

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:
CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

**Análise dos Efeitos da Hipotermia Tópica do Rim Sobre
o Tecido Pulmonar Durante Isquemia e Reperusão
Renal em Ratos**

Marlon Roberto Fiorentini
Orientador: Professor Doutor Carlos Otávio Corso
Coorientador: Professor Doutor Walter José Koff

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:
CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

**Análise dos Efeitos da Hipotermia Tópica do Rim Sobre
o Tecido Pulmonar Durante Isquemia e Reperusão
Renal em Ratos**

Marlon Roberto Fiorentini
Orientador: Professor Doutor Carlos Otávio Corso
Coorientador: Professor Doutor Walter José Koff

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina:
Ciências Cirúrgicas como pré-requisito para obtenção do título de
Mestre em Medicina: Ciências Cirúrgicas

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre
2014

CIP - Catalogação na Publicação

Marlon Roberto , Fiorentini
Análise dos Efeitos da Hipotermia Tópica do Rim
Sobre o Tecido Pulmonar Durante Isquemia e
Reperusão Renal em Ratos / Fiorentini Marlon
Roberto . -- 2015.
115 f.

Orientador: Carlos Otávio Corso.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas,
Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Hipotermia tópica. 2. Isquemia e Reperusão. 3.
Rim. 4. Pulmão. I. Corso, Carlos Otávio, orient. II.
Título. |

A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus queridos pais, Edio e Eloir, de quem sempre tive incondicional apoio. Agradeço ao meu pai por ter me ensinado o valor da retidão e do caráter, sendo um pai maravilhoso e meu maior exemplo. À minha mãe, pelo amor e ternura que sempre dedicou aos seus filhos.

Também a dedico à minha amada esposa Estelem, por toda compreensão, apoio e companheirismo. À agradeço, em especial, por não me deixar desacreditar em momento algum de meus sonhos.

Ao meu irmão, cunhadas e sobrinhos, por terem me estimulado na incessante busca pelo conhecimento. Aos meus sogros, por terem me acolhido como um filho, e pelo apoio e incentivo à realização deste trabalho.

Ao professor Carlos Otávio Corso, pela confiança depositada em mim e neste projeto, tornando possível a sua realização.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que colaboraram de alguma forma para a execução deste trabalho. Uma dissertação de mestrado é fruto da contribuição e incentivo de muitas pessoas. A cada uma delas dirijo os meus mais sinceros agradecimentos.

Agradeço inicialmente ao meu orientador, professor Carlos Otávio Corso, por ter me aceitado como seu orientando. O professor Corso me acolheu desde o início deste projeto e depositou em mim a confiança necessária para a execução deste trabalho. Agradeço pela disponibilidade, iluminação e pelas claras orientações.

Agradeço ao professor Walter José Koff, meu coorientador. O professor Koff é um grande médico e mestre. Agradeço a ele por ter compartilhado seu profundo conhecimento dentro da Urologia e por ter também acreditado neste trabalho.

Ao Dr Emanuel Burck dos Santos, um médico, urologista e cientista de muita competência, devo muita gratidão. O Dr Emanuel é, senão o principal, um dos principais responsáveis por este trabalho, pois foi o mentor e idealizador deste modelo experimental. A ele devo todo meu reconhecimento e admiração. Sinto-me grato e profundamente honrado por ter confiado a mim a responsabilidade pela continuidade de sua pesquisa em hipotermia tópica na atenuação de danos decorrentes de isquemia e reperfusão renal.

Ao Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre devo meus mais sinceros agradecimentos. Tive grandes mestres, entre os quais posso citar o Dr Milton Berger, Dr Brasil Silva Neto, Dr Bernardo Moreira, Dr Cláudio Martins Lima, Dr Renato Scaletski, Dra Nancy Tamara Denicol, Dr Leonardo Infantini Dini, Dr Protásio Martins Costa Alves, Dr Tiago Elias Rosito. Cada um deles soube transmitir o seu melhor com excelência e seus ensinamentos me guiam na busca do constante aperfeiçoamento.

Ao professor Dr José Carlos Soares Fraga, meu sincero agradecimento. O Dr Fraga foi um dos maiores responsáveis por eu ter escolhido ser cirurgião. Ele é um exemplo de caráter, de competência e de respeito. Habilidade cirurgião e exemplo de profissional em que procuro me espelhar.

Também devo gratidão aos meus colegas de Residência Médica, Dr Marcelo de Azevedo Quintanilha e Dr Rodrigo Latosinski do Amaral, colegas e amigos formidáveis com quem tive o prazer de conviver. Sem o apoio deles, com certeza, a tarefa de tornar-me urologista teria sido bem mais árdua. O Dr Rodrigo é um urologista de muita competência e de exímia habilidade cirúrgica, um grande amigo que a Urologia me apresentou. A ele devo todo meu respeito e profunda admiração.

