



REVISTA BRASILEIRA DE ANESTESIOLOGIA

Publicación Oficial de la Sociedade Brasileira de Anestesiologia
www.sba.com.br



ARTÍCULO CIENTÍFICO

Efectos de la dexmedetomidina en conjunto con el precondicionamiento isquémico remoto en la lesión de isquemia-reperfusión renal en ratones

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

^a Departamento de Anestesiología y Reanimación, Gordes State Hospital, Manisa, Turquía

^b Departamento de Anestesiología y Reanimación, Medical Faculty of 9 Eylul University, İzmir, Turquía

^c Departamento de Histología y Embriología, Medical Faculty of 9 Eylul University, İzmir, Turquía

^d Laboratorio de Ciencia Animal, Medical Faculty of 9 Eylul University, İzmir, Turquía

Recibido el 4 de julio de 2013; aceptado el 2 de enero de 2014

Disponible en Internet el 16 de septiembre de 2014

PALABRAS CLAVE

Riñón;
Lesión de
isquemia-reperfusión;
Dexmedetomidina;
Caspasa-3;
Precondicionamiento
isquémico;
Apoptosis

Resumen

Introducción y objetivos: El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos del precondicionamiento isquémico remoto mediante breve isquemia del miembro posterior unilateral en combinación con la dexmedetomidina en la lesión de isquemia-reperfusión renal por medio de histopatología e inmunoreactividad de la caspasa-3 activa en ratones.

Métodos: 28 ratones machos albinos Wistar fueron divididos en 4 grupos. Grupo I (*Sham* [cirugía control], n=7): se realizó laparotomía y disección del pedículo renal en 65 min de anestesia y los ratones fueron observados bajo anestesia durante 130 min. Grupo II (isquemia-reperfusión, n=7): en el sexagésimo quinto minuto de anestesia, los pedículos renales bilaterales fueron pinzados; después de 60 min de isquemia, se realizaron 24 h de perfusión. Grupo III (isquemia-reperfusión + dexmedetomidina, n=7): al quinto minuto de perfusión, la dexmedetomidina (100 µg/kg intraperitoneal) fue administrada en el grupo con isquemia-reperfusión; la perfusión duró 24 h. Grupo IV (isquemia-reperfusión + precondicionamiento isquémico remoto + dexmedetomidina, n=7): después de la laparotomía, se aplicaron 3 ciclos de precondicionamiento isquémico (10 min de isquemia y 10 min de perfusión) en el miembro posterior izquierdo y después de 5 min en el grupo III.

Resultados: Las puntuaciones de lesión histopatológica e inmunoreactividad de la caspasa-3 activa fueron significativamente menores en el grupo *Sham* en comparación con los otros grupos. Las puntuaciones de lesión histopatológica de los grupos III y IV fueron significativamente menores que las del grupo II (p=0,03 y p=0,05). La inmunoreactividad de la caspasa-3 fue significativamente menor en el grupo IV que en el grupo II (p=0,01) y no hubo diferencia significativa entre los grupos II y III (p=0,06).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: nilayboztas@hotmail.com (N. Boztas).

Conclusiones: El condicionamiento farmacológico con dexmedetomidina y preconditionamiento isquémico remoto en combinación con dexmedetomidina disminuyen de modo significativo la lesión de isquemia-reperusión renal histomorfológicamente. El uso combinado de los 2 métodos previene la apoptosis vía caspasa-3 activa.

© 2014 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

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

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 ($P=.03$ and $P=.05$). Active caspase-3 immunoreactivity was significantly lower in the group IV than group II ($P=.01$) and there was no significant difference between group II and group III ($P=.06$).

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.

Introducción

La lesión renal aguda isquémica es un síndrome clínico con altas tasas de mortalidad y morbilidad. Debido a la gran demanda de energía y a la compleja red microvascular renal, el riñón es altamente sensible a la lesión de isquemia-reperusión (IR)¹⁻⁴. Los mecanismos de la lesión de IR renal son multifactoriales, incluyendo hipoxia, daños a los radicales libres y respuestas inflamatorias sistémicas⁵. La reperusión isquémica del tejido renal induce condiciones celulares complejas y la muerte de las células renales debido a la apoptosis⁶.

La apoptosis es una forma de muerte celular programada genéticamente. Dos vías principales desempeñan un papel en la apoptosis epitelial. La primera, conocida como la vía extrínseca o de receptor de muerte, está estimulada por moléculas de la familia TNF- α conectada al ligando CD95 (ligando Fas = CD95) a través de signos extracelulares. Esa vía se conecta a la segunda vía, la vía intrínseca o mitocondrial, a través de la activación de la caspasa-3, que incluye el citocromo c y la familia de proteínas Bcl-2, y en su conjunto aumentan la apoptosis⁷.

La apoptosis de células tubulares renales es el resultado de una lesión renal y un importante contribuyente de la fisiopatología de la IR. Tanto la inflamación como la apoptosis coexisten en la lesión de IR renal. Durante la hipoxia, la actividad de la caspasa aumenta como resultado de la acumulación intracelular de Ca^{2+} . La caspasa se hace activa en los tejidos isquémicos y es un indicador de muerte celular⁸. Estas alteraciones, que pueden observarse en células tubulares, pueden causar la pérdida de los bordes en cepillo de las células tubulares proximales y escaparse desde la membrana basal de las células hacia la luz tubular, con la eventual obstrucción del túbulo^{9,10}.

Entre los métodos usados para reducir los efectos de la lesión de IR, el preconditionamiento isquémico remoto (PCIR) y el condicionamiento farmacológico son los que se usan más a menudo¹¹. En la revisión de la literatura en lengua inglesa no encontramos ningún estudio de modelo de IR experimental que investigase los efectos del uso del condicionamiento farmacológico con la dexmedetomidina administrada en combinación con PCIR.

