lesão tubular realizada em biópsias do rim esquerdo nos grupos: **HISO** - anestesia com isoflurano; **HP** - anestesia com propofol; **HISOCsA** - anestesia com isoflurano + injeção de 5 mg.kg^{-1} de CsA IV; **HPCsA** - anestesia com propofol + injeção de 5 mg.kg^{-1} de CsA IV; **SISO** (sham isoflurano) - anestesia com isoflurano; **SP** (sham propofol) - anestesia com propofol. Todos os grupos receberam a injeção de $2,5 \text{ g.kg}^{-1}$ de glicose IP. Os grupos **HISO**, **HP**, **HISOCsA** e **HPCsA** foram submetidos à isquemia do rim esquerdo durante 25 minutos. A avaliação histológica do índice de lesão tubular, segundo a tabela 1, mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos **SISO** e **SP** e os demais grupos (Tabela 5 e Gráfico 4).

Tabela 5 - Mediana, 1^o e 3^o quartis, entre colchetes, referentes ao índice de lesão tubular, segundo grupos

Grupo	Mediana e quartis
HISO	4 [3,4] A
HP	3 [3,4] A
HISOCsA	3 [3,4] A
HPCsA	3 [3,3] A
SISO	0 [0,0] B
SP	0 [0,0] B

p<0,001

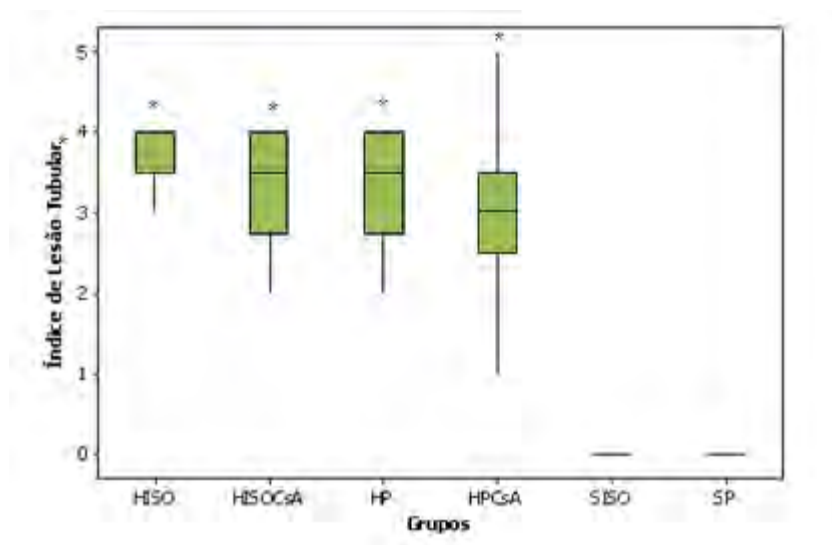


Gráfico 4 - Mediana, 1^o e 3^o quartil, referentes ao índice de lesão tubular segundo grupos.

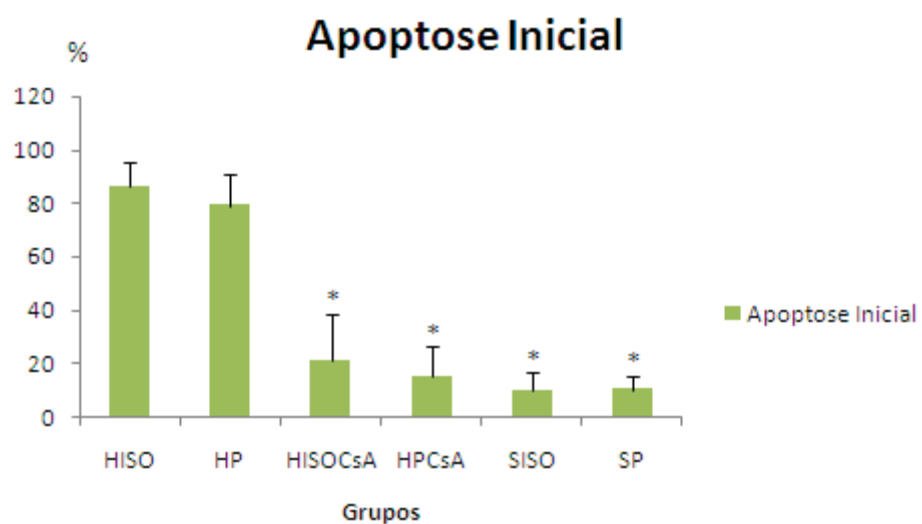
4.5 CITOMETRIA DE FLUXO – PORCENTAGEM (%) DE APOPTOSE INICIAL

A avaliação da apoptose inicial pela citometria de fluxo foi realizada em biópsias do rim esquerdo nos grupos: **HISO** - Anestesia com isoflurano. **HP** - Anestesia com propofol. **HISOCsA** - Anestesia com isoflurano + injeção de 5 mg.kg⁻¹ de CsA IV. **HPCsA** - Anestesia com propofol+ injeção de 5 mg.kg⁻¹ de CsA IV. **SISO** (sham do isoflurano) - Anestesia com isoflurano. **SP** (sham do propofol) - Anestesia com propofol. Todos os grupos foram submetidos à injeção de 2,5 g.kg⁻¹ de glicose IP. Os grupos **HISO**, **HP**, **HISOCsA** e **HPCsA** foram submetidos à isquemia do rim esquerdo durante 25 minutos. A porcentagem de apoptose inicial mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos **HISO** e **HP** e os demais grupos (Tabela 6 e Gráfico 5).

Tabela 6 - Média e desvio-padrão referente à variável de apoptose inicial (%) segundo grupos

Grupo	Apoptose inicial (%)
HISO	86,29 ± 8,98 A
HP	79,28 ± 11,44 A
HISO CsA	21,23 ± 17,53 B
HPCsA	15,06 ± 11,26 B
SISO	9,88 ± 6,62 B
SP	10,33 ± 5,26 B
Valor de p	<0,0001

Letras maiúsculas comparam médias dos grupos para cada variável.