Aos meus colegas e amigos, os urologistas Dr João Pedro Bueno Telles e Dr Ary de Quadros Marques Filho, também quero prestar especial agradecimento. O Dr João é habilidoso cirurgião, de inteligência ímpar, e fez grande esforço para que eu pudesse ausentar-me em muitos momentos de minha função como urologista em Novo Hamburgo e realizar as atividades relativas ao mestrado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O Dr Ary é também exímio

urologista e exemplo de superação, sempre em busca do aperfeiçoamento e do refinamento técnico, tendo prestado importante auxílio na revisão ortográfica do artigo na língua inglesa.

Um especial agradecimento dedico à biomédica do Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia experimental, Larisse Longo. A Larisse foi a responsável pelas análises bioquímicas apresentadas neste trabalho. Sua ajuda, seu conhecimento e seu apoio foram absolutamente decisivos para que este trabalho fosse realizado. A Larisse está com seu mestrado em andamento e já é uma biomédica brilhante e tenho certeza de que terá um futuro muito promissor também como pesquisadora.

Agradeço ao Serviço de Patologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por ter viabilizado as análises histológicas deste trabalho. Um especial agradecimento dedico à professora Lúcia Kliemann, que acreditou em mim e neste trabalho. A professora Lúcia foi de suma importância para a definição da maneira mais adequada de avaliar os danos no parênquima pulmonar a fim de atingir os objetivos propostos pelo trabalho.

Meu agradecimento também direciono ao Centro de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, onde foram realizados os experimentos aqui descritos. Em especial agradeço à presteza e eficiência do trabalho desempenhado pela enfermeira Marta Justina Giotti Cioato e pela médica veterinária Fabíola Schons Meyer.

Minha gratidão ao Programa de Pós-Graduação (PPG) em Cirurgia da UFRGS, que foi o programa pelo qual foi aceita e realizada esta dissertação. Agradeço em especial aos secretários Estela Maris Araripe e Dienes de Azeredo Bastos.

Termino por agradecer à Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, renomadas instituições públicas e de inquestionável qualidade, através das quais pude efetuar a graduação em Medicina e a Residência Médica em Cirurgia Geral e posteriormente em Urologia.

Certamente muitos outros nomes foram essenciais em minha formação e na realização desta dissertação. Perdoem-me não citá-los, mas gostaria que soubessem que sou grato a cada um deles.

LISTA DE ABREVIATURAS

- I/R: isquemia e reperfusão
- NO: óxido nítrico
- C5a: componente do complemento 5a
- CD18: família das moléculas de adesão β 2-integrinas
- CD11a, b,c: membros da família das β 2-integrinas (CD18)
- ICAM: molécula de adesão intercelular
- ICAM-1: molécula de adesão intercelular tipo 1
- VCAM: molécula de adesão celular vascular
- ATP: trifosfato de adenosina
- ADP: difosfato de adenosina
- Na^+/K^+ ATPase: trifosfatase de adenosina sódio-potássio (bomba de sódio-potássio)
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- TNF- α : fator de necrose tumoral alfa
- IL-1: interleucina 1
- IL-1 β : interleucina 1 beta
- IL-6: interleucina 6
- IL-10: interleucina 10
- IL-12: interleucina 12
- IL-17A: interleucina 17A
- IL-18: interleucina 18
- IFN- γ : interferon gama
- Na^+ : sódio
- ENac: canal epitelial de sódio
- CD14: *cluster of differentiation 14*
- CXCL-2: *chemokine (C-X-C motif) ligand 2*
- KC: quimiocina derivada de queratinócitos
- GM-CSF: fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
- G-CSF: fator estimulante de colônias de granulócitos
- TNFR1: receptor de TNF tipo 1
- TNFR2: receptor de TNF tipo 2
- CD 95: *cluster of differentiation 95*; sinônimo do receptor Fas
- TGF- β : fator de transformação do crescimento beta
- GFAP: proteína glial fibrilar ácida
- VE: ventrículo esquerdo
- MPO: mieloperoxidase
- NK: células *natural killer*
- NKT: células T *natural killer*
- H&E: hematoxilina-eosina
- NaCl 0,9%: cloreto de sódio a 0,9% ou soro fisiológico
- SPSS: *software Statistical Package for the Social Sciences*
- HTR: hipotermia tópica renal

- MCP-1: proteína quimiotática de monócitos tipo 1
- ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
- DRA: dano renal agudo
- NF- κ B: fator nuclear κ B
- α -MSH: hormônio estimulador alfa-melanocítico