El objetivo de este estudio experimental fue investigar histopatológicamente los efectos renales del PCIR unilateral

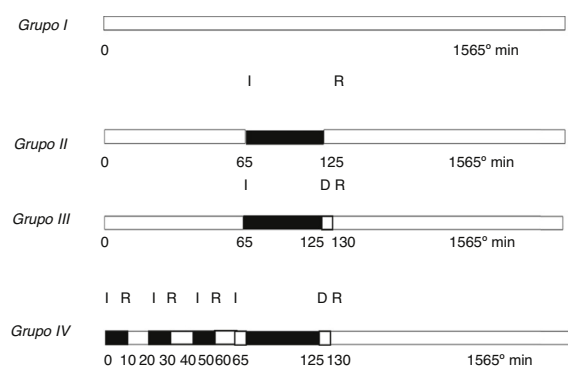


Figura 1 Representación esquemática del protocolo experimental.

D, dexmedetomidina; I, isquemia; R, reperfusión.

administrado en combinación con la dexmedetomidina en la extremidad inferior y evaluar la inmunorreactividad de la caspasa-3 activa en modelo de IR renal en ratones.

Materiales y métodos

En total se utilizaron 28 ratones adultos machos, albinos Wistar, con un peso de 250-300 g. Al comienzo de la investigación los ratones se mantuvieron en temperatura ambiente (21-22 °C) y con una humedad relativa del 40-60% en un ciclo de claro/oscuro (12/12 h) y alimentados con una dieta estándar de pienso y agua *ad libitum*. Después de la aprobación por parte del Comité de Ética en Experimentación Animal de la institución, el estudio fue realizado en el Laboratorio Multidisciplinario de Experimentación Animal. La anestesia se suministró con cetamina (50 mg/kg) y clorhidrato de xilazina (10 mg/kg) y administrada por vía intraperitoneal (IP). Después de la anestesia, los animales fueron divididos en 4 grupos.

- Grupo I (*Sham*, n = 7). Después de la laparotomía, los pedículos renales derecho e izquierdo fueron expuestos en el minuto 65 de la anestesia, y los ratones se mantuvieron bajo anestesia durante 130 min sin ninguna otra intervención.
- Grupo II (IR, n = 7). Después de 60 min de isquemia, el pinzamiento fue retirado y la reperfusión de los riñones se permitió por 24 h.
- Grupo III (IR + dexmedetomidina, n = 7). Después de 60 min de isquemia, el pinzamiento fue retirado y se administraron 100 µg/kg de dexmedetomidina (Precedex 100 µg/2 ml, Abbott Laboratories, IL, EE. UU.) por vía IP, y la reperfusión de los riñones se permitió por 24 h.
- Grupo IV (IR + PCIR + dexmedetomidina, n = 7). Enseguida a la laparotomía, después de 5 min de PCIR y 60 min posteriores de isquemia renal, el pinzamiento fue retirado y se administraron 100 µg/kg de dexmedetomidina (Precedex 100 µg/2 ml, Abbott Laboratories). Finalmente, se realizaron 24 h de reperfusión (fig. 1).

Quedó estipulado que se expondrían los pedículos renales en el grupo I y se iniciaría la isquemia en el minuto 65 de la anestesia en los grupos II y III para sincronizar todos los grupos para el tiempo de preconditionamiento del grupo IV

y estandarizar el inicio de los procedimientos. Las muestras de tejido se obtuvieron después de 24 h de reperfusión.

Para proteger los ratones de la hipotermia, la mesa de operación fue calentada con un calentador de lámpara durante el estudio y la temperatura corporal se midió con una sonda rectal y se mantuvo a 3.737,5 °C. Una solución salina por vía subcutánea a cada hora, una dosificación de 3 ml/kg, fue administrada para prevenir la deshidratación. Durante el tiempo de espera el abdomen se cerró con un tapón de gasa estéril húmeda y con una pinza quirúrgica. En todos los grupos, el riñón izquierdo fue retirado bajo anestesia para análisis histomorfológico, y los ratones fueron sacrificados por sangría de punción cardíaca al término del estudio. Los riñones fueron colocados en formol taponado al 10% y mojados en parafina, cortados en láminas de 4-5 µm y coloreados con hematoxilina y eosina para el estudio histológico con el uso de un microscopio de luz.

Modelo de isquemia-reperfusión renal

Los pedículos renales bilaterales fueron expuestos después de la laparotomía. La isquemia renal total de los pedículos renales bilaterales se mantuvo con pinzamiento microvascular atraumático. La oclusión adecuada fue confirmada por la falta de pulsación en los pedículos renales y por la palidez de los riñones. Después del período isquémico, las pinzas microvasculares fueron retiradas y se inició la reperfusión.

Modelo de preconditionamiento isquémico remoto

Para el efecto del torniquete del PCIR se emplearon un método que mostró ser eficaz por cintilografía de perfusión y un medidor de láser^{12,13}. Para esa finalidad, el miembro posterior izquierdo del ratón fue amarrado con una tira elástica (1 cm de ancho y 30 cm de largo) en la ingle, aplicando presión alrededor. Se realizaron 3 ciclos de 10 min de isquemia, seguidos por 10 min de reperfusión (65 min en total). La interrupción del flujo sanguíneo se confirmó con el uso de un medidor de la corriente del láser (láser Flo BPM2, Vasamedic, EE. UU.).