**Gráfico 5** - Média e desvio-padrão referentes às variáveis de apoptose inicial (%) segundo grupos.

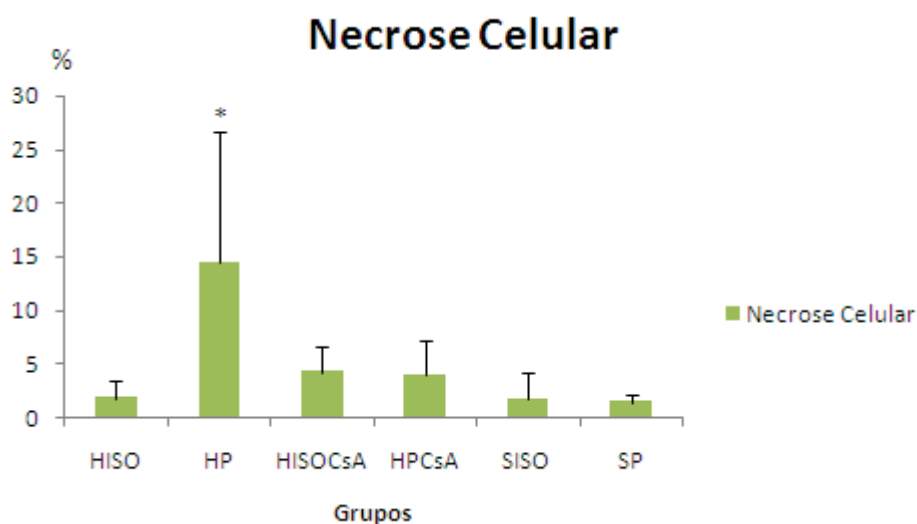
4.6 CITOMETRIA DE FLUXO - PORCENTAGEM (%) DE NECROSE CELULAR

A avaliação do percentual (%) de necrose celular pela citometria de fluxo foi realizada em biópsias do rim esquerdo nos grupos: **HISO** - anestesia com isoflurano; **HP** - anestesia com propofol; **HISOCsA** - anestesia com isoflurano + injeção de 5 mg.kg¹ de CsA IV; **HPCsA** - anestesia com propofol + injeção de 5 mg.kg⁻¹ de CsA IV; **SISO** (sham do isoflurano) - anestesia com isoflurano; **SP** (sham do propofol) - anestesia com propofol. Todos os grupos receberam a injeção de 2,5 g.kg⁻¹ de glicose IP. Os grupos **HISO**, **HP**, **HISOCsA** e **HPCsA** foram submetidos à isquemia do rim esquerdo durante 25 minutos. A necrose celular mostrou aumento significativo apenas no grupo HP (Tabela 7 e Gráfico 6).

Tabela 7 - Média e desvio padrão referentes a variável necrose celular, segundo grupos

Grupo	Necrose celular (%)
HISO	1,82 ± 1,63 B
HP	14,50 ± 12,20 A
HISOCsA	4,23 ± 2,34 B
HPCsA	3,99 ± 3,24 B
SISO	1,74 ± 2,39 B
SP	1,43 ± 0,69 B
Valor de p	<0,02

Letras maiúsculas comparam médias dos grupos para cada variável.

**Gráfico 6** - Média e desvio padrão referentes às variáveis de necrose celular (%), segundo grupos ($p < 0,02$).

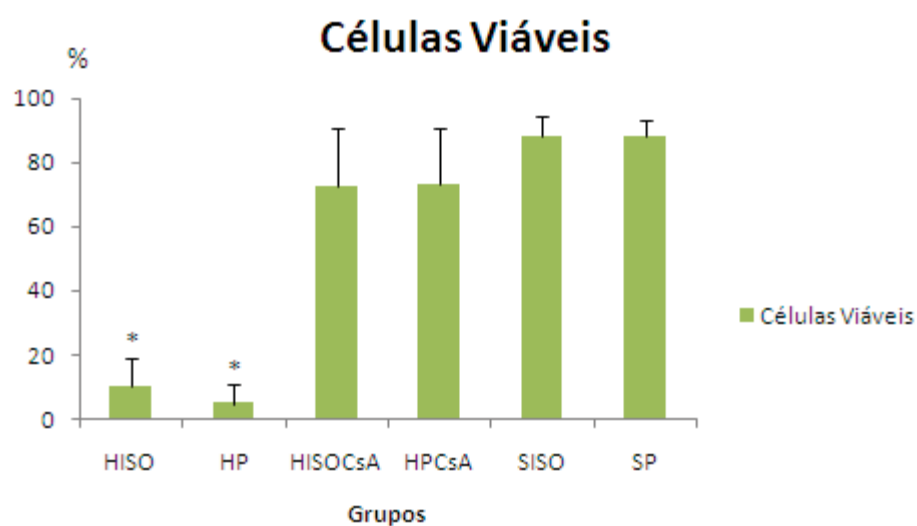
4.7 CITOMETRIA DE FLUXO - PORCENTAGEM (%) DE CÉLULAS VIÁVEIS

A avaliação da porcentagem (%) de células viáveis pela citometria de fluxo foi realizada em biópsias do rim esquerdo nos grupos: **HISO** - Anestesia com isoflurano. **HP** - Anestesia com propofol. **HISOCsA** - Anestesia com isoflurano + injeção de 5 mg.kg⁻¹ de CsA IV. **HPCsA** - Anestesia com propofol + injeção de 5 mg.kg⁻¹ de CsA IV. **SISO** (sham do isoflurano) - Anestesia com isoflurano. **SP** (sham do propofol) - Anestesia com propofol. Todos os grupos foram submetidos à injeção de 2,5 g.kg⁻¹ de glicose IP. Os grupos **HISO**, **HP**, **HISOCsA** e **HPCsA** foram submetidos à isquemia do rim esquerdo durante 25 minutos. Os grupos **HISO** e **HP** mostraram uma redução acentuada e estatisticamente significativa de células viáveis em relação aos demais grupos (Tabela 8 e Gráfico 7).

Tabela 8 - Média e desvio-padrão referente à variável células viáveis, segundo grupos

Grupo	Células Viáveis (%)
HISO	9,98 ± 9,30 B
HP	4,79 ± 6,24 B
HISOCsA	72,79 ± 17,85 A
HPCsA	73,23 ± 17,70 A
SISO	88,38 ± 6,03 A
SP	88,36 ± 4,69 A
Valor de p	<0,0001

Letras maiúsculas comparam médias dos grupos para cada variável.

**Gráfico 7** - Média e desvio padrão referentes à variável da porcentagem de células viáveis, segundo grupos ($p < 0,0001$).

5 DISCUSSÃO

No presente estudo foram escolhidos ratos machos, por serem animais mais suscetíveis à lesão renal de isquemia e reperfusão (Park, 2008).

O tempo utilizado de isquemia, de 25 minutos, foi o mesmo empregado por alguns autores por causar lesões de graus leves a moderados (Park, 2008) e ser considerado o tempo de isquemia que melhor delinea o impacto da hiperglicemia (Hirose, 2008).

O tempo de isquemia influencia os níveis de creatinina plasmática e o grau de lesão. Vinte e cinco minutos de isquemia arterial dobram os valores basais e 45 minutos resultam em um aumento de sete a oito vezes nos níveis plasmáticos da creatinina, com um grau de necrose significativa (> 75%) em relação aos valores basais (Park et al., 2008).

Em 1997, Islam et al. não encontraram quaisquer diferenças entre rins pré-condicionados por isquemia e sem pré-condicionamento, em animais que permaneceram com os dois rins, evidenciando a capacidade do rim contralateral em compensar a função daquele submetido à isquemia. O rim único pode ser mais suscetível à lesão do que quando o outro órgão permanece intacto (Fujii et al., 2005). A nefrectomia direita foi realizada com o objetivo de prevenir a compensação do rim submetido a I/R pelo rim contralateral.