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	5
AGRADECIMENTOS	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DA LITERATURA	14
LISTA DE TABELAS DOS ANEXOS.....	15
<i>RESUMO E ABSTRACT</i>	17
Resumo	18
<i>Abstract</i>	20
INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	22
Introdução.....	23
Revisão da Literatura.....	24
I - Isquemia e Reperusão	24
II - Alterações no Rim Decorrentes de Isquemia e Reperusão Renal	26
III - Lesão de Órgãos a Distância Decorrentes de Isquemia e Reperusão	28
IV - Hipotermia na Redução de Danos Decorrentes de Isquemia e Reperusão.....	35
V - Modelos Animais	37
VI - Marcadores de Reação Inflamatória e de Dano Tecidual.....	38
VII - Técnica Cirúrgica.....	98

	13
REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA	40
OBJETIVOS	46
ARTIGO EM INGLÊS (<i>PAPER</i>).....	48
LIST OF FIGURES OF THE PAPER	67
ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	72
LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO	90
ANEXOS	96

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DA LITERATURA

FIGURA 1: Desenho esquemático ilustrando as etapas envolvidas na diapedese de leucócitos até o sítio inflamatório. CD11a/11b/11c representam as cadeias das $\beta 2$ integrinas (CD18) leucocitárias; ICAM= molécula de adesão intercelular; VCAM= molécula de adesão celular vascular. Modificado e adaptado de Prado RA et al., 2002. (PÁGINA 24)

FIGURA 2: Efeitos deletérios em órgãos remotos decorrentes de isquemia e reperfusão renal. GFAP= proteína glial fibrilar ácida; IL= Interleucina; TNF- α = fator de necrose tumoral alfa; VE= ventrículo esquerdo; ICAM-1= molécula de adesão intercelular-1. Figura traduzida e adaptada de Yap SC et al., 2012. (PÁGINA 33)

LISTA DE FIGURAS E TABELAS DOS ANEXOS

FIGURA 1: rato submetido a laparotomia com abordagem do rim esquerdo para realização do experimento. 1= termômetro intraparenquimatoso; 2= rim esquerdo; 3= clamp vascular atraumático tipo *bulldog*; 4= dispositivo para isolamento térmico constituído de látex e estireno; 5= sistema para irrigação contínua de soro fisiológico na temperatura desejada e aspiração constante do mesmo; 6= afastadores cirúrgicos; 7= termômetro retal para monitorização da temperatura sistêmica. (PÁGINA 102)

FIGURA 2: termômetro BAT-12 mostrando a temperatura alvo do córtex renal de animal submetido a hipotermia tópica intensa (4°C) durante o período de isquemia renal. (PÁGINA 103)

TABELA 1. Análise estatística dos níveis de atividade de mieloperoxidase no tecido pulmonar. (PÁGINA 103)

TABELA 2. Tabela das análises realizadas para aferição do nível de atividade de mieloperoxidase no tecido pulmonar. Os resultados da tabela são expressos em U/mg de tecido. No artigo, expressamos os resultados em U/ μ g de tecido a fim de trabalharmos com números inteiros. (PÁGINA 104)

TABELA 3. Análise estatística dos níveis de TNF- α no tecido pulmonar. (PÁGINA 105)

TABELA 4. Correlação entre o nível de temperatura tópica renal e a concentração pulmonar de TNF- α . (PÁGINA 106)

TABELA 5. Tabela das análises realizadas para aferição da concentração de TNF- α no tecido pulmonar através da técnica de ELISA. (PÁGINA 107)

TABELA 6. Análise estatística dos níveis de IL-1 β no tecido pulmonar. (PÁGINA 108)

TABELA 7. Tabela das análises realizadas para aferição da concentração de IL-1 β no tecido pulmonar através da técnica de ELISA. (PÁGINA 109)

TABELA 8. Correlação entre o nível de temperatura tópica renal e a concentração pulmonar de IL-1 β . (PÁGINA 110)

TABELA 9. Análise estatística das áreas comprometidas por alterações hemorrágicas no tecido pulmonar. (PÁGINA 111)

TABELA 10. Análise individual das áreas pulmonares comprometidas por alterações hemorrágicas através do software Image Pro Plus. Para cada animal foram analisadas 6 fotos (3 fotos de áreas do parênquima expandido ou aerado; 3 fotos de áreas do parênquima não expandido ou sólido). Os resultados descritos na tabela abaixo expressam o somatório de áreas marcadas para alterações hemorrágicas em áreas sólidas e aeradas. Para a análise estatística foi comparado entre os grupos o percentual de áreas marcadas (áreas hemorrágicas) em relação à área total avaliada. (PÁGINA 112)

RESUMO E ABSTRACT

Resumo

Análise dos Efeitos da Hipotermia Tópica do Rim Sobre o Tecido Pulmonar Durante Isquemia e Reperfusão Renal em Ratos

Introdução: Estudos em animais têm demonstrado que a isquemia e reperfusão (I/R) do rim acarreta danos não apenas ao tecido renal mas também ao parênquima pulmonar. Dados recentes puderam constatar que a hipotermia tópica hepática e também mesentérica atenua danos pulmonares em modelos de I/R destes órgãos. Entretanto, nenhum estudo até o momento avaliou o efeito da hipotermia tópica renal (HTR) na atenuação de danos pulmonares decorrentes do processo de I/R do rim.