Evaluación histomorfológica de tejido renal

Las secciones de tejido renal después del IR fueron calculadas por microscopia de luz por dos histólogos «ciegos» para las designaciones de los grupos de animales, que investigaron las alteraciones estructurales de los túbulos proximales (atrofia tubular, pérdida del borde tubular en cepillo, vacuolización, dilatación tubular, formación de cálculo), la infiltración de células mononucleares (CMN), las alteraciones intersticiales estructurales, la morfología del corpúsculo renal y las células en necrosis y apoptosis.

La clasificación de las imágenes transversales se hizo por medio de puntuaciones semicuantitativas en cuanto a lesiones tubulointersticiales de la siguiente forma: 0 = ninguna lesión; 1 = 0-25%; 2 = 26-45%; 3 = 46-75%, y 4 = 76-100%¹⁴.

Métodos de inmunohistoquímica

Los tejidos renales fueron colocados en formol tamponado al 10%, y después de los procedimientos histológicos de rutina

fueron mojados en parafina y seccionados en cortes de 3 μm de espesor con un micrótomo y recolectados en láminas revestidas con poli-L-lisina.

Las muestras fueron almacenadas en un horno a 60 °C durante 12 h. Enseguida, un anticuerpo monoclonal anticaspasa-3 específico para ratones (RB-10287-R7 LabVision) se usó para calcular la inmunoreactividad anticaspasa-3.

La actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada usando una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en alcohol. Las secciones de lisina fueron tratadas con el anticuerpo anticaspasa-3 a 4 °C durante la noche y enseguida incubadas con un anticuerpo secundario biotinilado durante 30 min. Después de la aplicación del *kit* Vector Elite ABC (Vector Laboratories Inc., Burlingame, EE. UU.), el complejo biotina-avidina-peroxidasa para el anticuerpo fue visualizado usando el 0,02% de solución de 3,3'-diaminobenzidina. Después de la contracoloración con hematoxilina de Mayer, se procedió al análisis de la imagen.

La tasa de coloración positiva se calculó usando un indicador de puntuación semicuantitativo (1-4) para la densidad y la distribución.

Criterios de exclusión

Los ratones que necesitaron reanimación fueron excluidos del estudio.

Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos se usó el programa SPSS (versión 15,0; SPSS, Chicago, IL, EE. UU.). El análisis de varianza de Kruskal-Wallis se hizo para analizar los datos. El test *U* de Mann-Whitney fue usado para las comparaciones pareadas de los grupos. Todos los datos se expresaron en media \pm desviación estándar. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados como indicadores de significación estadística.

Resultados

En total, 28 ratones fueron incluidos en el grupo de estudio. Un ratón del grupo IV murió durante el período de reperfusión y quedó excluido del estudio. Las puntuaciones

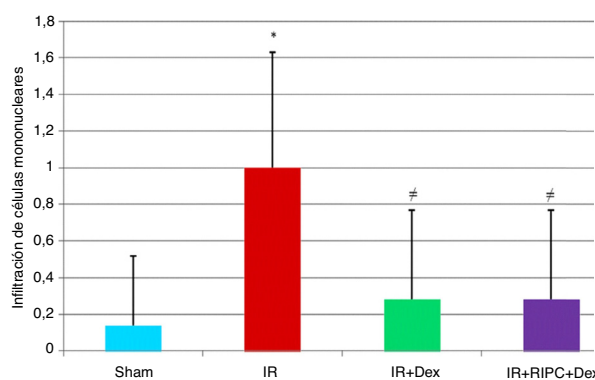


Figura 2 Puntuaciones de infiltración de células mononucleares detectada por examen histomorfológico renal.

*Comparación del grupo IR con el grupo Sham ($p = 0,01$).

Comparación de los grupos IR+Dex e IR+PCIR+Dex con el grupo IV ($p < 0,05$).

histomorfológicas e inmunohistoquímicas de las lesiones de los grupos de estudio aparecen en las [tablas 1 y 2](#).

Puntuaciones histomorfológicas de las lesiones renales

Infiltración de CMN. Las puntuaciones histomorfológicas de las lesiones del grupo Sham fueron significativamente menores que las del grupo IV ($p = 0,01$). Las puntuaciones de las lesiones del grupo IR fueron significativamente mayores que las de los grupos IR+Dex e IR+PCIR+Dex ($p = 0,04$ y $p = 0,04$, respectivamente; [fig. 2](#)).

Alteraciones estructurales de los túbulos proximales. Las puntuaciones histomorfológicas de las lesiones del grupo Sham fueron significativamente menores que las de los grupos IR, IR+Dex e IR+PCIR+Dex ($p < 0,01$, $p = 0,02$ y $p = 0,02$, respectivamente). El grupo IR obtuvo puntuaciones significativamente más elevadas que los grupos IR+Dex e IR+PCIR+Dex ($p = 0,05$ y $p = 0,05$, respectivamente), mientras que no se registró diferencia significativa entre los grupos IR+Dex e IR+PCIR+Dex ($p = 1,00$; [fig. 3](#)).

Alteraciones glomerulares. Las puntuaciones histomorfológicas de las lesiones del Sham fueron significativamente menores que las del grupo IV ($p = 0,04$). El grupo IR

Tabla 1 Resultados histomorfológicos de las lesiones de los 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

AETP, alteraciones estructurales de los túbulos proximales; AG, alteraciones glomerulares; CMN, infiltración de células mononucleares; ETLI, puntuación total de las lesiones histológicas.

Datos expresados como media \pm DE.

^a Test de Kruskal-Wallis.

^b $p < 0,05$; diferencia significativa entre los grupos.