A temperatura não foi um parâmetro estudado do ponto de vista estatístico porque foi controlada, durante a pesquisa, nos limites entre 37°C e 38°C. A importância desses limites de temperatura, nesse modelo experimental, já foi demonstrada (Delbridge et al., 2007; Harper et al., 2008).

Quando ocorre hipotermia durante I/R, os graus de lesão orgânica são menores, quando comparados àqueles desenvolvidos durante normotermia ou hipertermia.

Por isso, no presente estudo, a temperatura foi estreitamente controlada, através da colocação de bolsa térmica aquecida e monitorização contínua, para que os animais se mantivessem normotérmicos.

O tempo de isquemia influencia os níveis de creatinina plasmática e o grau de lesão. Vinte e cinco minutos de isquemia duplicam os valores basais e 45 minutos resultam em aumento de sete a oito vezes nos níveis plasmáticos da creatinina, com grau de necrose significativa (> 75%) em relação aos valores basais (Park et al., 2008).

Para os valores encontrados de pressão arterial média (PAM), não houve diferença entre momentos, nem entre os seis grupos. Isso demonstra que o controle hemodinâmico realizado durante todo o experimento foi adequado.

Em estudo, em que foram analisados os efeitos do choque hemorrágico em ratos, observou-se que a ressuscitação (reperfusão), após um período de choque hipovolêmico de 30 minutos, foi seguida de lesões hepatocelular e renal. Essas lesões foram evidenciadas através de valores maiores de níveis séricos de aspartato aminotransferase e de creatinina, quando os animais foram submetidos a níveis de pressão arterial menores. Nesses animais, houve também aumento de IL-1 β , IL-6, TNF- α e de células polimorfonucleares e mononucleares (Douzinas, 2008). Esses achados demonstram a importância da estabilidade hemodinâmica, pois se os animais desse estudo tivessem experimentado variações hemodinâmicas importantes, especialmente a hipotensão arterial, os graus de lesão tubular provavelmente seriam maiores, devido ao efeito aditivo da hipotensão arterial sobre a lesão de I/R.

Enquanto a hipoglicemia mimetiza, em animais e humanos, o pré-condicionamento isquêmico (Armstrong et al., 1994; Ebel et al., 2003) a diabetes mellitus e a hiperglicemia têm mostrado o bloqueio da cardioproteção induzido pelo pré-condicionamento isquêmico (Kersten et al., 2000; Ishihara et

al., 2001; Kristiansen et al., 2004) e pelo pré-condicionamento induzido por anestésicos (Tanaka et al., 2002; Kehl et al., 2002, 2003).

Neste estudo, após a indução da hiperglicemia transitória e imediatamente após a I/R, os valores dos níveis séricos de glicose no momento dois (T2) foram maiores em todos os grupos, quando comparados aos valores basais e àqueles obtidos 24 horas após o experimento (T3). Dessa forma, ficou bem caracterizada a transitoriedade da hiperglicemia (Podrazik, 1989; Hirose, 2008).

A creatinina é uma substância endógena e a dosagem de sua concentração plasmática é utilizada para medir a filtração glomerular (Chantler et al., 1969). A creatinina plasmática é quase exclusivamente um produto do metabolismo da creatinina e da fosfocreatina no músculo esquelético, apesar de a ingestão de determinados alimentos contribuir para as alterações em seus níveis (Rehling et al., 1984). Em pacientes com função renal estável, os níveis plasmáticos da creatinina são praticamente constantes, com pequena variação de cerca de 8% (Traynor et al., 2006). Um aumento nos níveis plasmáticos de creatinina é observado quando há lesão dos néfrons funcionantes.

Os níveis da creatinina foram similares entre os grupos em T1 e T2. E estatisticamente diferentes em T3 nos grupos HISO, HP, HISOCsA e HPCsA. Os valores do grupo HISO foram maiores e estatisticamente diferentes dos demais grupos em T3.

De acordo com a Tabela 4, os grupos sham (SISO e SP), submetidos somente à nefrectomia direita, sem isquemia renal esquerda e sob anestesia com propofol ou isoflurano, apresentaram alterações discretas e não significativas nos valores da creatinina plasmática entre os momentos. Os grupos dos animais submetidos a I/R com hiperglicemia, com e sem administração de CsA (HISO, HP, HISOCsA e HPCsA), apresentaram um pequeno aumento nos valores, não significativo, entre os momentos T1 e T2 e

aumento acentuado e significativo entre estes e T3, evidenciando o efeito lesivo da hiperglicemia quando associada ao episódio de I/R.

Esses resultados são compatíveis com outros estudos que demonstram o agravamento da lesão isquêmica na presença da hiperglicemia (Cherian et al., 1997; Thomas et al., 2001; Doenst et al., 2005; Gandhi et al., 2005; Di Filippo et al., 2006; Bemeur et al., 2007; Ganji et al., 2007; Hirose et al., 2008).

Estudo realizado por Lee et al., em 2004, em ratos submetidos a vários anestésicos (pentobarbital, cetamina, sevoflurano, isoflurano, halotano e desflurano) e I/R, encontrou valores menores de creatinina plasmática nos animais submetidos aos anestésicos voláteis e mantidos três horas após a I/R. Entre os anestésicos inalatórios utilizados, o desflurano foi o que apresentou os maiores níveis de creatinina plasmática.

A análise histológica das lâminas dos rins esquerdos, com o escore de 1 a 5 para avaliação de lesão tubular (sendo 0 = nenhuma lesão e 5 = lesão muito intensa, com grau de lesão tubular > 75) (Park, 2008), teve como resultado a ausência de lesão tubular nos rins dos ratos dos grupos sham.

Os animais hiperglicêmicos, submetidos a I/R, apresentaram elevados escores de lesão, confirmando o efeito lesivo dos níveis elevados de glicose, sem a demonstração dos efeitos protetores sobre a lesão de I/R pelo uso do propofol (grau 3) ou do isoflurano (grau 4). O mesmo aconteceu com a ciclosporina A, tanto nos animais anestesiados com isoflurano (HISOCsA = 3) quanto nos anestesiados com propofol (HPCsA = 3).

A avaliação histológica do índice de lesão tubular mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos SISO e SP e os demais grupos.

A apoptose, ou a morte programada da célula, que deve ser distinguida com base em critérios morfológicos e bioquímicos, é diferente da necrose. O mecanismo responsável pela apoptose, após o episódio de I/R, é atribuído ao aumento da atividade da endonuclease, pelo aumento da entrada de cálcio na célula ou pela liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS).

A gravidade da apoptose, após a reperfusão de uma isquemia prolongada, é tempo-dependente (Chien et al., 2001a).

As espécies reativas de oxigênio induzem a apoptose, causando dano ao ácido desoxirribonucleico (DNA), oxidação das membranas lipídicas e/ou ativação direta e expressão de genes/proteínas responsáveis pela apoptose.

