



REVISTA BRASILEIRA DE ANESTESIOLOGIA

Publicação Oficial da Sociedade Brasileira de Anestesiologia
www.sba.com.br



ARTIGO CIENTÍFICO

Efeitos de dexmedetomidina em conjunto com o pré-condicionamento isquêmico remoto em lesão de isquemia-reperfusão renal em ratos

Emine Bagcik^a, Sevda Ozkardesler^b, Nilay Boztas^{b,*}, Bekir Ugur Ergur^c, Mert Akan^b, Mehmet Guneli^d e Sule Ozbilgin^b

^a Gordes State Hospital, Anesthesiology and Reanimation, Manisa, Turquia

^b Medical Faculty of 9 Eylul University, Anesthesiology and Reanimation, İzmir, Turquia

^c Medical Faculty of 9 Eylul University, Histology and Embryology, İzmir, Turquia

^d Medical Faculty of 9 Eylul University, Laboratory Animal Science, İzmir, Turquia

Recebido em 4 de julho de 2013; aceito em 2 de janeiro de 2014

Disponível na Internet em 2 de setembro de 2014

PALAVRAS-CHAVE

Rim;
Lesão de
isquemia-reperfusão;
Dexmedetomidina;
Caspase-3;
Pré-condicionamento
isquêmico;
Apoptose

Resumo

Justificativa e objetivos: Avaliar os efeitos do pré-condicionamento isquêmico remoto, mediante breve isquemia de membro posterior unilateral, em combinação com dexmedetomidina em lesão de isquemia-reperfusão renal por meio de histopatologia e imunorreatividade da caspase-3 ativa em ratos.

Métodos: Foram divididos em quatro grupos 28 ratos machos albinos Wistar. Grupo I (Sham [cirurgia controle], n = 7): laparotomia e dissecação do pedículo renal foram feitas em 65 minutos de anestesia e os ratos foram observados sob anestesia por 130 minutos. Grupo II (isquemia-reperfusão, n = 7): no 65º minuto de anestesia, os pedículos renais bilaterais foram pinçados; após 60 minutos de isquemia, foi feita reperfusão de 24 horas. Grupo III (isquemia-reperfusão + dexmedetomidina, n = 7): no quinto minuto de reperfusão, dexmedetomidina (100 mg/kg intraperitoneal) foi administrada ao grupo com isquemia-reperfusão. A reperfusão durou 24 horas. Grupo IV (isquemia-reperfusão + pré-condicionamento isquêmico remoto + dexmedetomidina, n = 7): após a laparotomia, três ciclos de pré-condicionamento isquêmico (10 minutos de isquemia e 10 minutos de reperfusão) foram aplicados no membro posterior esquerdo e depois de cinco minutos ao grupo III.

Resultados: Os escores de lesão histopatológica e imunorreatividade da caspase-3 ativa foram significativamente menores no grupo Sham em comparação com os outros. Os escores de lesão histopatológica dos grupos III e IV foram significativamente menores do que os do II (p = 0,03 e p = 0,05). A imunorreatividade da caspase-3 foi significativamente menor no grupo IV do que no II (p = 0,01) e não houve diferença significativa entre os grupos II e III (p = 0,06).

* Autor para correspondência.

E-mail: nilayboztas@hotmail.com (N. Boztas).

KEYWORDS

Kidney;
Ischemia–reperfusion
injury;
Dexmedetomidine;
Caspase-3;
Ischemic
preconditioning;
Apoptosis

Conclusões: O condicionamento farmacológico com dexmedetomidina e o pré-condicionamento isquêmico remoto em combinação com dexmedetomidina diminuem de modo significativa a lesão de isquemia-reperfusão renal histomorfologicamente. O uso combinado dos dois métodos previne a apoptose via caspase-3 ativa.

© 2014 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Effects of dexmedetomidine in conjunction with remote ischemic preconditioning on renal ischemia–reperfusion injury in rats**Abstract**

Background and objectives: The aim of this study was to evaluate the effects of remote ischemic preconditioning by brief ischemia of unilateral hind limb when combined with dexmedetomidine on renal ischemia–reperfusion injury by histopathology and active caspase-3 immunoreactivity in rats.

Methods: 28 Wistar albino male rats were divided into 4 groups. Group I (Sham, $n=7$): Laparotomy and renal pedicle dissection were performed at 65th minute of anesthesia and the rats were observed under anesthesia for 130 min. Group II (ischemia–reperfusion, $n=7$): At 65th minute of anesthesia bilateral renal pedicles were clamped. After 60 min ischemia 24 h of reperfusion was performed. Group III (ischemia–reperfusion + dexmedetomidine, $n=7$): At the fifth minute of reperfusion (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ intra-peritoneal) dexmedetomidine was administered with ischemia–reperfusion group. Reperfusion lasted 24 h. Group IV (ischemia–reperfusion + remote ischemic preconditioning + dexmedetomidine, $n=7$): After laparotomy, three cycles of ischemic preconditioning (10 min ischemia and 10 min reperfusion) were applied to the left hind limb and after 5 min with group III.

Results: Histopathological injury scores and active caspase-3 immunoreactivity were significantly lower in the Sham group compared to the other groups. Histopathological injury scores in groups III and IV were significantly lower than group II ($p=0.03$ and $p=0.05$). Active caspase-3 immunoreactivity was significantly lower in the group IV than group II ($p=0.01$) and there was no significant difference between group II and group III ($p=0.06$).

Conclusions: Pharmacologic conditioning with dexmedetomidine and remote ischemic preconditioning when combined with dexmedetomidine significantly decreases renal ischemia–reperfusion injury histomorphologically. Combined use of two methods prevents apoptosis via active caspase-3.