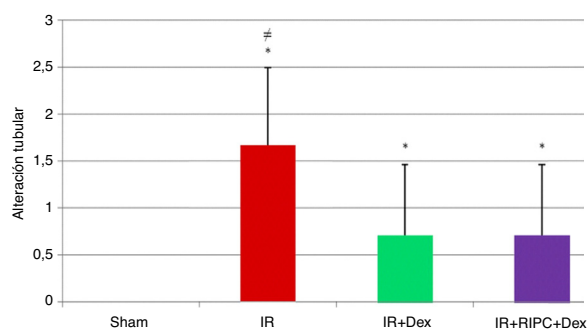


Figura 3 Puntuaciones de alteración de lesión tubular detectada por el examen histomorfológico renal.

*Comparación de los grupos IR, IR + Dex y IR + PCIR + Dex con el grupo Sham ($p < 0,01$).

≠ Comparación del grupo IR con los grupos IR + Dex y IR + PCIR + Dex ($p = 0,05$).

obtuvo puntuaciones significativamente más elevadas que los grupos IR + Dex e IR + PCIR + Dex ($p = 0,04$ y $p = 0,04$, respectivamente), mientras que no se registró diferencia significativa entre los grupos IR + Dex e IR + PCIR + Dex ($p = 1,00$; fig. 4).

Puntuación histopatológica total de las lesiones. La puntuación histomorfológica total de las lesiones del grupo Sham fue significativamente menor que la del grupo IV ($p = 0,003$). La comparación del grupo IR con los grupos IR + Dex e IR + PCIR + Dex mostró puntuaciones significativamente más elevadas que las del grupo IR ($p = 0,03$ y $p = 0,05$, respectivamente), mientras que no se registró diferencia significativa entre los grupos IR + Dex e IR + PCIR + Dex ($p = 0,79$; fig. 5).

Puntuación inmunohistoquímica de las lesiones. Las puntuaciones de la coloración inmunohistoquímica del grupo IR fueron significativamente más elevadas que las del grupo Sham ($p = 0,001$). No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos IR e IR + Dex ($p = 0,06$).

En la comparación de las puntuaciones de las lesiones entre los grupos IR + PCIR + Dex e IR, las del grupo IR + PCIR + Dex fueron significativamente menores ($p = 0,01$). Las puntuaciones de las lesiones de los grupos IR + Dex e IR + PCIR + Dex no fueron diferentes ($p = 0,47$; fig. 6).

Ninguna infiltración celular o pérdida de borde en cepillo se observó en las secciones del grupo Sham (fig. 7A,B). Sin

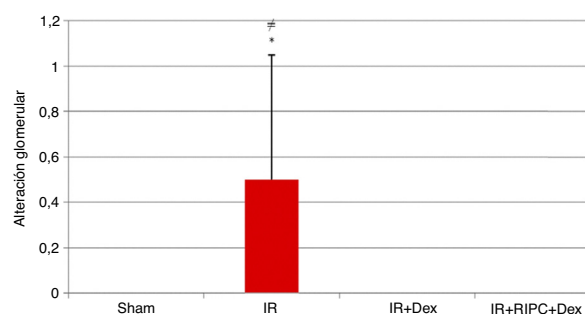


Figura 4 Puntuaciones de alteración de lesión glomerular detectada por histomorfológica renal.

*Comparación del grupo IR con el grupo Sham ($p < 0,01$).

≠ Comparación del grupo IR con los grupos IR + Dex e IR + PCIR + Dex ($p < 0,05$).

Tabla 2 Resultados inmunohistoquímicos de las lesiones de los grupos

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

Datos expresados como media ± DE.

embargo, en el grupo IV observamos una infiltración peritubular de CMN, más prominente en el área cortical, y una pérdida de borde en cepillo de las células del túbulo proximal, atrofia tubular, dilatación tubular y vacuolización. En algunos de los túbulos se observó la acumulación de material proteico, junto con la formación de castas y desechos celulares en la luz de los túbulos (fig. 8A,B).

En el grupo IR + Dex hubo una pérdida del borde en cepillo de las células tubulares, atrofia tubular, dilatación tubular, vacuolización y acumulación de material proteico y desechos celulares en la luz de los túbulos, aunque en menor cantidad que en el grupo IR (fig. 9A,B).

Comparado con el grupo IR, el grupo IR + PCIR + Dex presentó atrofia tubular, dilatación tubular, vacuolización,

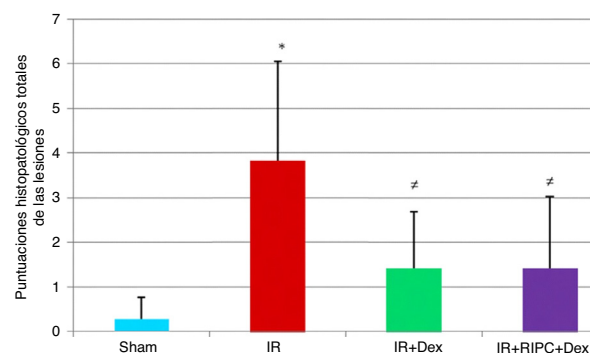


Figura 5 Puntuación histopatológica total de las lesiones detectadas por histomorfológica renal.

*Comparación del grupo IR con el grupo Sham ($p < 0,01$).

≠ Comparación del grupo IR con los grupos IR + Dex y IR + PCIR + Dex ($p < 0,05$).

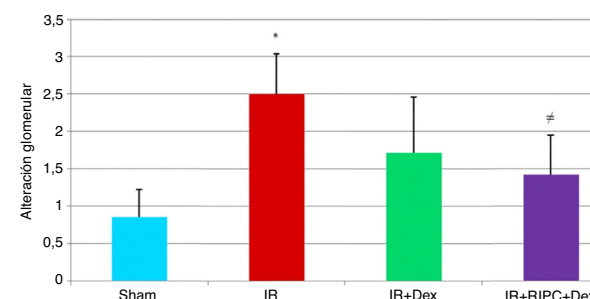


Figura 6 Puntuación de la inmunohistoquímica renal.