Objetivo: Avaliar se a HTR em diferentes níveis de temperatura acarreta efeitos protetores sobre o parênquima pulmonar após I/R renal através da análise de marcadores inflamatórios e cortes histológicos do tecido pulmonar.

Métodos: Ratos Wistar (n=28) do sexo masculino foram randomizados em 4 grupos definidos de acordo com a temperatura tópica renal durante a isquemia renal: normotermia (sem resfriamento), hipotermia leve (26°C), moderada (15°C) e intensa (4°C). Apenas o rim esquerdo de cada animal foi submetido a clampeamento hilar com duração de 40 minutos seguido de reperfusão durante 240 minutos. Após este período, foi realizado novo procedimento para remoção dos tecidos de interesse. Foi realizada aferição das concentrações de TNF- α ,

IL-1 β e grau de atividade de mieloperoxidase no tecido pulmonar. Avaliação histopatológica foi realizada utilizando cortes de tecido pulmonar submetidos à coloração pela hematoxilina-eosina (H&E).

Resultados: A I/R renal sob hipotermia tópica intensa acarretou concentrações de TNF- α no tecido pulmonar significativamente menores comparativamente ao grupo submetido a I/R normotérmica ($p < 0,05$). Uma correlação de significância limítrofe foi observada entre o nível pulmonar de IL-1 β e a intensidade da hipotermia tópica (Spearman $r = -0,37$; $p = 0,055$). Em relação ao grau de atividade de mieloperoxidase e aos danos teciduais à avaliação histológica, não foi observada diferença significativa entre os grupos.

Conclusão: os resultados sugerem que a aplicação de HTR durante a I/R do rim reduz a ativação da cascata inflamatória no tecido pulmonar. Entretanto, não foi observada proteção à avaliação histológica.

Abstract

Analysis of the Effects of Topical Kidney Hypothermia on Lung Tissue after Kidney Ischemia and Reperfusion in Rats

Background: Animal studies have demonstrated that kidney ischemia and reperfusion (I/R) cause not only renal injury but also determine damage to the lungs. Recent data have shown that topical hepatic and mesenteric hypothermia attenuates lung injury after I/R. However, there is no study to date evaluating if topical kidney hypothermia (TKH) attenuates lung damage after kidney I/R.

Purpose: Evaluate whether TKH at different levels of temperature provides protective effects on lung tissue after kidney I/R through the analysis of organ histology and inflammatory markers in lung tissue.

Methods: Male Wistar rats (n=28) were randomized into four groups and underwent renal ischemia at different levels of kidney topical temperature: normothermic (without cooling, 37°C), mild hypothermia (26°C), moderate hypothermia (15°C) and deep hypothermia (4°C). Only the left kidney of each animal had his vessels clamped for 40 minutes followed by reperfusion. After 4 hours, new procedure was performed to remove tissues of interest. TNF- α , IL-1 β and myeloperoxidase activity were measured in lung tissue. Organ histology was evaluated using hematoxylin and eosin-stained lung specimens.

Results: Renal I/R under deep topical hypothermia resulted in a significant decrease of TNF- α lung concentration compared with normothermic I/R ($P < 0,05$). A trend toward significant correlation was found between lung IL-1 β concentration and the intensity of hypothermia (Spearman $r = -0,37$; $p = 0,055$). No difference was found in myeloperoxidase activity or histologic injury between groups.

Conclusion: These results suggest that TKH reduces the inflammatory cascade activation in the lung parenchyma. However tissue protection was not observed.

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Introdução

O dano renal agudo é uma entidade frequente em pacientes graves. Embora importantes avanços tenham sido realizados no manejo desta doença, a mortalidade de pacientes com insuficiência renal aguda associada a disfunção orgânica múltipla ainda é muito alta, com taxa estimada de 50%. Evidências crescentes mostram que o dano renal agudo é responsável pelo desencadeamento de uma cascata de eventos que determinam danos em múltiplos órgãos. Portanto, a melhor compreensão deste fenômeno e o delineamento de estratégias que possam atenuar estes danos são de suma importância. Neste estudo, procuramos determinar se a aplicação de hipotermia tópica no rim isquêmico seria capaz de atenuar os danos pulmonares decorrentes da isquemia e reperfusão (I/R) renal.