© 2014 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introdução

A lesão renal aguda isquêmica é uma síndrome clínica com altas taxas de mortalidade e morbidade. Por causa da grande demanda de energia e da complexa rede da microvasculatura renal, o rim é altamente sensível à lesão de isquemia-reperfusão (IR).¹— Os mecanismos da lesão de IR renal são multifatoriais, incluindo hipóxia, danos aos radicais livres e respostas inflamatórias sistêmicas.⁵ A reperfusão isquêmica do tecido renal induz condições celulares complexas e morte das células renais por causa da apoptose.⁶

Apoptose é uma forma de morte celular programada geneticamente. Duas vias principais desempenham um papel na apoptose epitelial. A primeira, conhecida como a via extrínseca ou de receptor de morte, é estimulada por moléculas da família TNF- α ligada ao CD95 (ligando Fas = CD95) através de sinais extracelulares. Essa via se conecta com a segunda, a intrínseca ou mitocondrial, por meio da ativação da caspase-3, que inclui o citocromo c e a família de proteínas Bcl-2, que, em conjunto, aumentam a apoptose.⁷

A apoptose de células tubulares renais é o resultado de uma lesão renal e o primeiro e importante contribuinte da fisiopatologia da IR. Tanto a inflamação quanto a apoptose coexistem em lesão de IR renal. Durante a hipóxia, a atividade da caspase aumenta como resultado do acúmulo intracelular de Ca^{2+} . A caspase torna-se ativa nos tecidos isquêmicos e é um indicador de morte celular.⁸ Essas alterações, que podem ser observadas em células tubulares, podem causar a perda das bordas em escova das células tubulares proximais e vazar da membrana basal das células para o lume tubular, com eventual obstrução do túbulo.^{9,10}

Entre os métodos usados para reduzir os efeitos da lesão de IR, o pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) e o condicionamento farmacológico são os mais comuns.¹¹ Na revisão da literatura de língua inglesa, não encontramos estudo de modelo de IR experimental que investigasse os efeitos do uso de condicionamento farmacológico com dexmedetomidina administrada em combinação com PCIR.

O objetivo deste estudo experimental foi investigar histopatologicamente os efeitos renais do PCIR unilateral administrado em combinação com dexmedetomidina

em extremidade inferior e avaliar a imunorreatividade da caspase-3 ativa em modelo de IR renal em ratos.

Materiais e métodos

Foram usados 28 ratos adultos machos, albinos Wistar, com 250-300 g. Até o início da pesquisa, os ratos foram mantidos em temperatura ambiente (21-22 ° C) e umidade relativa (40-60%) em um ciclo de claro/escuro (12/12-h) e alimentados com dieta padrão de ração e água *ad libitum*. Após a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da instituição, o estudo foi feito no Laboratório Multidisciplinar de Experimentação Animal. A anestesia foi fornecida com cetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) e administrada por via intraperitoneal (IP). Após a anestesia, os animais foram divididos em quatro grupos.

Grupo I (Sham, n=7): Após a laparotomia, os pedículos renais, direito e esquerdo, foram expostos no minuto 65 da anestesia e os ratos foram mantidos sob anestesia por 130 minutos sem outra intervenção.

Grupo II (IR, n=7): Após 60 minutos de isquemia, o clampe foi removido e a reperfusão dos rins foi permitida por 24 horas.

Grupo III (IR + dexmedetomidina, n=7): Após 60 minutos de isquemia, o clampe foi removido, 100 µg/kg de dexmedetomidina (Precedex 100 µg/2 mL, Abbott Laboratories, IL, EUA) foram administrados por via IP e a reperfusão dos rins foi permitida por 24 horas.

Grupo IV (IR + PCIR + dexmedetomidina, n=7): Em seguida à laparotomia, após cinco minutos de PCIR e 60 minutos subsequentes de isquemia renal, o clampe foi removido, 100 µg/kg de dexmedetomidina (Precedex 100 µg/2 mL, Abbott Laboratories) foram administrados e, finalmente, foi feita reperfusão de 24 horas (fig. 1).

Expor os pedículos renais no grupo I e iniciar a isquemia no minuto 65 da anestesia nos grupos II e III foi determinado para sincronizar todos os grupos para o tempo de pré-condicionamento do grupo IV e padronizar o início dos procedimentos. As amostras de tecido foram obtidas após 24 horas de reperfusão.

Para proteger os ratos da hipotermia, a mesa de operação foi aquecida com um aquecedor de lâmpada durante o estudo e a temperatura corporal foi medida com uma sonda retal e mantida a 3.737,5° C. Solução salina por via

subcutânea a cada hora, dosagem de 3 mL/kg, foi administrada para prevenir a desidratação. Durante o tempo de espera, o abdome foi fechado com tampão de gaze estéril úmida e pinça cirúrgica. Em todos os grupos, o rim esquerdo foi removido sob anestesia para análises histomorfológicas e os ratos foram sacrificados por sangria de punção cardíaca ao término do estudo. Os rins foram fixados em formol tamponado a 10% e embebidos em parafina, cortados em lâminas de 4-5 µm e corados com hematoxilina e eosina para estudo histológico com o uso de microscópio de luz.

Modelo de IR renal

Os pedículos renais bilaterais foram expostos após a laparotomia. A isquemia renal total dos pedículos renais bilaterais foi mantida com clameamento microvascular atraumático. A oclusão adequada foi confirmada pela falta de pulsação nos pedículos renais e pela palidez dos rins. Após o período isquêmico, os clampes microvasculares foram removidos e a reperfusão ocorreu.

Modelo de PCIR

Para o efeito do torniquete do PCIR, um método que mostrou ser eficaz por cintilografia de perfusão e um medidor de laser foram usados.^{12,13} Para essa finalidade, o membro posterior esquerdo do rato foi preso com uma tira elástica (1 cm de largura e 30 cm de comprimento) na virilha e se aplicou pressão ao redor. Três ciclos de 10 minutos de isquemia foram feitos, seguidos por 10 minutos de reperfusão (65 minutos no total). A interrupção do fluxo sanguíneo foi confirmada com o uso de um medidor da corrente do laser (laser Flo BPM2, Vasamedic, EUA).

Avaliação histomorfológica de tecido renal

As secções de tecido renal após IR foram avaliadas por microscopia de luz por dois histologistas, «cegos» para as designações dos grupos de animais, que investigaram as alterações estruturais dos túbulos proximais (atrofia tubular, perda de borda tubular em escova, vacuolização, dilatação tubular, formação de cálculo), a infiltração de células mononucleares (CMN), as alterações intersticiais estruturais, a morfologia do corpúsculo renal e as células em necrose e apoptose.

A classificação das imagens transversais foi feita por meio de escores semiquantitativos quanto a lesões tubulointersticiais da seguinte forma: 0 = nenhuma lesão, 1 = 0-25%, 2 = 26-45%, 3 = 46-75% e 4 = 76-100%.¹⁴

Métodos de imuno-histoquímica

Os tecidos renais foram fixados em formol tamponado a 10% e, depois dos procedimentos histológicos de rotina, foram embebidos em parafina e seccionados em cortes de 3 µm de espessura com um micrótomo e coletados em lâminas revestidas com poli-L-lisina.

As amostras foram armazenadas em forno a 60 °C durante 12 horas. Em seguida, um anticorpo monoclonal anticaspase-3 específico para rato (RB-10287-R7 LabVision) foi usado para avaliar a imunorreatividade anticaspase-3.