*Comparación del grupo IR con el grupo Sham ($p < 0,01$).

≠ Comparación del grupo IR con los grupos IR + Dex y IR + PCIR + Dex ($p = 0,01$).

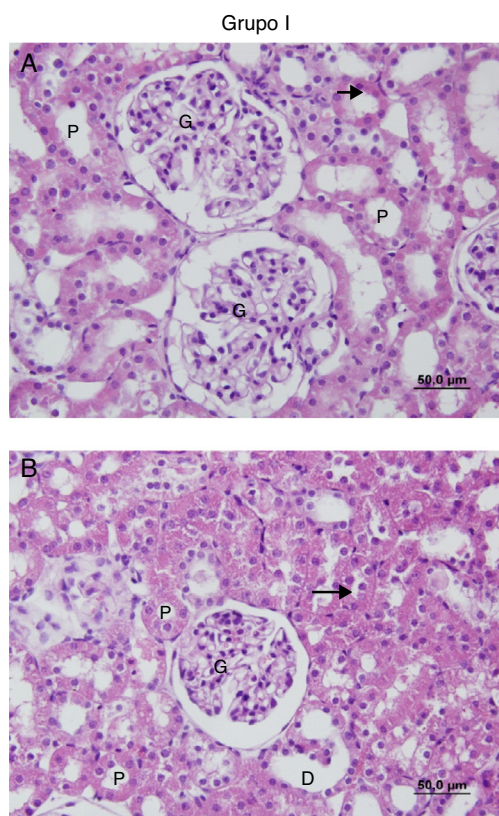


Figura 7 Secciones (A y B) del grupo *Sham*. D, túbulo distal, borde en cepillo; G, glomerular; P, túbulo proximal.

acumulación de material proteico y desechos celulares en la luz de los túbulos, como también pérdida del borde en cepillo de las células tubulares, aunque en menor cantidad. Sin embargo, en comparación con el grupo IR + Dex, las alteraciones tubulares fueron menos acentuadas (fig. 10A,B).

La intensidad de la coloración inmunohistoquímica fue mayor en las células positivas para caspasa-3 activa en el grupo IR en comparación con el grupo *Sham*, mientras que fue menor en las células de los grupos IR + Dex e IR + PCIR + Dex comparados con el grupo IR. La intensidad de la coloración de las células positivas para caspasa-3 activa del grupo IR + PCIR + Dex fue menor en comparación con el grupo IR + Dex (fig. 11).

Discusión

La insuficiencia renal aguda que se da como resultado de la isquemia puede estar siendo causada por la hipotensión, por la hipovolemia y por la hipoperfusión secundaria a la deshidratación, como también la lesión de IR en cirugías mayores, como las cardiotorácicas, vasculares y trasplantes¹⁵⁻¹⁸. La lesión de IR es una de las causas más comunes de insuficiencia renal aguda en el perioperatorio¹⁸.

Métodos como el PCIR y el condicionamiento farmacológico con dexmedetomidina, que son usados para prevenir o tratar lesiones de IR renal, han mostrado efectos positivos en la lesión de IR en muchos estudios anteriores¹¹.

En una investigación en la literatura no encontramos ningún estudio que calculase los efectos de la combinación de

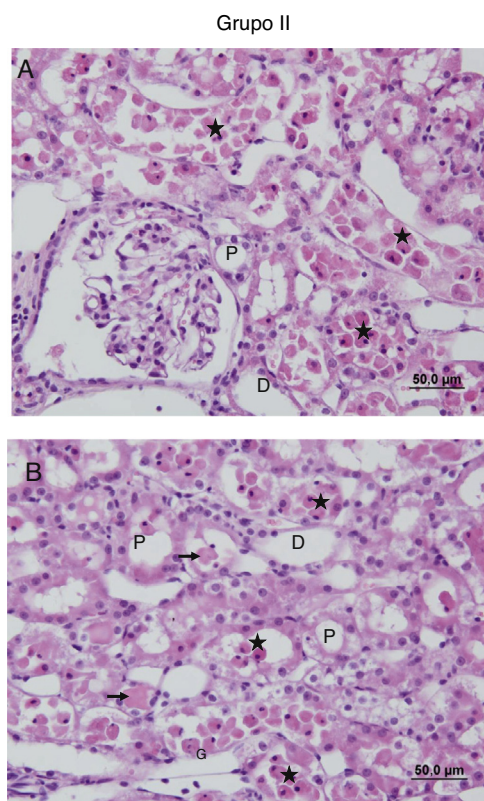


Figura 8 Secciones (A y B) del grupo IR. D, túbulo distal; (→) acumulación de material proteico en los túbulos; (★) vertido para dentro de la luz de células epiteliales tubulares; L, glomerular; P, túbulo proximal.

esos 2 métodos en lesión de IR. Este estudio experimental, usando un modelo de ratón de IR renal, comparó los efectos del uso de dexmedetomidina pura o PCIR en combinación con la dexmedetomidina contra la apoptosis renal, evaluando por medio de la inmunoreactividad de la caspasa-3 y puntuaciones histopatológicas de las lesiones.

De acuerdo con nuestros resultados, el uso de la dexmedetomidina pura o en combinación con PCIR redujo significativamente la infiltración de CMN, las alteraciones glomerulotubulares y la puntuación total de lesiones de IR. En ambos grupos, todas las puntuaciones, con excepción de las alteraciones tubulares ($p=0,05$), fueron parecidas a las puntuaciones del grupo *Sham*. Hubo una reducción significativa de la inmunoreactividad de la caspasa-3 en el grupo dexmedetomidina en combinación con PCIR, lo que sugiere que la apoptosis, la principal vía de lesión IR, puede ser reducida o prevenida con el uso de esa combinación.