Chien et al. (2001b) demonstraram que as espécies reativas de oxigênio são produzidas em quantidades significativas no epitélio dos túbulos proximais durante a reperfusão e podem ser responsáveis pela apoptose celular. Nas células epiteliais dos túbulos distais, dos rins que foram submetidos a I/R, diferentemente das células dos túbulos proximais, outros mecanismos que não a formação de espécies reativas de oxigênio podem prevalecer na indução da apoptose. O tratamento com superóxido dismutase (SOD) e outras substâncias varredoras de radicais livres pode ser efetivo na prevenção de apoptose mediada pelas espécies reativas de oxigênio, nas células dos túbulos proximais.

Hausenloy et al. (2002) demonstraram que a CsA administrada na reperfusão limitou a extensão do infarto, em um modelo de coração de ratos isolados. Usando um modelo de infarto do miocárdio em coelhos vivos, Argaud et al. (2005) demonstraram que o pós-condicionamento isquêmico ou farmacológico com CsA, administrada um minuto antes da reperfusão, limitou em 50% a extensão do infarto.

Em 2008, Argaug et al. demonstraram que o inibidor NM811 específico do mPTP, um derivado da CsA, provocava aumento da resistência do poro à sobrecarga de Ca^{+2} e limitava a extensão do infarto, quando administrado no momento da reperfusão.

Piot et al., em 2008, relataram que a CsA produziu significativa redução na extensão do infarto, através da medida da liberação de enzimas cardíacas durante os três primeiros dias pós-reperfusão e por ressonância nuclear magnética até o quinto dia pós-reperfusão.

A análise dos níveis de apoptose, avaliada pela citometria de fluxo, demonstrou uma porcentagem de apoptose inicial com diferença estatisticamente significativa entre os grupos HISO e HP e os demais grupos, evidenciando que a ciclosporina A foi capaz de restaurar a proteção do pré-condicionamento nos grupos HISOCsA e HPCsA. Essa ação foi demonstrada por Huhn et al., em 2008, que estudou o coração de ratos pós-condicionados com sevoflurano, submetidos à hiperglicemia, com e sem administração de ciclosporina A, e concluiu que o pós-condicionamento induzido pelo sevoflurano é bloqueado pela hiperglicemia e que a inibição do mPTP com CsA foi capaz de reverter essa perda de cardioproteção.

O modelo estudado, com período de 25 minutos de isquemia seguido de reperfusão, não produziu níveis estatisticamente significativos de necrose celular em nenhum dos grupos, exceto o grupo HP (hiperglicemia + anestesia com propofol).

O percentual de células viáveis, também avaliado pela citometria de fluxo, foi maior nos grupos sham (SISO e SP) e nos grupos HISOCsA e HPCsA. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos sham e os grupos que receberam ciclosporina A.

A lesão renal associada à isquemia-reperfusão resulta de um processo dinâmico que envolve a vasculatura e os túbulos renais com uma interação complexa. Os eventos que modulam a vasculatura alterarão o suprimento de oxigênio e nutrientes às células epiteliais e as células epiteliais lesadas responderão com a produção de fatores que afetarão a própria sobrevivência e a vasculatura. Há ativação da cascata de sinalização, resultando em alterações hemodinâmicas, leucocitose e lesão direta das células epiteliais tubulares, seguida por um processo de reparo que pode restaurar a morfologia e a função (Bonventre & Weinberg, 2003).

Qualquer que seja a etiologia, a consequência de uma parada cardíaca ressuscitada é a interrupção seguida pela restauração do fluxo sanguíneo para todos os órgãos, o que representa uma lesão

isquemia/reperfusão global. Existem evidências sugestivas que a perfusão na recuperação espontânea da circulação é também responsável por disfunção mitocondrial adicional, incluindo a abertura do mPTP, superprodução de ROS ou liberação do citocromo *c* (Ayub et al., 2008).

Cour et al., em 2011, avaliaram a ressuscitação de coelhos submetidos à parada cardiorrespiratória, quando da ocorrência de morte devido à síndrome pós-parada cardíaca, isto é, falência de múltiplos órgãos incluindo disfunção cardiovascular e lesões neurológicas irreversíveis. A parada cardiorrespiratória ressuscitada, que leva à prejudicial disfunção cardiovascular e a falência de múltiplos, inclui um fenômeno de I/R em todo o organismo. Considerando a abertura do mPTP fundamental na lesão I/R, os autores apresentaram a hipótese de que a inibição farmacológica do mPTP pode evitar a síndrome pós-parada cardíaca.

Ao avaliar diversos marcadores de lesão celular, a capacidade de retenção de cálcio e os marcadores de evolução hemodinâmica, metabolismo celular e contratilidade miocárdica demonstraram que uma parte significativa de danos celulares que ocorrem após a ressuscitação de uma PC envolvem a transição da permeabilidade mitocondrial e podem ser atenuados pela inibição farmacológica específica.

Nesta pesquisa, os dados mais importantes encontrados foram os obtidos após a análise da viabilidade celular, através do citometria de fluxo. Houve menor porcentagem de células apoptóticas e maior porcentagem de células viáveis, em rins de ratos que receberam ciclosporina A em doses de 5 mg.kg⁻¹ cinco minutos antes da reperfusão, quando comparadas aos rins de ratos do grupo HISO e HP. Entretanto, essa proteção renal não foi comprovada pelos níveis de creatinina e pela avaliação histológica do rim.

6 CONCLUSÃO

A ciclosporina A em doses de 5 mg.kg^{-1} , administrada cinco minutos antes da reperfusão, foi capaz de restaurar a proteção do condicionamento induzido pelo isoflurano e pelo propofol em ratos hiperglicêmicos, quando avaliada pela citometria de fluxo.

7 REFERÊNCIAS

Abelha FJ, Botelho M, Fernandes V, Barros H. Determinants of postoperative acute kidney injury. *Crit Care*. 2009;13:R79.

Ambros JT, Herrero-Fresneda I, Borau OG, Boira JM. Ischemic preconditioning in solid organ transplantation: from experimental to clinics. *Transpl Int*. 2007;20:219-29.

Armstrong S, Downey JM, Ganote CE. Preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes: induction by metabolic stress and blockade by the adenosine antagonist SPT and calphostin C, a protein kinase C inhibitor. *Cardiovasc Res*. 1994;28:72-7.

Argaud L, Gateau-Roesch O, Augeul L, Couture-Lepetit E, Loufouat J, Gomez L et al. Increased mitochondrial calcium coexists with decreased reperfusion injury in post-conditioned (but not preconditioned) hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294:H386-91.

Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, Chalabreysse L, Loufouat J, Robert D et al. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;38:367-74.

Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation*. 2005;111:194-7.