Revisão da Literatura

I - Isquemia e Reperfusão

A interrupção do fluxo sanguíneo resulta em isquemia, responsável por danificar os tecidos metabolicamente ativos. Paradoxalmente, o reestabelecimento do fluxo sanguíneo é responsável por desencadear uma cascata de eventos que pode levar a danos ainda maiores ao tecido. O endotélio pós-isquêmico apresenta papel central para a ocorrência de danos teciduais, pois representa a principal fonte de radicais livres, substâncias capazes de danificar moléculas através de mecanismos de toxicidade direta e indireta. Além disso, o endotélio pós-isquêmico registra uma diminuição da produção de óxido nítrico (NO), substância protetora e atenuadora dos danos decorrentes da isquemia e reperfusão (Prado RA et al., 2002).

O recrutamento de leucócitos também possui importante papel no desencadeamento de danos decorrentes de I/R. Moléculas de adesão presentes na superfície dos leucócitos interagem com seus ligantes nas células endoteliais e desencadeiam uma cascata de eventos que culmina na migração das células inflamatórias para o meio extracelular em um processo conhecido como diapedese. A migração de leucócitos da circulação para o sítio inflamatório ocorre em três momentos principais. Primeiramente, ocorre o rolamento, em que os leucócitos literalmente rolam sobre a superfície endotelial. Este processo é mediado por glicoproteínas pertencentes à família das selectinas, que são encontradas tanto na superfície leucocitária (L-selectina) como endotelial (P e E-selectinas). Este processo aproxima os

leucócitos de citocinas e outras substâncias quimioatrativas como leucotrieno B₄, C_{5a} e fator ativador plaquetário. Citocinas, ao se ligarem aos leucócitos, ativam β 2-integrinas. Segue-se então o processo de adesão, decorrente da interação entre β 2-integrinas (CD 18) dos leucócitos (CD11a, CD11b, CD11c) e seus receptores endoteliais (família de imunoglobulinas que incluem ICAM-1, -2, -3 e VCAM-1). Finalmente, ocorre a migração dos leucócitos para o interstício, onde estarão em contato íntimo com o tecido alvo e aptos a produzir lesões. Estas etapas estão ilustradas na Figura 1. Os polimorfonucleares podem causar dano tecidual através de mecanismos diversos que incluem secreção de enzimas proteolíticas, produção de radicais livres e possivelmente também através da obstrução de capilares ocasionando aumento da amplitude da área isquêmica. Além disso, macrófagos e linfócitos T são outras células leucocitárias envolvidas no desencadeamento de danos locais e à distância decorrentes de dano renal agudo (Prado RA et al., 2002) (Abbas AK et al., 2010) (Kramer et al., 1999) (Lie ML et al., 2012).

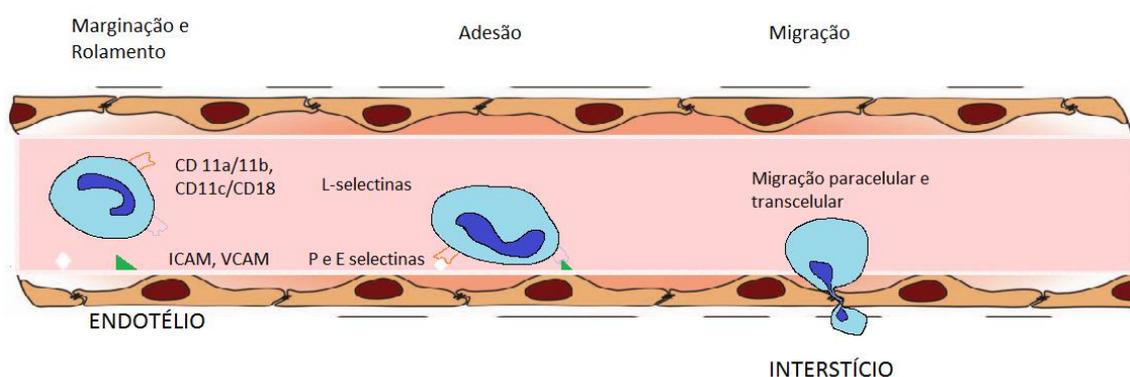


Figura 1: Desenho esquemático ilustrando as etapas envolvidas na diapedese de leucócitos até o sítio inflamatório. CD11a/11b/11c representam as cadeias das β 2 integrinas (CD18) leucocitárias; ICAM= molécula de adesão intercelular; VCAM= molécula de adesão celular vascular. Modificado e adaptado de Prado RA et al., 2002.