Varios períodos de isquemia y reperfusión fueron usados en modelos de lesión de IR renal en muchos estudios¹⁹⁻²². El período isquémico crítico depende del órgano, y de la isquemia con duración superior a 5 min para el cerebro y a 15-20 min para el hígado y el riñón, que puede causar muerte neuronal e infarto²³. Williams et al.²⁰ investigaron los efectos de la lesión de IR en muestras de sangre y tejidos obtenidos posreperfusión después de 45 min de isquemia renal, relatando que la lesión de IR renal se dio más tempranamente en la cuarta hora y alcanzó el pico en la vigésima cuarta hora.

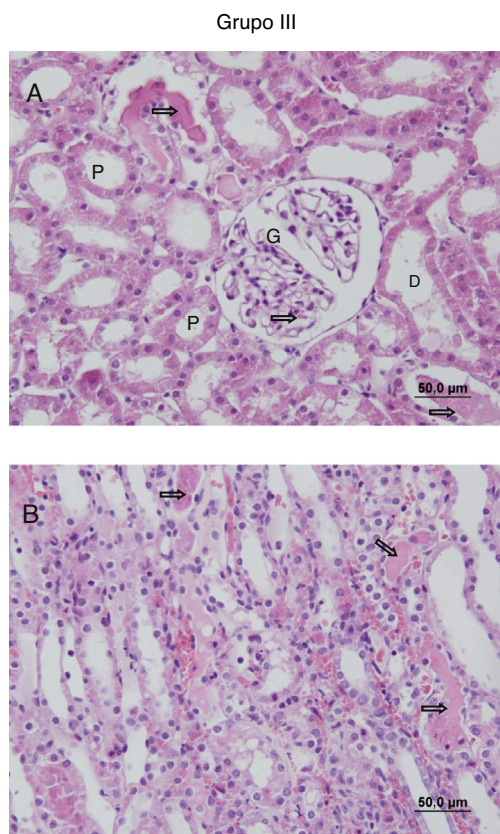


Figura 9 Secciones (A y B) del grupo IR + Dex. D, túbulo distal; (⇒) acumulación de material proteico que será reducido en comparación con los otros grupos; G, glomerular; P, túbulo proximal.

Los efectos protectores de los órganos de la dexmedetomidina contra la lesión de IR fueron demostrados en varios tejidos, como el cerebro, el corazón y los riñones²⁴⁻²⁷. Los efectos de la dexmedetomidina en la lesión de IR renal

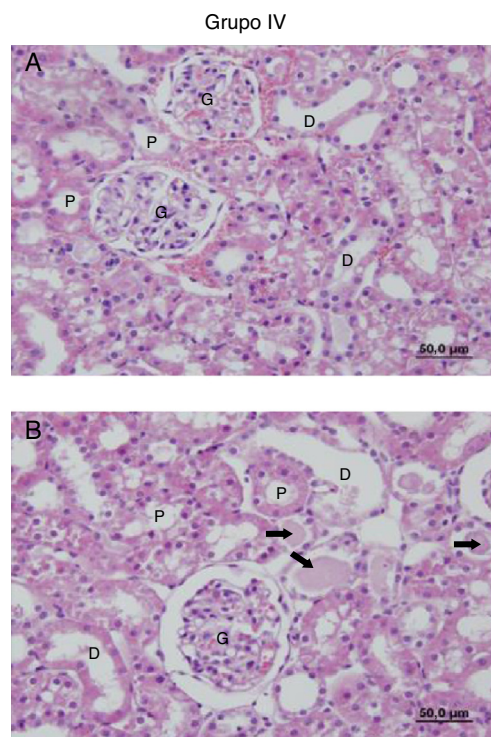


Figura 10 Secciones (A y B) del grupo IR + PCIR + Dex. D, túbulo distal; (⇐) acumulación de material proteico que será reducido en comparación con los otros grupos; G, glomerular; P, túbulo proximal.

en ratones fueron investigados por Kocoğlu et al.¹⁹. Esos investigadores relataron una disminución significativa en las puntuaciones histopatológicas de lesión, detectadas en el minuto 45 después de la administración IP de 100 μg/kg de dexmedetomidina al inicio de la reperusión. En nuestro estudio, con la misma dosis de dexmedetomidina administrada al inicio de la reperusión se obtuvo un efecto

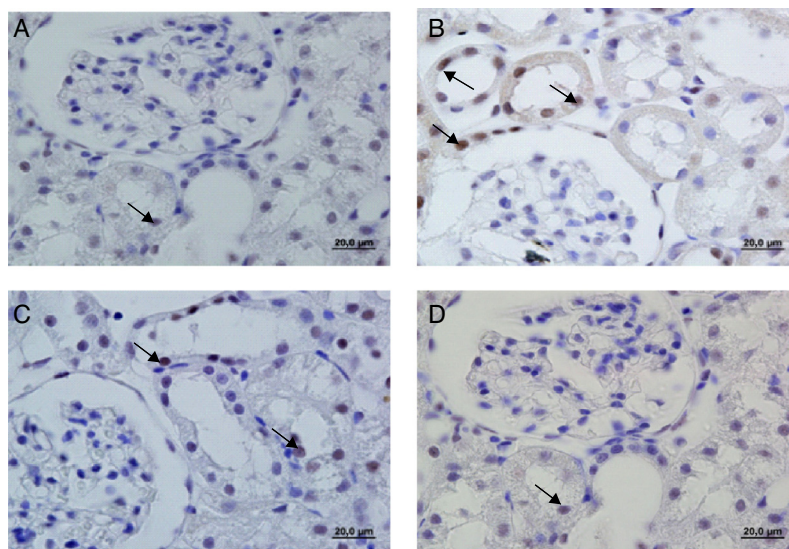


Figura 11 Imágenes seccionales coloradas de la caspasa-3 en la inmunohistoquímica de los grupos experimentales Sham (A), IR (B), IR + Dex (C) y IR + PCIR + Dex (D). ⇐: la inmunocoloración de la caspasa-3 activa indica células epiteliales positivas en el túbulo proximal. (C y D) Secciones de inmunocoloración de la caspasa-3 activa positiva observada en las células epiteliales del túbulo proximal, disminuida en el grupo B.