Argaud L, Loufoaut J, Gateau-Roesch O, Gómez L, Robert D, Ovize M. Persistent inhibition of mitochondrial permeability transition pore by preconditioning in the first hours of reperfusion. *Shock*. 2008;30(5):552-6.

Ayub IM, Radhakishnan J, Gazmuri RJ. Targeting mitochondria for resuscitation from cardiac arrest. *Crit Care Med*. 2008;36:S440-S446.

Azevedo JR, Lima ER, Cossetti RJ, Azevedo RP. Intensive insulin therapy versus conventional glycemic control in patients with acute neurological injury: a prospective controlled trial. *Arq Neuropsiquiatr.* 2007;65:733-8.

Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature.* 2005;434:658-62.

Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petroilli V, Forte MA, Bernardi P. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem.* 2005;280:18558-61.

Behrends M, Martinez-Palli G, Niemann CU, Cohen S, Ramachandran R, Hirose R. Acute hyperglycemia worsens hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *J Gastrointest Surg.* 2010;14:528-35.

Bemeur C, Ste-Marie L, Montgomery J. Increased oxidative stress during hyperglycemic cerebral ischemia. *Neurochem Int.* 2007;50:890-904.

Bilotta F, Spinelli A, Giovannini F, Doronzio A, Delfini R, Rosa G. The effect of intensive insulin therapy on infection rate, vasospasm, neurologic outcome, and mortality in neurointensive care unit after intracranial aneurysm clipping in patients with acute subarachnoid hemorrhage: a randomized prospective pilot trial. *J Neurosurg Anesthesiol.* 2007;19:156-60.

Bonventre JV. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 1993;43:1160-78.

Bonventre JV. Kidney ischemic preconditioning. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2002;11:43-8.

Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:2199-210.

Buljubasic N, Marijic J, Stowe DF, Kampine JP, Bosnjak ZJ. Halothane reduces dysrhythmias and improves contractile function after global hypoperfusion in isolated hearts. *Anesth Analg*. 1992;74:384-94.

Buljubasic N, Stowe DF, Marijic J, Roerig DL, Kampine JP, Bosnjak ZJ. Halothane reduces release of adenosine, inosine, and lactate with ischemia and reperfusion in isolated hearts. *Anesth Analg*. 1993;76:54-62.

Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 2000;190:255-66.

Carrareto AR. Estudo da proteção renal com o propofol e o isoflurano durante a isquemia e reperfusão, com hiperglicemia transitória. Botucatu. Tese [Doutorado em Anestesiologia]. Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP); 2011.

Cattaneo D, Perico N, Gaspari F, Remuzzi G. Nephrotoxic aspects of Cyclosporine. *Transplant Proc*. 2004;36 (Suppl 2S):234S-9.

Cherian L, Goodman JC, Robertson CS. Hyperglycemia increases brain injury caused by secondary ischemia after cortical impact injury in rats. *Crit Care Med*. 1997; 25: 1378-83.

Chien CT, Chen CF, Hsu SM, Lee PH, Lai MK. Protective mechanism of preconditioning hypoxia attenuates apoptosis formation during renal ischemia/reperfusion phase. *Transplant Proc*. 1999a;31:2012-3.

Chien CT, Cheng CL, Lai WY, Hsu SM, Lee PH. Repetitive ischemia/reperfusion potentiates hepatocellular death by apoptosis. *Transplant Proc*. 1999b;31:2926-7.

Chien CT, Lee PH, Chen CF, Ma MC, Lai MK, Hsu SM. De novo demonstration and co-localization of free-radical production and apoptosis formation in rat kidney subjected to ischemia/reperfusion. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12:973-82.

Chou TF, Ma MC, Tsai CP & Chen CF. Enhancement of superoxide dismutase activity in rat lungs after hypoxic preconditioning. *Chin J Physiol.* 2009;52:376-83.

Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Ozols E, Atkins RC, Rollin BJ, Tesch GH. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice. *Kidney Int.* 2006;69:73-80.

Collard CD & Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology.* 2001;94:1133-8.

Cour M, Gomez L, Mewton N, Ovize M, Argaud L. Postconditioning: From the bench to the bedside. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2011;16:117-30.

Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J.* 1999;341:233-49.

Crompton M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *J Physiol.* 2000;529:11-21.

Davis RF, DeBoer LW, Rude RE, Lowenstein E, Maroko PR. The effect of halothane anesthesia on myocardial necrosis, hemodynamic performance, and regional myocardial blood flow in dogs following coronary artery occlusion. *Anesthesiology.* 1983;59:402-11.

De Hert SG, Turani F, Mathur S, Stowe DF. Cardioprotection with volatile anesthetics: mechanisms and clinical implications. *Anesth Analg.* 2005;100:1584-93.

De La Cruz JP, Zanca A, Carmona JA, de la Cuesta FS. The effect of propofol on oxidative stress in platelets from surgical patients. *Anesth Analg.* 1999;89:1050-5.

De Mattos AM, Olyaei AJ, Bennett WE. Pharmacology of immunosuppressive medications used in renal diseases and transplatation. *Am J Kidney Dis.* 1996;28:631.

Delbridge MS, Shrestha BM, Raftery AT, El Nahas AM, Haylor JL. The effect of body temperature in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc.* 2007;39:2983-5.

Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:1503-20.

Di Filippo C, Marfella R, Cuzzocrea S, Piegari E, Petronella P, Giugliano D, et al. Hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rat increases infarct size associated with low levels of myocardial HO-1 during ischemia/reperfusion. *Diabetes.* 2005;54:803-10.

Di Lisa F, Menabo R, Canton M, Barile M, Bernardi P. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD⁺ and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem.* 2001;276:2571-5.

Douzinis EE, Andrianakis I, Livaditi O, Paneris P, Tasoulis M, Pelekanou A, Betrosian A, Giamarellos-Bourboulis EJ. The level of hypotension during hemorrhagic shock is a major determinant of the post-resuscitation systemic inflammatory response: an experimental study. *BMC Physiol.* 2008;8:15.

Doenst T, Wijeyesundera D, Karkouti K, Zechner C, Maganti M, Rao V, et al. Hyperglycemia during cardiopulmonary bypass is an independent risk factor for mortality in patients undergoing cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005;130:1144.

Dogan Z, Yuzbasioglu MF, Kurutas EB, Yildiz H, Coskuner I, Senoglu N, et al. Thiopental improves renal ischemia-reperfusion injury. *Ren Fail.* 2010;32:391-5.

Ebel D, Mullenheim J, Frassdorf J, Heinen A, Huhn R, Bohlen T, et al. Effect of acute hyperglycaemia and diabetes mellitus with and without short-term insulin treatment on myocardial ischaemic late preconditioning in the rabbit heart in vivo. *Pflugers Arch.* 2003;446:175-82.

Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, et al. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation.* 2002;106:2067-72.

Estrada C.A., Young JA, Nifong LW & Chitwood WR Jr. Outcomes and perioperative hyperglycemia in patients with or without diabetes mellitus undergoing coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg.* 2003;75:1392-9.