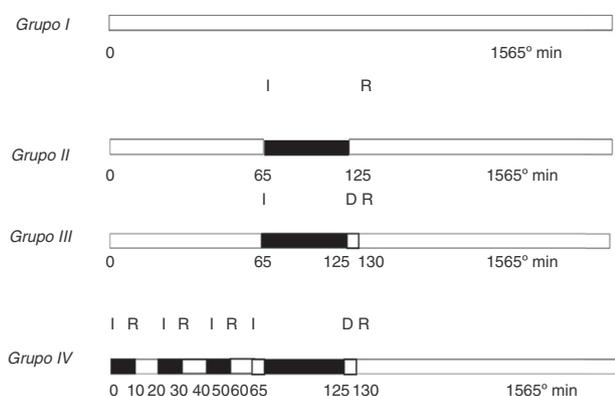


Figura 1 Representação esquemática do protocolo experimental. I, isquemia; R, reperfusão; D, dexmedetomidina.

A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% em álcool. As secções de lisina foram tratadas com o anticorpo anticaspase-3 a 4° C durante a noite e, em seguida, incubadas com um anticorpo secundário biotilado durante 30 minutos. Depois da aplicação do *kit* Vector Elite ABC (Vector Laboratories Inc., Burlingame, EUA), o complexo biotina-avidina-peroxidase para o anticorpo foi visualizado com 0,02% de solução de 3,3'-diaminobenzidina. Após a contracoloração com hematoxilina de Mayer, a imagem foi analisada.

A taxa de coloração positiva foi avaliada com um indicador de escore semiquantitativo (1-4) para densidade e distribuição.

Critérios de exclusão

Os ratos que precisaram de reanimação foram excluídos do estudo.

Análise estatística

O programa SPSS (versão 15,0; SPSS, Chicago, IL, EUA) foi usado. A análise de variância de Kruskal-Wallis foi feita. O teste *U* de Mann-Whitney foi usado para as comparações pareadas dos grupos. Todos os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicadores de significância estatística.

Resultados

Um rato do grupo *iv* morreu durante o período de reperfusão e foi excluído do estudo. Os escores histomorfológicos e imuno-histoquímicos das lesões dos grupos de estudo são apresentados nas tabelas 1 e 2.

Escore histomorfológico das lesões renais

Infiltração de CMN: Os escores histomorfológicos das lesões do grupo *Sham* foram significativamente menores do que os do grupo *iv* ($p = 0,01$). Os escores das lesões do grupo IR foram significativamente maiores do que os dos grupos IR+Dex e IR+PCIR+Dex ($p = 0,04$ e $p = 0,04$, respectivamente; *fig. 2*).

Alterações estruturais dos túbulos proximais: Os escores histomorfológicos das lesões do grupo *Sham* foram significativamente menores do que os dos grupos IR, IR+Dex,

Tabela 2 Resultados imuno-histoquímicos das lesões dos grupos

Grupo I (n = 7) Sham	0,85 \pm 0,37
Grupo II (n = 6) IR	2,50 \pm 0,54
Grupo III (n = 7) IR + Dex	1,71 \pm 0,75
Grupo IV (n = 7) IR + PCIR + Dex	1,42 \pm 0,53

Dados expressos como média \pm DP.

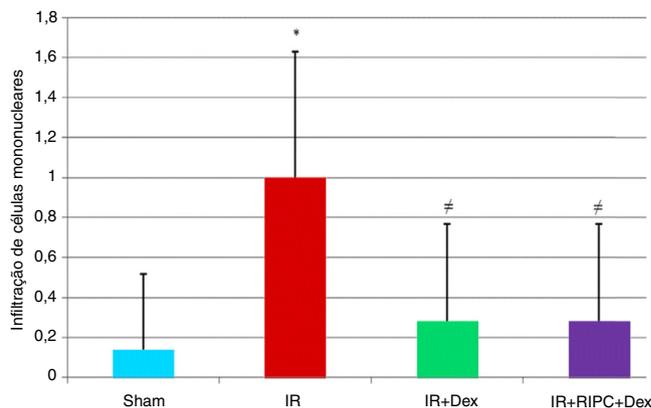


Figura 2 Escores de infiltração de células mononucleares detectada por exame histomorfológico renal. *Comparação do grupo IR com o grupo *Sham* ($p = 0,01$). # Comparação dos grupos IR+Dex e IR+PCIR+Dex com o grupo *iv* ($p < 0,05$).

e IR+PCIR+Dex ($p < 0,01$, $p = 0,02$ e $p = 0,02$, respectivamente). O grupo IR apresentou escores significativamente mais elevados do que os grupos IR+Dex e IR+PCIR+Dex ($p = 0,05$ e $p = 0,05$, respectivamente), enquanto que não houve diferença significativa entre os grupos IR+Dex e IR+PCIR+Dex ($p = 1,00$; *fig. 3*).

Alterações glomerulares: Os escores histomorfológicos das lesões do *Sham* foram significativamente menores do que os do grupo *iv* ($p = 0,04$). O grupo IR apresentou escores significativamente mais elevado do que os grupos IR+Dex e IR+PCIR+Dex ($p = 0,04$ e $p = 0,04$, respectivamente), enquanto não houve diferença significativa entre os grupos IR+Dex e IR+PCIR+Dex ($p = 1,00$; *fig. 4*).

Escore histopatológico total das lesões: O do grupo *Sham* foi significativamente menor do que o do grupo *iv* ($p = 0,003$). A comparação do grupo IR com os grupos IR+Dex e IR+PCIR+Dex mostrou escores significativamente mais

Tabela 1 Resultados histomorfológicos das lesões dos grupos

	CMN	AETP	AG	ETLI
Grupo I (n = 7) Sham	0,14 \pm 0,38	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,28 \pm 0,48
Grupo II (n = 6) IR	1,0 \pm 0,63	1,67 \pm 0,82	0,50 \pm 0,55	3,83 \pm 2,22
Grupo III (n = 7) IR + Dex	0,28 \pm 0,49	0,71 \pm 0,75	0,0 \pm 0,0	1,42 \pm 1,27
Grupo IV (n = 7) IR + PCIR + Dex	0,28 \pm 0,49	0,71 \pm 0,75	0,0 \pm 0,0	1,42 \pm 1,61
p^a	0,04 ^b	0,00 ^b	0,01 ^b	0,008 ^b

Dados expressos como média \pm DP.

CMN, infiltração de células mononucleares; AETP, alterações estruturais dos túbulos proximais; AG, alterações glomerulares; ETLI, escore total das lesões histológicas.

^a Teste de Kruskal-Wallis.

^b $p < 0,05$: diferença significativa entre os grupos.