renoprotector evidenciado por reducciones significativas de las puntuaciones histológicas de las lesiones. Ese efecto renoprotector se halló no solo durante el período inicial después de la lesión de reperusión, sino que permaneció hasta la vigésima cuarta hora, que fue considerada el pico de la lesión de IR²⁰.

Aunque el mecanismo subyacente al efecto protector de la dexmedetomidina en IR renal no sea claro, se considera que la dexmedetomidina aumenta el flujo sanguíneo renal y la filtración glomerular, reduciendo así la liberación de noradrenalina²⁸.

Villela et al.²⁹ relataron que la administración de dexmedetomidina a bajas dosis en perros anestesiados redujo la osmolaridad urinaria y el nivel plasmático de vasopresina y causó la diuresis de agua libre. En pacientes que no tenían enfermedad renal pero que fueron sometidos a la cirugía torácica, al administrar una infusión de dexmedetomidina Frumento et al.³⁰ relataron una mejoría de la función renal, inclusive del flujo urinario y de la filtración glomerular en el período postoperatorio.

Uno de los mecanismos más probables de la acción de la dexmedetomidina es proteger el riñón al inhibir la respuesta al estrés quirúrgico y prevenir la vasoconstricción mediada por el sistema adrenérgico³¹⁻³⁴. Ese mecanismo de acción también puede aumentar la vasodilatación arterial renal a través de efectos vasculares directos¹⁹. Existe una comunicación de que PKC desempeña un papel importante en el preconditionamiento isquémico y abre los canales de K⁺ dependientes de ATP mitocondrial y sarcolemático al estimular las vías de transducción intracelular, induciendo a la síntesis de proteínas celulares protectoras. En un estudio de las vías alternativas de transducción de signos, los agonistas del receptor alfa-2B han demostrado estimular la actividad de PKC y la producción de trifosfato de inositol en células de túbulos colectores renales distales, lo que sugiere que los agonistas alfa-2 imitan la protección celular mimica por PCI^{35,36}. Gu et al.¹⁸ investigaron el mecanismo de acción de la dexmedetomidina *in vitro* con el cultivo de células humanas estabilizadas del túbulo proximal renal, privadas de oxígeno y glucosa. Los investigadores relataron tanto un aumento significativo de la expresión de fosfo-Akt en un cultivo de células tubulares después del tratamiento con dexmedetomidina, dependiente de la dosis, como un efecto del adrenorreceptor alfa-2. La vía fosfo-Akt garantiza la viabilidad celular al inhibir las vías de apoptosis intrínsecas controladas por caspasa a través de la fosforilación de la Bcl-2 pro-apoptótica, lo que desencadena la muerte celular y el aumento de las expresiones de Bcl-2 y Bcl-XL antiapoptóticas.

El efecto neuroprotector de la dexmedetomidina fue relatado como siendo el resultado de un aumento de las expresiones de Bcl-2 y Mdm-2 antiapoptóticas; ese aumento ha sido asociado a una reducción de los niveles de caspasa-3 y Bax³⁷ proapoptóticas. La vía Akt es esencial para la recuperación de IR renal. En este estudio, como un indicador de apoptosis, se calculó la inmunoreactividad de la caspasa-3. La activación de la caspasa-3 es el paso final de la apoptosis, que es común a las 2 principales vías de apoptosis y un indicador definitivo de muerte celular. La administración de dexmedetomidina mostró disminuir la inmunoreactividad de la caspasa-3 activa, pero no de modo significativo ($p = 0,06$) en comparación con la lesión de IR.

Esa diferencia estadísticamente no significativa puede ser explicada por el pequeño número de sujetos del estudio. El preconditionamiento isquémico es un método aplicado mecánica o farmacológicamente antes de la isquemia del órgano objeto para reducir el nivel posterior de la lesión de IR. El objetivo del preconditionamiento isquémico es aplicar la isquemia y la reperusión de órganos objeto en cortos intervalos de tiempo, para garantizar que el(los) órgano(s) objeto(s) pueda(n) tolerar bien la isquemia. La gran demanda de energía y la intensa red microvascular de los riñones los hacen vulnerables a la lesión de IR, que es considerada una de las principales causas de lesión renal en la estenosis de arteria renal y cirugía microvascular renal. La lesión de IR renal es la principal causa de morbilidad cardiovascular y está asociada con el atraso de la función del injerto postrasplante y con la aparición de lesión renal en cirugía cardíaca y aórtica y también con la lesión renal poschoque^{1-4,38,39}.