Foxwell BM, Woerly G, Ryffel B. Inhibition of interleukin 4 receptor expression on human lymphoid cells by cyclosporin. *Eur J Immunol.* 1990;20:1185-6.

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

Finfer S, Chittock DR, Su SY, Blair D, Foster D, Dhingra V, et al. Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients. *N Engl J Med.* 2009; 360:1283-97.

Foxwell B M, Woerly G, Ryffel B. Inhibition of interleukin 4 receptor expression on human lymphoid cells by cyclosporin. *Eur J Immunol.* 1990;20:1185-6.

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

Furnary AP, Gao G, Grunkemeier GL, Wu Y, Zerr KJ, Bookin SO, et al. Continuous insulin infusion reduces mortality in patients with diabetes undergoing coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;125:1007-21.

Gandhi GY, Nuttall GA, Abel MD, Mullany CJ, Schaff HV, Williams BA, et al. Intraoperative hyperglycemia and perioperative outcomes in cardiac surgery patients. *Mayo Clin Proc.* 2005;80:862-6.

Ganji MR, Charkhchian M, Hakemi M, Nederi GH, Solymanian T, Saddadi F, et al. Association of hyperglycemia on allograft function in the early period after renal transplantation. *Transplant Proc.* 2007;39:852-4.

Gateau-Roesch O, Argaud L, Ovize M. Mitochondrial permeability transition and postconditioning. *Cardiovascular Res.* 2006;70:264-73.

Graham RM. Cyclosporine: mechanism of action and toxicity. *Cleve Clin J Med.* 1994;61:308-13.

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

Harper SJ, Hosgood SA, Waller HL, Yang B, Kay MD, Goncalves I & Nicholson ML. The effect of warm ischemic time on renal function and injury in the isolated hemoperfused kidney. *Transplantation.* 2008;86:445-51.

Hartner A, Veelken R, Wittmann M, Cordasic N, Hilgers KF. Effects of diabetes and hypertension on macrophage infiltration and matrix expansion in the rat kidney. *BMC Nephrol.* 2005;6:6.

Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res.* 2002;55:534-43.

Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu M, Yellon DM. Ischemic preconditioning protects by activating pro-survival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H971-6.

Heindl B, Becker BF, Zahler S, Conzen PF. Volatile anaesthetics reduce adhesion of blood platelets under low-flow conditions in the coronary system of isolated guinea pig hearts. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1998;42:995-1003.

Heindl B, Conzen PF, Becker BF. The volatile anesthetic sevoflurane mitigates cardiodepressive effects of platelets in reperfused hearts. *Basic Res Cardiol*. 1999a;94:102-11.

Heindl B, Reichle FM, Zahler S, Conzen PF, Becker BF. Sevoflurane and isoflurane protect the reperfused guinea pig heart by reducing postischemic adhesion of polymorphonuclear neutrophils. *Anesthesiology*. 1999b;91:521-30.

Hirose R, Xu F, Dang K, Liu T, Behrends M, Brakeman PR, et al. Transient hyperglycemia affects the extent of ischemia-reperfusion-induced renal injury in rats. *Anesthesiology*. 2008;108:402-14.

Hoste EA & Schurgers M. Epidemiology of acute kidney injury: how big is the problem? *Crit Care Med*. 2008;36:S146-51.

Hu G, Vasiliauskas T, Salem MR, Rhone DP, Crystal GJ. Neutrophils pretreated with volatile anesthetics lose ability to cause cardiac dysfunction. *Anesthesiology*. 2003;98:712-8.

Huhn R, Heinen A, Weber NC, Hollmann MW, Schlack W, Preckel B. Hyperglycaemia blocks sevoflurane-induced postconditioning in the rat heart in vivo: cardioprotection can be restored by blocking the mitochondrial permeability transition pore *Br J Anaesth*. 2008;100:465-71.

Irschik E, Tilg H, Niederwieser D, Gastl G, Huber C, Margreiter R. Cyclosporin blood levels do correlate with clinical complications. *Lancet*. 1984;2:692-3.

Ishihara M, Inoue I, Kawagoe T, Shimatani Y, Kurisu S, Nishioka K, et al. Diabetes mellitus prevents ischemic preconditioning in patients with a first acute anterior wall myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:1007-11.

Jenkins DP, Pugsley WB, Alkhulaifi AM, Kemp M, Hooper J, Yellon DM. Ischaemic preconditioning reduces troponin T release in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Heart*. 1997;77:314-8.

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.

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

Javadov SA, Lim KH, Kerr PM, Suleiman MS, Angelini GD, Halestrap AP. Protection of hearts from reperfusion injury by propofol is associated with inhibition of the mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res*. 2000;45:360-9.

Julien J, Farge D, Kreft-Jais C, Guyene TT, Plouin PF, Houssin D et al. Cyclosporine-induced stimulation of the rennin-angiotensin system after liver and heart transplantation. *Transplantation*. 1993;56:885-91.

Julier K, da Silva R, Garcia C, Bestmann L, Frascarolo P, Zollinger A, et al. Preconditioning by sevoflurane decreases biochemical markers for myocardial and renal dysfunction in coronary artery bypass graft surgery: a double-blinded, placebo-controlled, multicenter study. *Anesthesiology*. 2003;98:1315-27.

Karashima Y, Oike M, Takahashi S, Ito Y. Propofol prevents endothelial dysfunction induced by glucose overload. *Br J Pharmacol*. 2002;137:683-91.

Kato R, Foex P. Myocardial protection by anesthetic agents against ischemia-reperfusion injury: an update for anesthesiologists. *Can J Anaesth*. 2002;49:777-91.

Kehl F, Krolikowski JG, Mraovic B, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR. Hyperglycemia prevents isoflurane-induced preconditioning against myocardial infarction. *Anesthesiology*. 2002;96:183-8.

Kehl F, Krolikowski JG, Weihrauch D, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR. N-acetylcysteine restores isoflurane-induced preconditioning against myocardial infarction during hyperglycemia. *Anesthesiology*. 2003;98:1384-90.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239-57.

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

Kersten JR, Toller WG, Gross ER, Pagel PS, Warltier DC. Diabetes abolishes ischemic preconditioning: role of glucose, insulin, and osmolality. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278:H1218-24.

Kheterpal S, O'Reilly M, Englesbe MJ, Rosenberg AL., Shanks AM, Zhang L, Rothman ED, Campbell DA & Tremper KK. Preoperative and intraoperative predictors of cardiac adverse events after general, vascular, and urological surgery. *Anesthesiology*. 2009a;110:58-66.

Kheterpal S, Tremper KK, Englesbe MJ, O'Reilly M, Shanks AM, Fetterman DM, Rosenberg AL & Swartz RD. Predictors of postoperative acute renal failure after noncardiac surgery in patients with previously normal renal function. *Anesthesiology*. 2007;107:892-902.