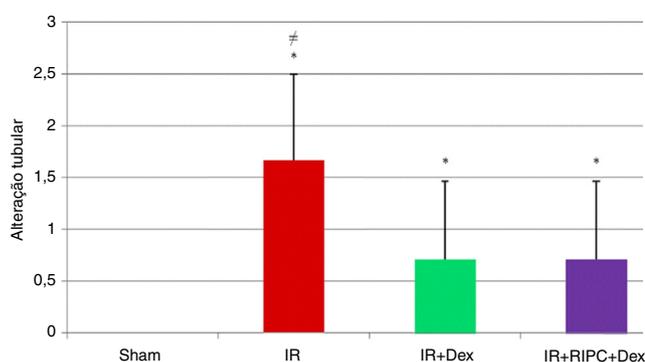


Figura 3 Escores de alteração de lesão tubular detectada pelo exame histomorfológico renal. *Comparação dos grupos IR, IR +Dex e IR +PCIR +Dex com o grupo Sham ($p < 0,01$). \neq Comparação do grupo IR com os grupos IR +Dex e IR +PCIR +Dex ($p = 0,05$).

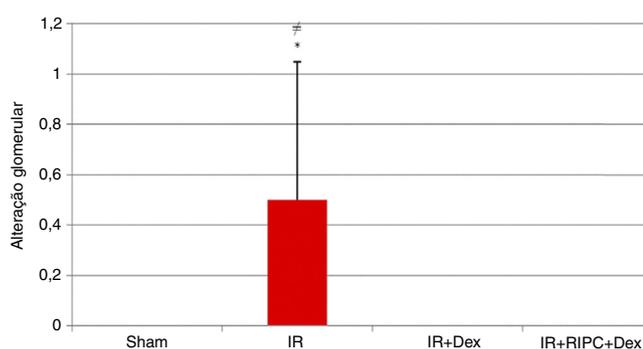


Figura 4 Escores de alteração de lesão glomerular detectada por histomorfologia renal. *Comparação do grupo IR com o grupo Sham ($p < 0,01$). \neq Comparação do grupo IR com os grupos IR +Dex e IR +PCIR +Dex ($p < 0,05$).

elevados do que os do grupo IR ($p = 0,03$ e $p = 0,05$, respectivamente), enquanto não houve diferença significativa entre os grupos IR +Dex e IR +PCIR +Dex ($p = 0,79$; [fig. 5](#)).

Escore imuno-histoquímico das lesões: Os escores da coloração imuno-histoquímica do grupo IR foram significativamente maiores do que os do grupo Sham ($p = 0,001$).

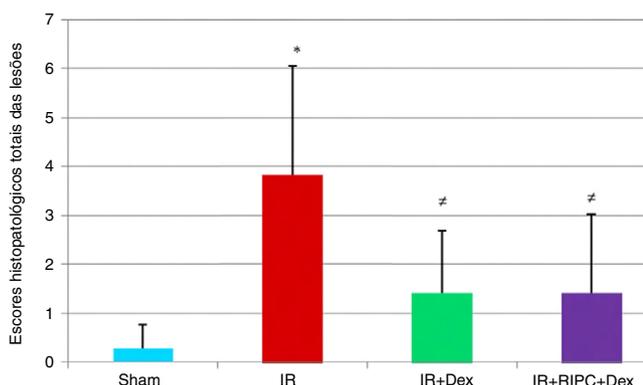


Figura 5 Escore histopatológico total das lesões detectadas por histomorfologia renal. *Comparação do grupo IR com o grupo Sham ($p < 0,01$). \neq Comparação do grupo IR com os grupos IR +Dex e IR +PCIR +Dex ($p < 0,05$).

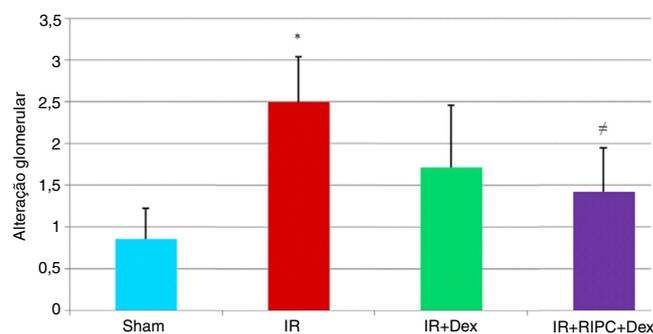


Figura 6 Escore da imuno-histoquímica renal. *Comparação do grupo IR com o grupo Sham ($p < 0,01$). \neq Comparação do grupo IR com os grupos IR +Dex e IR +PCIR +Dex ($p = 0,01$).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos IR e IR +Dex ($p = 0,06$).

Na comparação dos escores das lesões entre os grupos IR +PCIR +Dex e IR, os do grupo IR +PCIR +Dex foram significativamente menores ($p = 0,01$). Os escores das lesões dos grupos IR +Dex e IR +PCIR +Dex não diferiram ($p = 0,47$; [fig. 6](#)).

Nenhuma infiltração celular ou perda de borda em escova foi observada nas secções do grupo Sham ([fig. 7 A e B](#)). Contudo, no grupo IR, observamos infiltração peritubular de CMN, mais proeminente na área cortical, e perda de borda em escova das células do túbulo proximal, atrofia tubular,

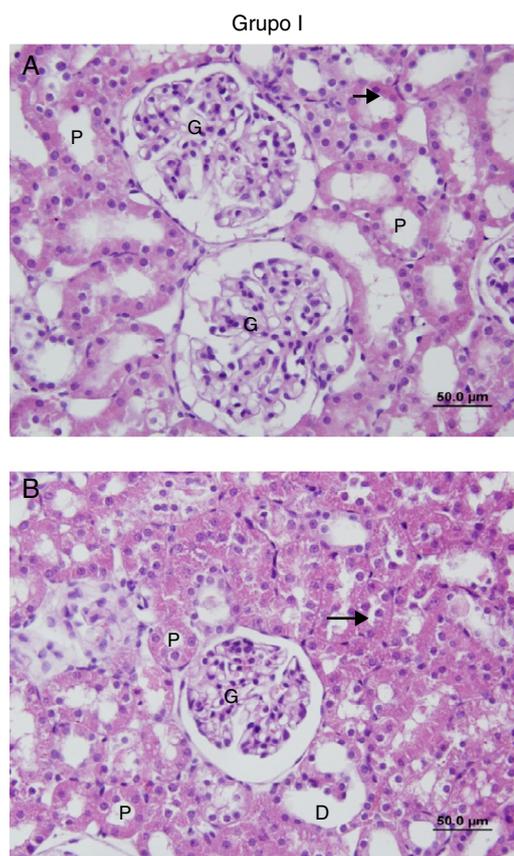


Figura 7 Secções (A e B) do grupo Sham. G, glomerular; P, túbulo proximal; D, túbulo distal, borda em escova.