Estudios tanto experimentales como clínicos en la literatura muestran que el PCI de órgano distante puede proteger el riñón^{40,41}. Similarmente a nuestro estudio, Wever et al.⁴⁰ investigaron el efecto del preconditionamiento isquémico derecho (PCID) en la extremidad posterior en la lesión de IR renal. En contraste, esos autores compararon el efecto de la administración de PCID, continuamente o periódicamente, y también en una o 2 extremidades. Aunque hayan realizado 3 ciclos de PCID, los investigadores usaron períodos I/R de 4/4 min e investigaron los eventuales efectos en el minuto 25 de isquemia. Los autores relataron que la expresión de la molécula-1, indicando lesión renal y tubular renal, disminuyó significativamente en el grupo con 3 ciclos de I/R. Además, esa protección no se asoció a la adenosina, uno de los elementos-clave en la lesión de IR. El mecanismo subyacente del PCID y sus vías de transducción todavía no han sido completamente elucidados. Ambas vías de origen neural y transmisores bioquímicos pueden desempeñar un papel en el mecanismo del PCID⁴². Esos mecanismos pueden variar, dependiendo del órgano objeto y del protocolo de preconditionamiento aplicado. En los métodos de isquemia miocárdica que usaron PCID renal, la expresión de la proteína NF- κ B seguida por la abertura de los canales de K⁺/ATP fue considerada importante⁴³.

Aunque la lesión de IR renal sea un problema clínico común e importante, las estrategias para reducir la lesión de IR son insuficientes y se requieren nuevos tratamientos. En la literatura no existen informes sobre la protección farmacológica y mecánica en la lesión de IR renal en ratones.

Así, 2 métodos diferentes fueron usados en las lesiones de IR renal en ratones: la dexmedetomidina, ampliamente relatada como eficaz, y el PCID, que demostró ser eficaz en algunos estudios¹¹, fueron combinados y comparados. De forma similar a la dexmedetomidina, el uso combinado de dexmedetomidina y PCID impidió la lesión histopatológica y mejoró las puntuaciones de la lesión de IR, excepto en las puntuaciones de alteraciones tubulares, para niveles próximos al grupo *Sham*. Al mismo tiempo, la disminución significativa de la inmunoreactividad de la caspasa-3, en comparación con el grupo IR, sugiere que el uso combinado de dexmedetomidina y PCID puede prevenir la apoptosis. El uso de dexmedetomidina pura disminuyó la inmunoreactividad de la caspasa-3 activa, aunque no de modo significativo, lo que nos indica que esos 2 métodos trabajan por medio de

vías similares. Esos 2 métodos de protección pueden aumentar el efecto uno del otro.

En nuestro estudio, usamos xilazina, un agente anestésico con actividad alfa-2-agonista, y la cetamina⁴², que sugirieron tener efectos negativos sobre la lesión de IR. Las puntuaciones histopatológicas y la inmunoreactividad de la caspasa-3 activa fueron normales en el grupo *Sham*, indicando que la cetamina no tuvo un efecto negativo sobre nuestros resultados.

Nosotros no mostramos el efecto aislado del PCID en la apoptosis, que desempeña un papel fundamental en el mecanismo de la lesión de IR, lo que constituye una limitación del presente estudio. Otros factores limitantes fueron la no evaluación del estrés oxidativo y de los mediadores inflamatorios, que también son los responsables de la lesión IR y de la vía neurogénica.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

Bibliografía

- Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, et al. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation*. 1997;63:968–74.
- Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, et al. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet*. 2004;364:1814–27.
- 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.
- 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.
- Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology*. 2001;94:1133–8.
- Tsutsui H, Sugiura T, Hayashi K, et al. Moxonidine prevents ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *Eur J Pharmacol*. 2009;603:73–8.
- 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.
- Faubel S, Edelstein CL. Caspases as drug targets in ischemic organ injury. *Immune Endocr Metabol Disord*. 2005;5:269–87.
- Noiri E, Gailit J, Sheth D, et al. Cyclic RGD peptides ameliorate ischemic acute renal failure in rats. *Kidney Int*. 1994;46:1050–8.
- Friedewald JJ, Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney Int*. 2004;66:486–91.
- 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.
- 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.
- 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 ischaemia and reperfusion: a pilot study. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2005;49:1142–8.
- Feng L, Xiong Y, Cheng F, et al. Effect of ligustrazine on ischemia-reperfusion injury in murine kidney. *Transplant Proc*. 2004;36:1949–51.
- Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *N Engl J Med*. 1996;334:1448–60.
- Brezis M, Rosen S, Silva P, et al. Renal ischemia: a new perspective. *Kidney Int*. 1984;26:375–83.
- 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.
- Gu J, Pamela S, Hailin Z, et al. Dexmedetomidine provides renoprotection against ischemia-reperfusion injury in mice. *Crit Care*. 2011;15:R153.
- Kocoğlu 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.
- Williams P, Lopez H, Britt D, et al. Characterization of renal ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1997;37:1–7.
- 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.
- Hussein Ael-A, Shkeir AA, Sarhan ME, et al. Effects of combined erythropoietin and epidermal growth factor on renal ischaemia/reperfusion injury: a randomized experimental controlled study. *BJU Int*. 2011;107:323–8.
- Jaeschke H, Farhood A. Kupffer cell activation after no-flow ischemia versus hemorrhagic shock. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:210–9.
- Sanders RD, Maze M. Alpha 2-adrenoceptor agonists. *Curr Opin Investig Drugs*. 2007;8:25–33.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Helbo-Hansen S, Fletcher R, Lundberg D, et al. Clonidine and the sympathetic-adrenal response to coronary artery by-pass surgery. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1986;30:235–42.
- 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.
- 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.
- Gesek FA. Alpha2-adrenergic receptors activate phospholipase C in renal epithelial cells. *Mol Pharmacol*. 1996;50:407–14.
- O'Rourke B. Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection. *Circ Res*. 2004;94:420–32.
- 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.
- Safian RD, Textor SC. Renal-artery stenosis. *N Engl J Med*. 2001;344:431–42.
- Schrier RW, Wang W. Acute renal failure and sepsis. *N Engl J Med*. 2004;351:159–69.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.