II - Alterações no Rim Decorrentes de Isquemia e Reperfusão Renal

A oxigenação adequada do parênquima é um pré-requisito essencial para que o rim mantenha seu metabolismo e desempenhe adequadamente suas reconhecidas funções. O aporte de oxigênio é essencial para a produção de ATP a partir de ADP através do mecanismo de fosforilação oxidativa mitocondrial. Além disso, a reabsorção de sódio, através do mecanismo de bomba Na^+/K^+ ATPase, também depende do adequado aporte de oxigênio às células renais. Em decorrência da ausência de fluxo sanguíneo renal, ocorre a depleção de ATP e a consequente disfunção mitocondrial resultando em acúmulo de sódio no meio intracelular, cálcio e espécies reativas de oxigênio. Subsequentemente, observa-se a ativação de múltiplos sistemas enzimáticos como fosfolipases, óxido nítrico-sintases, proteases e endonucleases que determinam a ocorrência de ruptura do citoesqueleto, dano à membrana celular, degradação do DNA e consequentemente morte celular. Além disso, a I/R renal também determina o aumento da concentração de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e complemento, que são responsáveis por danos diretos ao parênquima e também atraem leucócitos à área isquêmica acarretando danos ainda maiores ao tecido. El Sharif e colaboradores demonstraram que a I/R renal determina aumento dos níveis sistêmicos e no tecido renal de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-12 , IL-18 e $\text{INF-}\gamma$, corroborando o papel destes mediadores inflamatórios na determinação de danos locais e também sistêmicos. O próprio dano isquêmico ao endotélio também ocasiona disfunção endotelial que é responsável por prolongar a isquemia e induzir congestão

vascular, edema e infiltração leucocitária ainda maior (Lien YH et al., 2003; El Sharif A et al., 2011).

Cabe detalhar o dano às células epiteliais dos túbulos proximais do rim, que são particularmente sensíveis à isquemia renal. O dano isquêmico acarreta ruptura da membrana apical e consequente perda da polaridade celular desta região do néfron. Além disso, a isquemia renal determina, desde o início do insulto isquêmico, a perda de adesão das células epiteliais dos túbulos proximais, acarretando obstrução tubular proximal. Somado a isso, ainda ocorre vasoconstricção das arteríolas glomerulares aferentes e despolimerização da actina do citoesqueleto celular das células tubulares levando a importantes alterações da morfologia celular. Microtúbulos, estruturas compostas por α e β -tubulinas, com importante papel na dinâmica da morfologia celular, apresentam reorganização contínua de sua estrutura conforme as necessidades celulares. Caron e colaboradores demonstraram em seu estudo, em modelo murino, que a isquemia renal unilateral por 30 minutos seguida por 60 minutos de reperfusão acarreta aumento da expressão e redistribuição de β -actina e α -tubulina no citoesqueleto das células do epitélio tubular proximal, sugerindo que estas moléculas participam na resposta adaptativa às lesões celulares por I/R (Caron A et al., 2004).

Mecanismos mais recentemente estudados de lesão renal decorrente de I/R do rim são a apoptose e a chamada “necroapoptose”. A ativação de caspases, especialmente da caspase 3, determina a ativação de apoptose, enquanto que a inibição da caspase 8 determina a ativação da proteína cinase 3 levando à necrose celular programada ou necroapoptose (Price PM et al. 2012; Ye S et al., 2014).

III - Lesão de Órgãos à Distância Decorrentes de Isquemia e Reperusão

Em modelos animais, tem sido cada vez mais claro que o dano renal isquêmico não é um evento isolado e determina também precocemente danos em órgãos à distância como coração, pulmões, fígado, intestinos, medula óssea e cérebro através de mecanismos que envolvem a migração de neutrófilos, expressão de citocinas, apoptose e aumento do estresse oxidativo (Yap SC et al., 2012; Paladino JD et al., 2009). A insuficiência pulmonar é um dos danos mais estudados e clinicamente aparentes.

III.a - Lesão pulmonar decorrente de isquemia e reperusão renal

O dano pulmonar agudo caracteriza-se por edema pulmonar não cardiogênico. Este dano é caracterizado pelo acúmulo alveolar de fluido, secundário ao aumento da permeabilidade endotelial e epitelial associado a uma redução da eficiência dos mecanismos responsáveis pela drenagem deste fluido para o interstício. Uma vez no interstício, o fluido é drenado por linfáticos pulmonares. A barreira epitelial alveolar tem papel fundamental na prevenção da inundação alveolar por fluido intersticial. Para isto, tem papel importante as firmes ligações entre as células que constituem esta barreira. Além disso, os pneumócitos tipo I e II expressam $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPases que ativamente bombeiam Na^+ para o interstício. O equilíbrio osmótico é atingido através da passagem de água pelas aquaporinas de membrana. A inativação ou dano a estas ATPases ou aquaporinas pode determinar severo prejuízo ao balanço do fluido alveolar (Ko GJ et al., 2009).