Kheterpal S, Tremper KK, Heung M, Rosenberg AL, Englesbe M, Shanks, AM et al. Development and validation of an acute kidney injury risk index for patients undergoing general surgery: results from a national data set. *Anesthesiology*. 2009b;110:505-15.

Klintmalm G, Säwe J, Ringdén O, von Bahr C, Magnusson A. Cyclosporine plasma levels in renal transplant patients. Association with renal toxicity and allograft rejection. *Transplantation*. 1985;39:132-7.

Ko SH, Yu CW, Lee SK, Choe H, Chung MJ, Kwak YG, et al. Propofol attenuates ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart. *Anesth Analg*. 1997;85:719-24.

Kokita N, Hara A, Abiko Y, Arakawa J, Hashizume H, Namiki A. Propofol improves functional and metabolic recovery in ischemic reperfused isolated rat hearts. *Anesth Analg*. 1998;86:252-8.

Kong HY, Zhu SM, Wang LQ, He Y, Xie HY, Zheng SS. Sevoflurane protects against acute kidney injury in a small-size liver transplantation model. *Am J Nephrol*. 2010;32:347-55.

Koller-Strametz J, Woltz M, Fuchs C, Putz D, Wisser W, Mensik C et al. Renal hemodynamic effects on L-arginine and sodium nitroprusside in heart transplant recipients. *Kidney Int*. 1999; 55:1871-7.

Kristiansen SB, Lofgren B, Stottrup NB, Khatir D, Nielsen-Kudsk JE, Nielsen TT, et al. Ischaemic preconditioning does not protect the heart in obese and lean animal models of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2004; 47:1716-21.

Krolikowski JG, Bienengraeber M, Weihrauch D, Warltier DC, Kersten JR and Pagel PS. Inhibition of Mitochondrial Permeability Transition Enhances Isoflurane-Induced Cardioprotection During Early Reperfusion: The Role of Mitochondrial KATP Channels. *Anesth Analg*. 2005;101:1590–6.

Lee DB. Cyclosporine and the rennin-angiotensin axis. *Kidney Int.* 1997;52:248.

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;101:1313-24.

Lie RH, Stoettrup N, Sloth E, Hasenkam JM, Kroyer R and Nielsen TT. Post-conditioning with cyclosporine A fails to reduce the infarct size in an in vivo porcine model *Acta Anaesthesiol Scand.* 2010;54:804-13.

Liu KX, Rinne T, He W, Wang F, Xia Z. Propofol attenuates intestinal mucosa injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in the rat. *Can J Anaesth.* 2007;54:366-74.

Lopez-Neblina F, Toledo-Pereyra LH, Mirmiran R & Paez-Rollys AJ. Time dependence of Na-nitroprusside administration in the prevention of neutrophil infiltration in the rat ischemic kidney. *Transplantation.* 1996; 61:179-83.

Lorsomradee S, Cromheecke S, Lorsomradee S, De Hert SG. Cardioprotection with volatile anesthetics in cardiac surgery. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2008;16:256-64.

Mahon P, Shorten G. Perioperative acute renal failure. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2006;19:332-8.

Malmberg K, Ryden L, Hamsten A, Herlitz J, Waldenstrom A, Wedel H. Effects of insulin treatment on cause-specific one-year mortality and morbidity in diabetic patients with acute myocardial infarction. DIGAMI Study Group. *Diabetes Insulin-Glucose in Acute Myocardial Infarction.* *Eur Heart J.* 1996;17:1337-44.

Malyszko J, Malyszko JS, Pawlak K, Mysliwiec M. The coagulo-lytic system and endothelial function in cyclosporine-treated kidney allograft recipients. *Transplantation.* 1996;62:828-30.

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002; 298:1912-34.

Marber MS, Mestril R, Chi SH, Sayen MR, Yellon DM, Dillmann WH. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest*. 1995;95:1446-56.

Mathur S, Farhangkhgoee P, Karmazyn M. Cardioprotective effects of propofol and sevoflurane in ischemic and reperfused rat hearts: role of K (ATP) channels and interaction with the sodium-hydrogen exchange inhibitor HOE 642 (cariporide). *Anesthesiology*. 1999;91:1349-60.

Molina A, Ubeda M, Escribese MM, Bermejo LG, Sancho D, Perez de Lema G et al. Renal ischemia/reperfusion injury: functional tissue preservation by anti-activated β 1 integrin therapy. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:374-82.

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

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

Nakae Y, Fujita S, Namiki A. Propofol inhibits Ca (2+) transients but not contraction in intact beating guinea pig hearts. *Anesth Analg*. 2000;90:1286-92.

Nagakawa T, Shimizu S, Wanatabe T et al. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*. 2005;434:625-58.

Nankivell BJ, Hibbins M, Chapman JR. Diagnostic utility of whole blood cyclosporine measurements in renal transplantation using triple therapy. *Transplantation*. 1994;58:989-96.

Novalija E, Fujita S, Kampine JP, Stowe DF. Sevoflurane mimics ischemic preconditioning effects on coronary flow and nitric oxide release in isolated hearts. *Anesthesiology*. 1999;91:701-12.

Oellerich M, Armstrong VW, Schütz E, Shaw LM. Therapeutic drug monitoring of cyclosporine and tacrolimus. *Clin Biochem*. 1998;31:309-16.

Ouattara A, Lecomte P, Le Manach Y, Landi M, Jacqueminet S, Platonov I, et al. Poor intraoperative blood glucose control is associated with a worsened hospital outcome after cardiac surgery in diabetic patients. *Anesthesiology*. 2005;103:687-94.

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

Ping P, Murphy E. Role of p38 mitogen-activated protein kinases in preconditioning: a detrimental factor or a protective kinase? *Circ Res*. 2000;86:921-2.

Piot C, Croisille C, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2008;359:473-81.

Podrazik RM, Natale JE, Zelenock GB, D'Alecy LG. Hyperglycemia exacerbates and insulin fails to protect in acute renal ischemia in the rat. *J Surg Res*. 1989;46:572-8.

Piper HM, Abdallah Y, Schafer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res*. 2004;61(3):365-71.

Riksen NP, Smits P, Rongen GA. Ischaemic preconditioning: from molecular characterisation to clinical application--part II. *Neth J Med*. 2004;62:409-23.

Rock P, Yao Z. Ischemia reperfusion injury, preconditioning and critical illness. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2002;15:139-46.

Rodriguez-Lopez JM, Sanchez-Conde P, Lozano FS, Nicolas JL, Garcia-Criado FJ, Cascajo C et al. Laboratory investigation: effects of propofol on the systemic inflammatory response during aortic surgery. *Can J Anaesth.* 2006;53:701-10.

Sadovnikoff N. Perioperative acute renal failure. *Int Anesthesiol Clin.* 2001;39:95-109.

Sadovnikoff N, Gelman S. Perioperative renal protection. *Curr Opin Anaesthesiol.* 1999;12:337-41.