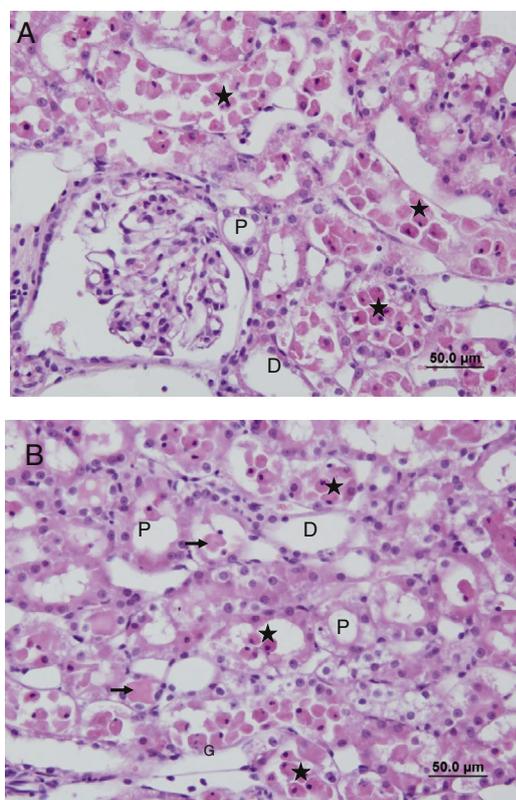


Figura 8 Seções (A e B) do grupo IR. L, glomerular; P, túbulo proximal; D, túbulo distal; (fx1), acúmulo de material proteico nos túbulos; (*), vertido para dentro do lume de células epiteliais tubulares.

dilatação tubular e vacuolização. Em alguns dos túbulos, acúmulo de material proteico, em conjunto com a formação de castas e detritos celulares no lume dos túbulos, foi observado (fig. 8 A e B).

No grupo IR+Dex, houve perda de borda em escova das células tubulares, atrofia tubular, dilatação tubular, vacuolização e acúmulo de material proteico e detritos celulares no lume dos túbulos, porém em menor quantidade do que no grupo IR (fig. 9 A e B).

Comparado com o grupo IR, o grupo IR+PCIR+Dex apresentou atrofia tubular, dilatação tubular, vacuolização, acúmulo de material proteico e detritos celulares no lume dos túbulos e perda de borda em escova das células tubulares, embora em menor quantidade. No entanto, em comparação com o grupo IR+Dex, as alterações tubulares foram menos acentuadas (fig. 10 A e B).

A intensidade da coloração imuno-histoquímica foi maior nas células positivas para caspase-3 ativa no grupo IR em comparação com o grupo *Sham*, enquanto foi menor nas células dos grupos IR+Dex e IR+PCIR+Dex comparados com o grupo IR. A intensidade da coloração das células positivas para caspase-3 ativa do grupo IR+PCIR+Dex foi menor em comparação com o grupo IR+Dex (fig. 11).

Discussão

A insuficiência renal aguda que ocorre como resultado de isquemia pode ser causada por hipotensão, hipovolemia e

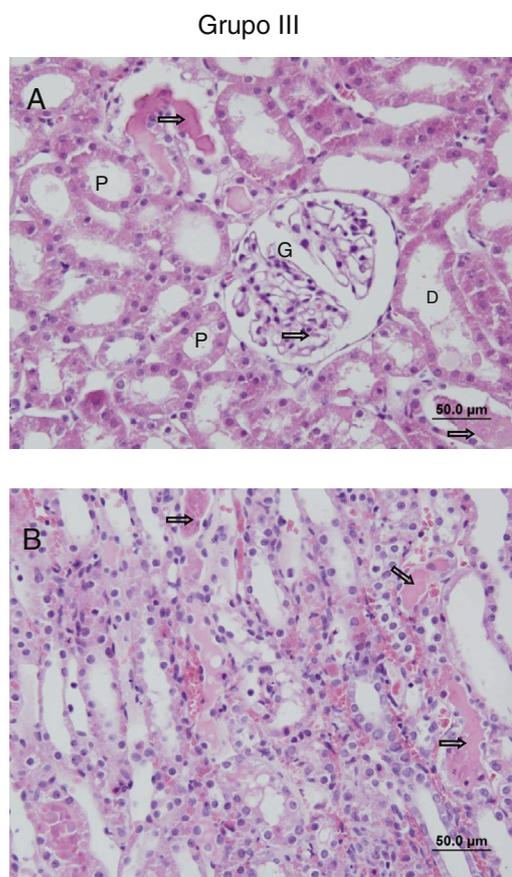


Figura 9 Seções (A e B) do grupo IR+Dex. G, glomerular; P, túbulo proximal; D, túbulo distal; (fx2), acúmulo de material proteico a ser reduzido em comparação com os outros grupos.

hipoperfusão secundária à desidratação, bem como lesão de IR em cirurgias de grande porte, como as cardiotorácicas, vasculares e transplantes.¹⁵⁻¹⁸ A lesão de IR é uma das causas mais comuns de insuficiência renal aguda no perioperatório.¹⁸

Métodos como o PCIR e o condicionamento farmacológico com dexmedetomidina, que são usados para prevenir ou tratar lesões de IR renal, têm mostrado efeitos positivos em lesão de IR em muitos estudos anteriores.¹¹

Em pesquisa na literatura, não encontramos estudo que avaliasse os efeitos da combinação desses dois métodos em lesão de IR. Este estudo experimental, com um modelo de rato de IR renal, comparou os efeitos do uso de dexmedetomidina pura ou PCIR em combinação com dexmedetomidina contra a apoptose renal e os avaliou por meio da imunoreatividade da caspase-3 e de escores histopatológicos das lesões.