Em síntese, pode-se afirmar que o dano pulmonar decorrente de I/R renal ocorre através de dois principais mecanismos: dano endotelial e dano epitelial. O dano endotelial é caracterizado por um aumento da permeabilidade capilar que acarreta congestão vascular pulmonar, edema intersticial, hemorragia alveolar focal e infiltração celular. Já o dano epitelial é decorrente de um *down regulation* dos transportadores de sal e água do epitélio pulmonar: ENac, Na⁺-K⁺ ATPase e aquaporina 5, todos responsáveis pelo *clearance* do fluido alveolar (Ko GJ et al., 2009).

As células tubulares proximais do rim acumulam funções de reabsorção, secreção e produção de uma variedade de mediadores inflamatórios e a inflamação é um componente principal do início e exacerbação de danos ocasionados pela I/R renal (Paladino JD et al., 2009; Ko GJ et al., 2009). Em um importante estudo de mapeamento genético foram demonstradas alterações de transcrição de inúmeros genes pró-inflamatórios ocorrendo concomitantemente no tecido renal e pulmonar decorrentes da isquemia renal como, por exemplo, CD14, amiloide sérico A3, lipocalina 2, CXCL-2 e receptor de interleucina 1. Além disso, foi demonstrado também que o grau de alterações de transcrição de genes pró-inflamatórios estava associado com a duração da isquemia renal, com 60 minutos de isquemia determinando maiores danos do que 30 minutos de isquemia renal (Grigoryev DN et al., 2008).

Citocinas e quimiocinas têm importante papel no início e progressão de danos renais e pulmonares. Estas substâncias são reconhecidas como mediadores de fundamental importância na conexão dos danos locais aos sistêmicos decorrentes de I/R renal. Hoke e colaboradores demonstraram que a ausência de função renal em ratos após tanto isquemia renal como

nefrectomia bilateral está associada a um aumento dos níveis séricos de múltiplas citocinas, incluindo IL-6, IL-12 e IL-1 β . Entretanto, a resposta sistêmica causada pela I/R renal apresenta alguns pontos distintos da ocasionada pela nefrectomia bilateral: a quimiocina derivada de queratinócitos (KC) e o fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) apresentaram aumento de suas concentrações séricas após dano renal agudo isquêmico, sem apresentar alterações significativas nos animais submetidos a nefrectomia bilateral; já o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e a IL-10 tiveram seus níveis sistêmicos aumentados apenas nos animais submetidos a nefrectomia bilateral (Hoke TS et al., 2007). Kelly também obteve sucesso em demonstrar aumento dos níveis sistêmicos de IL-1 e TNF- α decorrentes de I/R renal em ratos (Kelly KJ, 2003).

A indução de estresse oxidativo também tem importante papel na determinação de danos pulmonares decorrentes de isquemia renal. Em um estudo em ratos, o dano renal agudo decorrente de rhabdomiólise desencadeou aumento da permeabilidade vascular e infiltração inflamatória no tecido pulmonar. Concomitantemente, foi observado aumento das concentrações pulmonares de F2-isoprostano e da peroxidação lipídica, além de uma redução da capacidade antioxidante (Rodrigo R et al., 2006). Além disso, é possível que o dano renal agudo possa comprometer a capacidade do organismo inibir os danos sistêmicos decorrentes do estresse oxidativo, pois em estudo avaliando I/R unilateral do rim em ratos demonstrou-se diminuição dos níveis hepáticos de importantes mecanismos antioxidantes como superóxido-dismutase, catalase e glutathione (Serteser M et al., 2002). Um desequilíbrio de enzimas importantes no estresse oxidativo, como a óxido-nítrico-sintase e a heme-

oxigenase, pode também facilitar o desencadeamento de danos pulmonares decorrentes de dano renal (Vaziri ND et al., 2002).

Há crescentes evidências demonstrando que a apoptose celular pulmonar desempenha importante papel na fisiopatologia dos danos pulmonares decorrentes de I/R renal. Os receptores de TNF tipo 1 (TNFR1) e os receptores Fas (CD95) são os principais receptores de membrana celular envolvidos no mecanismo apoptótico e, uma vez ativados, determinam uma cascata de eventos que determinam a ativação de caspases intracelulares, mediadores diretos da apoptose (Robbins & Cotran - Pathologic Basis of Disease, 2010). El Sharif e colaboradores demonstraram que a I/R renal desencadeia aumento dos níveis séricos e pulmonares do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e conseqüente maior expressão pulmonar de caspase-3, desencadeando o mecanismo de morte celular programada (El Sharif A et al., 2011). Adicionalmente, Hassoun e colaboradores demonstraram que a apoptose endotelial pulmonar media diretamente os danos a distância decorrentes de I/R renal através da observação de que a I/R do rim em ratos desencadeia a transcrição de inúmeros genes pró-apoptóticos no tecido pulmonar, particularmente da superfamília dos receptores de TNF (TNFR) e Fas (Hassoun HT et al., 2009).