Salomon D, Brunson M, Vansickler J, Pfaff W, Howard R, Peterson J et al. A retrospective analysis of late renal graft function: correlation with mean cyclosporine levels and lack of evidence for chronic cyclosporine toxicity. *Transplant Proc.* 1991;23:1018-9.

Sayin MM, Ozatamer O, Tasoz R, Kilinc K, Unal N. Propofol attenuates myocardial lipid peroxidation during coronary artery bypass grafting surgery. *Br J Anaesth.* 2002;89:242-6.

Scherrer U, Vissing SF, Morgan BJ, Rollins JA, Tindall RS, Ring S et al. Cyclosporine-induced sympathetic activation and hypertension after heart transplantation. *N Engl J Med.* 1990;323:693-9.

Schlack W, Hollmann M, Stunneck J, Thamer V. Effect of halothane on myocardial reoxygenation injury in the isolated rat heart. *Br J Anaesth.* 1996;76:860-7.

Scognamiglio R, Avogaro A, Vigili de Kreutzenberg S, Negut C, Palisi M, Bagolin E, et al. Effects of treatment with sulfonylurea drugs or insulin on ischemia-induced myocardial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002;51:808-12.

Sellins KS, Cohen JJ. Gene induction by gamma-irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. *J Immunol.* 1987;139:3199-206.

Sharples EJ. Acute kidney injury: stimulation of repair. *Curr Opin Crit Care.* 2007;13:652-5.

Skoutelis A, Lianou P, Papageorgiou E, Kokkinis K, Alexopoulos K, Bassaris H. Effects of propofol and thiopentone on polymorphonuclear leukocyte functions in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1994;38:858-62.

Noeijis MG, Van Heurn LW, Buurman WA. Biological modulation of renal ischemia-reperfusion injury. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010;15:190-9.

Sommerschild HT, Kirkeboen KA. Preconditioning - endogenous defence mechanisms of the heart. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2002;46:123-37.

Song HK, Jeong DC. The effect of propofol on cytotoxicity and apoptosis of lipopolysaccharide-treated mononuclear cells and lymphocytes. *Anesth Analg.* 2004;98:1724-8.

Spieckermann PG, Bruckner J, Kubler W, Lohr B, Bretschneider HJ. [Preischemic stress and resuscitation time of the heart]. *Verh Dtsch Ges Kreislaufforsch.* 1969;35:358-64.

Tanaka K, Kehl F, Gu W, Krolkowski JG, Pagel PS, Wartier DC, et al. Isoflurane-induced preconditioning is attenuated by diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282:H2018-23.

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

Tedesco HS et al. Otimização do uso da CsA em transplante renal. *Rev Assoc Med Bras.* 1992;38:183-94.

Thomas MC, Mathew TH, Russ GR, Rao MM, Moran J. Early peri-operative glycaemic control and allograft rejection in patients with diabetes mellitus: a pilot study. *Transplantation*. 2001;72:1321-4.

Traynor J, Mactier R, Geddes CC, Fox JG. How to measure renal function in clinical practice. *Br Med J*. 2006;333:733-7.

Tsuchiya M, Asada A, Kasahara E, Sato EF, Shindo M, Inoue M. Antioxidant protection of propofol and its recycling in erythrocyte membranes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:54-60.

Turina M, Fry DE, Polk HC, Jr. Acute hyperglycemia and the innate immune system: clinical, cellular, and molecular aspects. *Crit Care Med*. 2005;33:1624-33.

Van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, et al. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Engl J Med*. 2001;345:1359-67.

Vanhorebeek I, Langouche L, Van den Berghe G. Glycemic and nonglycemic effects of insulin: how do they contribute to a better outcome of critical illness? *Curr Opin Crit Care*. 2005;11:304-11.

Vianna PT, Castiglia YM, Braz JR, Viero RM, Beier S, Vianna Filho PT, et al. Remifentanyl, isoflurane, and preconditioning attenuate renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Transplant Proc*. 2009;41:4080-2.

Wang X, Zhu C, Gerwien JG, Schratzenholz A, Sandberg M, Leist M et al. The nonerythropoietic asialoerythropoietin protects against neonatal hypoxia-ischemia as potently as erythropoietin. *J Neurochem*. 2004;91:900-10.

Woroniecki R, Ferdinand JR, Morrow JS, Devarajan P. Dissociation of spectrin-ankyrin complex as a basis for loss of Na-K-ATPase polarity after ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;284:F358-64.

Xia Z, Huang Z, Ansley DM. Large-dose propofol during cardiopulmonary bypass decreases biochemical markers of myocardial injury in coronary surgery patients: a comparison with isoflurane. *Anesth Analg*. 2006;103:527-32.

Yang B, Hosgood SA, Harper SJ, Nicholson ML. Leucocyte depletion improves renal function in porcine kidney hemoreperfusion through reduction of myeloperoxidase+ cells, caspase-3, IL-1beta, and tubular apoptosis. *J Surg Res*. 2010;164:e315-24.

Yamaguchi S, Hamaguchi S, Mishio M, Okuda Y, Kitajima T. Propofol prevents lipid peroxidation following transient forebrain ischemia in gerbils. *Can J Anaesth*. 2000;47:1025-30.

Yarlagadda SG, Coca SG, Formica RN Jr, Poggio ED, Parikh CR. Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24:1039-47.

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

Yoo KY, Yang SY, Lee J, Im WM, Jeong CY, Chung SS et al. Intracoronary propofol attenuates myocardial but not coronary endothelial dysfunction after brief ischaemia and reperfusion in dogs. *Br J Anaesth*. 1999;82:90-6.

Ytrehus K, Liu Y, Downey JM. Precontioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am J Physiol*. 1994;266:H1145-52.

Yu WK, Li WQ, Li N, Li JS. Influence of acute hyperglycemia in human sepsis on inflammatory cytokine and counterregulatory hormone concentrations. *World J Gastroenterol*. 2003;9:1824-7.

Yuzbasioglu MF, Aykas A, Kurutas EB, Sahinkanat T. Protective effects of propofol against ischemia/reperfusion injury in rat kidneys. *Ren Fail*. 2010;32:578-83.

Zager RA, Jurkowitz MS, Merola AJ. Responses of the normal rat kidney to sequential ischemic events. *Am J Physiol.* 1985;249:F148-59.

Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn DR, Pasch T, Schaub MC. Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial K (ATP) channels via multiple signaling pathways. *Anesthesiology.* 2002a;97:4-14.

Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn DR, Pasch T, Garcia C, Schaub MC. Differential effects of anesthetics on mitochondrial K (ATP) channel activity and cardiomyocyte protection. *Anesthesiology.* 2002b;97:15-23.

Zhang Y, Irwin MG, Wong TM, Chen M, Cao CM. Remifentanil preconditioning confers cardioprotection via cardiac kappa- and delta-opioid receptors. *Anesthesiology.* 2005;102:371-8.