De acordo com nossos resultados, o uso de dexmedetomidina pura ou em combinação com PCIR reduziu significativamente a infiltração de CMN, as alterações glomerulotubulares e o escore total de lesões de IR. Em ambos os grupos, todos os escores, exceto para os de alterações tubulares ($p=0,05$), foram semelhantes aos do grupo *Sham*. Houve redução significativa da imunoreatividade da caspase-3 no grupo dexmedetomidina em combinação com PCIR, o que sugere que a apoptose, a

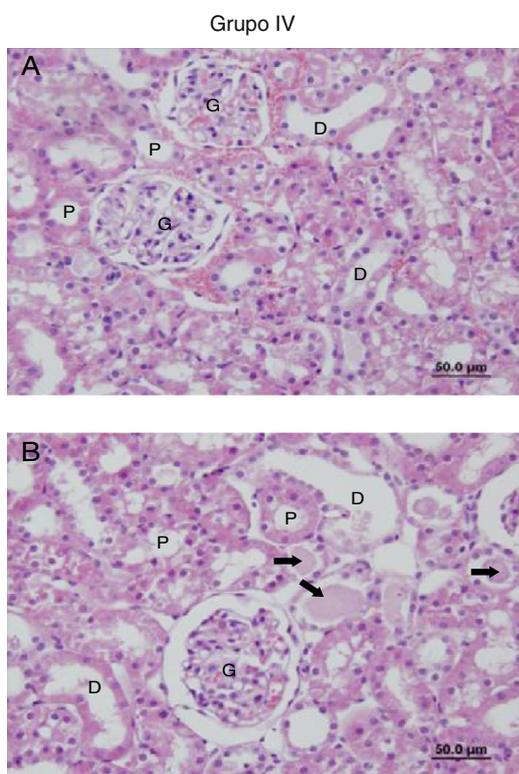


Figura 10 Seções (A e B) do grupo IR+PCIR+Dex. G, glomerular; P, túbulo proximal; D, túbulo distal; (fx3), acúmulo de material proteico de ser reduzido em comparação com os outros grupos.

principal via de lesão IR, pode ser reduzida ou prevenida com o uso dessa combinação.

Vários períodos de isquemia e reperfusão foram usados em modelos de lesão de IR renal em muitos estudos.¹⁹⁻²² O período isquêmico crítico depende do órgão e isquemia

com duração superior a cinco minutos para o cérebro e 15-20 minutos para o fígado e o rim pode causar morte neuronal e infarto.²³ Williams et al.²⁰ investigaram os efeitos da lesão de IR em amostras de sangue e tecidos obtidos pós-reperfusão após 45 minutos de isquemia renal e relataram que a lesão de IR renal ocorreu mais cedo – na quarta hora – e atingiu o pico na 24ª hora.

Os efeitos protetores de órgãos da dexmedetomidina contra a lesão de IR foram demonstrados em vários tecidos, como o cérebro, o coração e os rins.²⁴⁻²⁷ Os efeitos de dexmedetomidina em lesão de IR renal em ratos foram investigados por Kocoğlu et al.¹⁹ Esses pesquisadores relataram uma diminuição significativa nos escores histopatológicos de lesão, detectados no minuto 45 após a administração IP de 100 µg/kg de dexmedetomidina no início da reperfusão. Em nosso estudo, com a mesma dose de dexmedetomidina administrada no início da reperfusão, um efeito renoprotetor foi obtido, como evidenciado por reduções significativas dos escores histológicos das lesões. Esse efeito renoprotetor foi encontrado não só durante o período inicial após a lesão de reperfusão, mas permaneceu até a 24ª hora, que foi considerada o pico da lesão de IR.²⁰

Embora o mecanismo subjacente ao efeito protetor de dexmedetomidina em IR renal não esteja claro, considera-se que dexmedetomidina aumenta o fluxo sanguíneo renal e a filtração glomerular e reduz a liberação de noradrenalina.²⁸

Villela et al.,²⁹ relataram que a administração de dexmedetomidina em dose baixa em cães anestesiados reduziu a osmolalidade urinária e o nível plasmático de vasopressina e causou a diurese de água livre. Em pacientes que não apresentavam doença renal, mas foram submetidos à cirurgia torácica, ao administrar uma infusão de dexmedetomidina, Frumento et al.³⁰ relataram melhoria da função renal, inclusive do fluxo urinário e da filtração glomerular no período pós-operatório.

Um dos mecanismos mais prováveis da ação de dexmedetomidina é proteger o rim ao inibir a resposta ao estresse

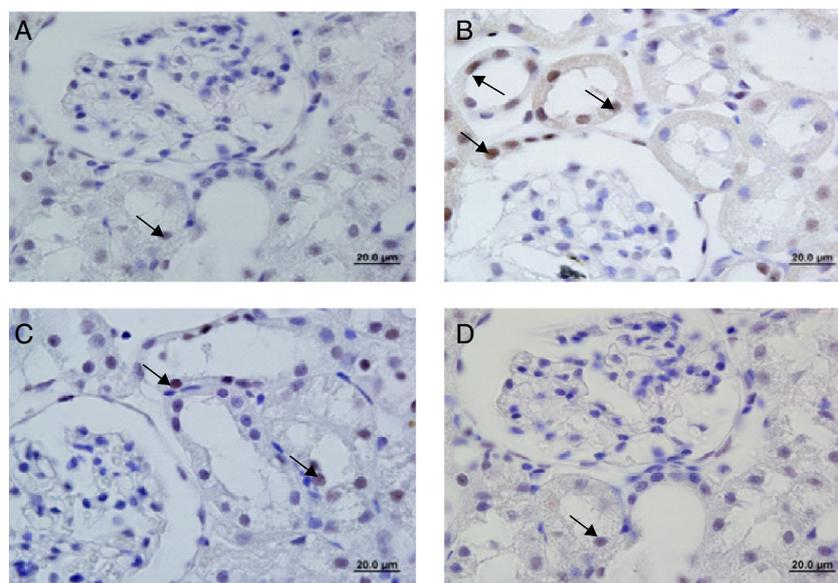


Figura 11 Imagens seccionais coradas da caspase-3 na imuno-histoquímica dos grupos experimentais. (A) Sham, (B) IR, (C) IR+Dex e (D) IR+PCIR+Dex; fx4, imunocoloração da caspase-3 ativa indica células epiteliais positivas no túbulo proximal. (C e D) Seções de imunocoloração da caspase-3 ativa positiva observada nas células epiteliais do túbulo proximal, diminuída no grupo B.

cirúrgico e prevenir a vasoconstrição mediada pelo sistema adrenérgico.³¹⁻³⁴ Esse mecanismo de ação também pode aumentar a vasodilatação arterial renal por meio de efeitos vasculares diretos.¹⁹ Há relato de que PKC desempenha um papel importante no pré-condicionamento isquêmico e abre os canais de K⁺ dependentes de ATP mitocondrial e sarcolémico ao estimular as vias de transdução intracelular e induzir a síntese de proteínas celulares protetoras. Em um estudo das vias opcionais de transdução de sinal, os agonistas do receptor alfa-2B mostraram estimular a atividade de PKC e a produção de trifosfato de inositol em células de túbulos coletores renais distais, o que sugere que os agonistas alfa-2 imitam a proteção celular mímico por PCI.^{35,36} Gu et al.,¹⁸ investigaram o mecanismo de ação de dexmedetomidina *in vitro* com cultura de células humanas estabilizadas do túbulo proximal renal, privadas de oxigênio e glicose. Os pesquisadores relataram tanto um aumento significativo da expressão de fosfo-Akt em cultura de células tubulares após tratamento com dexmedetomidina, dependente da dose, quanto um efeito do adrenoreceptor alfa-2. A via fosfo-Akt garante a viabilidade celular ao inibir as vias de apoptose intrínsecas controladas por caspase por meio da fosforilação da Bcl-2 pró-apoptótica, o que desencadeia a morte celular e o aumento das expressões de Bcl-2 e Bcl-XL antiapoptóticas.

O efeito neuroprotetor de dexmedetomidina foi relatado como o resultado de um aumento das expressões de Bcl-2 e Mdm-2 antiapoptóticas; esse aumento tem sido associado a uma redução dos níveis de caspase-3 e Bax³⁷ pró-apoptóticas. A via Akt é essencial para a recuperação de IR renal. Neste estudo, como um indicador de apoptose, a imunorreatividade da caspase-3 foi avaliada. A ativação da caspase-3 é o passo final da apoptose, que é comum às duas principais vias de apoptose e um indicador definitivo de morte celular. A administração de dexmedetomidina mostrou diminuir a imunorreatividade da caspase-3 ativa, mas não de modo significativo ($p = 0,06$), em comparação com a lesão de IR.

Essa diferença estatisticamente não significativa pode ser explicada pelo pequeno número de sujeitos do estudo. O pré-condicionamento isquêmico é um método aplicado mecânica ou farmacologicamente antes da isquemia do órgão-alvo para reduzir o nível subsequente da lesão de IR. O objetivo do pré-condicionamento isquêmico é aplicar isquemia e reperfusão de órgãos-alvo, em curtos intervalos de tempo, para garantir que o(s) órgão(s)-alvo pode(m) tolerar bem a isquemia. A grande demanda de energia e a intensa rede microvascular dos rins os tornam vulneráveis à lesão de IR, que é considerada uma das principais causas de lesão renal em estenose de artéria renal e cirurgia microvascular renal. A lesão de IR renal é a principal causa de morbidade e mortalidade cardiovascular e está associada ao atraso da função do enxerto pós-transplante e à ocorrência de lesão renal em cirurgia cardíaca e aórtica e à lesão renal pós-choque.^{1-4,38,39}

Estudos tanto experimentais quanto clínicos na literatura mostram que o PCI de órgão distante pode proteger o rim.^{40,41} Semelhantemente ao nosso estudo, Wever et al.,⁴⁰ investigaram o efeito do pré-condicionamento isquêmico direto (PCID) em extremidade posterior em lesão de IR renal. Em contraste, esses autores compararam o efeito da administração de PCID, contínua ou periodicamente, e

também em uma ou duas extremidades. Embora tenham feito três ciclos de PCID, os investigadores usaram períodos I/R de 4/4 minutos e investigaram os eventuais efeitos no minuto 25 de isquemia. Os autores relataram que a expressão da molécula-1, que indica lesão renal e tubular renal, diminuiu significativamente no grupo com três ciclos de I/R. Além disso, essa proteção não foi associada à adenosina, um dos elementos-chave na lesão de IR. O mecanismo subjacente do PCID e suas vias de transdução ainda não estão completamente esclarecidos. Ambas as vias de origem neural e transmissores bioquímicos podem desempenhar um papel no mecanismo do PCID.⁴² Esses mecanismos podem variar, a depender do órgão-alvo e do protocolo de pré-condicionamento aplicado. Nos métodos de isquemia miocárdica que usaram PCID renal, a expressão da proteína NF- κ B seguida pela abertura dos canais de K⁺/ATP foi considerada importante.⁴³

Embora a lesão de IR renal seja um problema clínico comum e importante, as estratégias para reduzir a lesão de IR são insuficientes e novos tratamentos são necessários. Na literatura, não há relato sobre a proteção farmacológica e mecânica em lesão de IR renal em ratos.

Dois métodos diferentes usados em lesões de IR renal em ratos: dexmedetomidina, amplamente relatada como eficaz, e PCID, que demonstrou ser eficaz em alguns estudos,¹¹ foram combinados e comparados. Semelhantemente à dexmedetomidina, o uso combinado de dexmedetomidina e PCID impediu a lesão histopatológica e melhorou os escores da lesão de IR, exceto os escores de alterações tubulares, para níveis próximos ao grupo *Sham*. Ao mesmo tempo, a diminuição significativa da imunorreatividade da caspase-3, em comparação com o grupo IR, sugere que o uso combinado de dexmedetomidina e PCID pode prevenir a apoptose. O uso de dexmedetomidina pura diminuiu a imunorreatividade da caspase-3 ativa, ainda que não de modo significativo, o que sugere que esses dois métodos operam por meio das vias semelhantes. Esses dois métodos de proteção podem aumentar o efeito um do outro.

Em nosso estudo, usamos xilazina, um agente anestésico com atividade alfa-2-agonista, e cetamina,⁴² que sugeriram ter efeitos negativos sobre a lesão de IR. Os escores histopatológicos e a imunorreatividade da caspase-3 ativa foram normais no grupo *Sham*, o que sugere que a cetamina não teve efeito negativo sobre os nossos resultados.

Não mostramos o efeito isolado do PCID em apoptose, que desempenha um papel fundamental no mecanismo da lesão de IR, o que constitui uma limitação do presente estudo. Outros fatores limitantes foram a não avaliação do estresse oxidativo e dos mediadores inflamatórios, que também são responsáveis pela lesão IR, e da via neurogênica.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

1. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, et al. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation*. 1997;63:968-74.

2. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, et al. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet*. 2004;364:1814–27.
3. Ojo AO, Held PJ, Port FK, et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med*. 2003;349:931–40.
4. Nigwekar SU, Kandula P, Hix JK, et al. Off-pump coronary artery bypass surgery and acute kidney injury: a meta-analysis of randomized and observational studies. *Am J Kidney Dis*. 2009;54:413–23.
5. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia–reperfusion injury. *Anesthesiology*. 2001;94:1133–8.
6. Tsutsui H, Sugiura T, Hayashi K, et al. Moxonidine prevents ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *Eur J Pharmacol*. 2009;603:73–8.
7. Yazıcı P, Alizadehshargh S, Akdogan G. Apoptosis: regulatory molecules, relationships with diseases and apoptosis detection methods. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*. 2009;29:1677–86.
8. Faubel S, Edelstein CL. Caspases as drug targets in ischemic organ injury. *Immune Endocr Metabol Disord*. 2005;5:269–87.
9. Noiri E, Gailit J, Sheth D, et al. Cyclic RGD peptides ameliorate ischemic acute renal failure in rats. *Kidney Int*. 1994;46:1050–8.
10. Friedewald JJ, Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney Int*. 2004;66:486–91.
11. Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, et al. Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury – a review. *J Surg Res*. 2008;150:304–30.
12. Kanoria S, Jalan R, Davies NA, et al. Remote ischaemic preconditioning of the hind limb reduces experimental liver warm ischaemia–reperfusion injury. *Br J Surg*. 2006;93:762–8.
13. Duru S, Koca U, Oztekin S, et al. Antithrombin III pretreatment reduces neutrophil recruitment into lung and skeletal muscle tissues in the rat model of bilateral lower limb ischemia and reperfusion: a pilot study. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2005;49:1142–8.
14. Feng L, Xiong Y, Cheng F, et al. Effect of ligustrazine on ischemia–reperfusion injury in murine kidney. *Transplant Proc*. 2004;36:1949–51.
15. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *N Engl J Med*. 1996;334:1448–60.
16. Brezis M, Rosen S, Silva P, et al. Renal ischemia: a new perspective. *Kidney Int*. 1984;26:375–83.
17. Caron A, Desrosiers RR, Beliveau R. Kidney ischemia reperfusion regulates expression and distribution of tubulin subunits, beta-actin and rho GTPases in proximal tubules. *Arch Biochem Biophys*. 2004;431:31–46.
18. Gu J, Pamela S, Hailin Z, et al. Dexmedetomidine provides renoprotection against ischemia–reperfusion injury in mice. *Crit Care*. 2011;15:R153.
19. Kocoglu H, Ozturk H, Ozturk H, et al. Effect of dexmedetomidine on ischemia-reperfusion injury in rat kidney: a histopathologic study. *Ren Fail*. 2009;31:70–4.
20. Williams P, Lopez H, Britt D, et al. Characterization of renal ischemia–reperfusion injury in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1997;37:1–7.
21. Fujii T, Takaoka M, Muraoka T, et al. Preventive effect of L-carnosine on ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Eur J Pharmacol*. 2003;474:261–7.
22. Hussein Ael-A, Shekir AA, Sarhan ME, et al. Effects of combined erythropoietin and epidermal growth factor on renal ischemia/reperfusion injury: a randomized experimental controlled study. *BJU Int*. 2011;107:323–8.
23. Jaeschke H, Farhood A. Kupffer cell activation after no-flow ischemia versus hemorrhagic shock. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:210–9.
24. Sanders RD, Maze M. Alpha 2-adrenoceptor agonists. *Curr Opin Investig Drugs*. 2007;8:25–33.
25. Billings FT, Chen SW, Kim M, et al. Alpha 2-adrenergic agonists protect against radioccontrast-induced nephropathy in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;295:741–8.
26. Ma D, Hossain M, Rajakumaraswamy N, et al. Dexmedetomidine produces its neuroprotective effect via the alpha 2A-adrenoceptor subtype. *Eur J Pharmacol*. 2004;502:87–97.
27. Kuhmonen J, Pokorny J, Miettinen R, et al. Neuroprotective effects of dexmedetomidine in the gerbil hippocampus after transient global ischemia. *Anesthesiology*. 1997;87:371–7.
28. Taoda M, Adachi YU, Uchihashi Y, et al. Effect of dexmedetomidine on the release of [³H]-noradrenaline from rat kidney cortex slices: characterization of alpha2-adrenoceptor. *Neurochem Int*. 2001;38:317–22.
29. Villela NR, Nascimento PVN, Carvalho LR. Effects of dexmedetomidine on renal system and on vasopressin plasma levels. Experimental study in dogs. *Rev Bras Anesthesiol*. 2005;55:429–40.
30. Frumento RJ, Logginidou HG, Wahlander S, et al. Dexmedetomidine infusion is associated with enhanced renal function after thoracic surgery. *J Clin Anesth*. 2006;18:422–6.
31. Kulka PJ, Tryba M, Zenz M. Preoperative alpha 2-adrenergic receptor agonists prevent the deterioration of renal function after cardiac surgery: results of a randomized, controlled trial. *Crit Care Med*. 1996;24:947–52.
32. Helbo-Hansen S, Fletcher R, Lundberg D, et al. Clonidine and the sympatico-adrenal response to coronary artery by-pass surgery. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1986;30:235–42.
33. Kulka PJ, Tryba M, Zenz M. Dose–response effects of intravenous clonidine on stress response during induction of anesthesia in coronary artery bypass graft patients. *Anesth Analg*. 1995;80:263–8.
34. Flacke JW, Bloor BC, Flacke WE, et al. Reduced narcotic requirement by clonidine with improved hemodynamic and adrenergic stability in patients undergoing coronary bypass surgery. *Anesthesiology*. 1987;67:11–9.
35. Gesek FA. Alpha2-adrenergic receptors activate phospholipase C in renal epithelial cells. *Mol Pharmacol*. 1996;50:407–14.
36. O'Rourke B. Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection. *Circ Res*. 2004;94:420–32.
37. Engelhard K, Werner C, Eberspacher E, et al. The effect of the alpha 2-agonist dexmedetomidine and the N-methyl-D-aspartate antagonist S(+)-ketamine on the expression of apoptosis-regulating proteins after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Anesth Analg*. 2003;96:524–31.
38. Safian RD, Textor SC. Renal-artery stenosis. *N Engl J Med*. 2001;344:431–42.
39. Schrier RW, Wang W. Acute renal failure and sepsis. *N Engl J Med*. 2004;351:159–69.
40. Wever KE, Menting TP, Rovers M, et al. Ischemic preconditioning in the animal kidney, a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*. 2012;7:e32296.
41. Venugopal V, Laing CM, Ludman A, et al. Effect of remote ischemic preconditioning on acute kidney injury in nondiabetic patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a secondary analysis of 2 small randomized trials. *Am J Kidney Dis*. 2010;56:1043–9.
42. Curtis FG, Vianna PT, Viero RM. Dexmedetomidine and S(+)-ketamine in ischemia and reperfusion injury in the rat kidney. *Acta Cir Bras*. 2011;26:202–6.
43. Diwan V, Kant R, Jaggi AS, et al. Signal mechanism activated by erythropoietin preconditioning and remote renal preconditioning-induced cardioprotection. *Mol Cell Biochem*. 2008;315:195–201.