Os leucócitos estão diretamente envolvidos no desenvolvimento de lesão pulmonar decorrente de I/R do rim. Em modelos murinos, tanto de I/R do rim como nefrectomia bilateral, foi demonstrada sequestração de neutrófilos pelo tecido pulmonar. Além de neutrófilos, a infiltração pulmonar por macrófagos e linfócitos também tem papel na mediação de danos em órgãos distantes após I/R renal. Kramer et al. demonstraram que a permeabilidade

vascular pulmonar e o consequente extravasamento de fluido alveolar e intersticial foram atenuados após administração de CNI-1493, substância que tem a função de inibir a ativação de macrófagos. Já o grupo do Dr. Heitham T. Hassoun demonstrou a nítida presença de infiltração por linfócitos T no tecido pulmonar e o papel destas células na mediação de apoptose e perda da função de barreira microvascular pulmonar após I/R renal (Hoke TS et al., 2007; Kramer AA et al., 1999; Lie ML et al., 2012; Hassoun HT et al., 2007).

III.b - Lesão gastrointestinal decorrente de isquemia e reperfusão renal

Tanto a I/R do rim quanto nefrectomia bilateral resultam em aumento da expressão de interleucina-17A no intestino delgado. Esta interleucina tem o potencial de recrutar neutrófilos, ativar linfócitos T e induzir a expressão de outras citocinas como TNF- α e IL-6. Assim, o dano renal agudo resulta em significativo influxo de neutrófilos, macrófagos e linfócitos T no epitélio e nos capilares intestinais acarretando apoptose do endotélio das vilosidades, aumento da permeabilidade vascular, necrose epitelial e consequente ruptura da integridade da barreira intestinal. A IL-17A gerada no intestino delgado drena para a circulação portal causando subsequente aumento da expressão hepática de TNF- α e IL-6. Consequentemente, ocorre dano hepático caracterizado por infiltração por neutrófilos, vacuolização de hepatócitos e necrose periportal (Park SW et al., 2011).

O aumento do estresse oxidativo também apresenta papel central no desencadeamento e manutenção da resposta inflamatória no fígado após I/R renal. Observou-se no parênquima hepático um aumento de malondialdeído e

uma redução de enzimas antioxidantes como mieloperoxidase, glutathione, superóxido dismutase e catalase subsequentemente à I/R renal e à nefrectomia bilateral (Golab F et al., 2009).

III.c - Lesão cardíaca decorrente de isquemia e reperfusão renal

Foram documentados aumento dos níveis de TNF- α , IL-1 e ICAM-1 no tecido cardíaco após isquemia renal em ratos. Isto foi acompanhado do aumento da atividade de mieloperoxidase no tecido cardíaco. Alterações funcionais cardíacas foram detectadas 48h após isquemia renal e incluíram aumento do diâmetro diastólico e sistólico final do ventrículo esquerdo e diminuição da fração de encurtamento registrados por ecocardiografia. Além disso, também foi observada apoptose de células cardíacas 48h após I/R renal. Estes eventos podem ser importantes na determinação de morbidade e mortalidade da síndrome cardio-renal observada clinicamente (Kelly KJ, 2003).

III.d - Disfunção cerebral decorrente de isquemia e reperfusão renal

Alterações de níveis de neurotransmissores, inflamação cerebral e alterações funcionais foram documentadas em modelos animais de I/R renal. Uma diminuição do *turnover* de dopamina foi demonstrada no corpo estriado, mesencéfalo e hipotálamo 48 h após isquemia renal bilateral. Além disso, a reperfusão renal pós-isquemia também resulta em aumento da picnose neuronal e acarreta microgliose hipotalâmica. A picnose é o fenômeno de condensação da cromatina nuclear encontrada em células em processo de necrose e apoptose. As células gliais funcionam como macrófagos no tecido cerebral e apresentam papel fundamental na mediação do processo

neuroinflamatório. A barreira hemato-encefálica também pode sofrer disfunção secundária à I/R renal, resultando em edema cerebral (Yap SC et al., 2012; Paladino JD et al., 2010).

Uma síntese dos efeitos em órgãos à distância decorrentes da I/R renal está representada na figura 2.

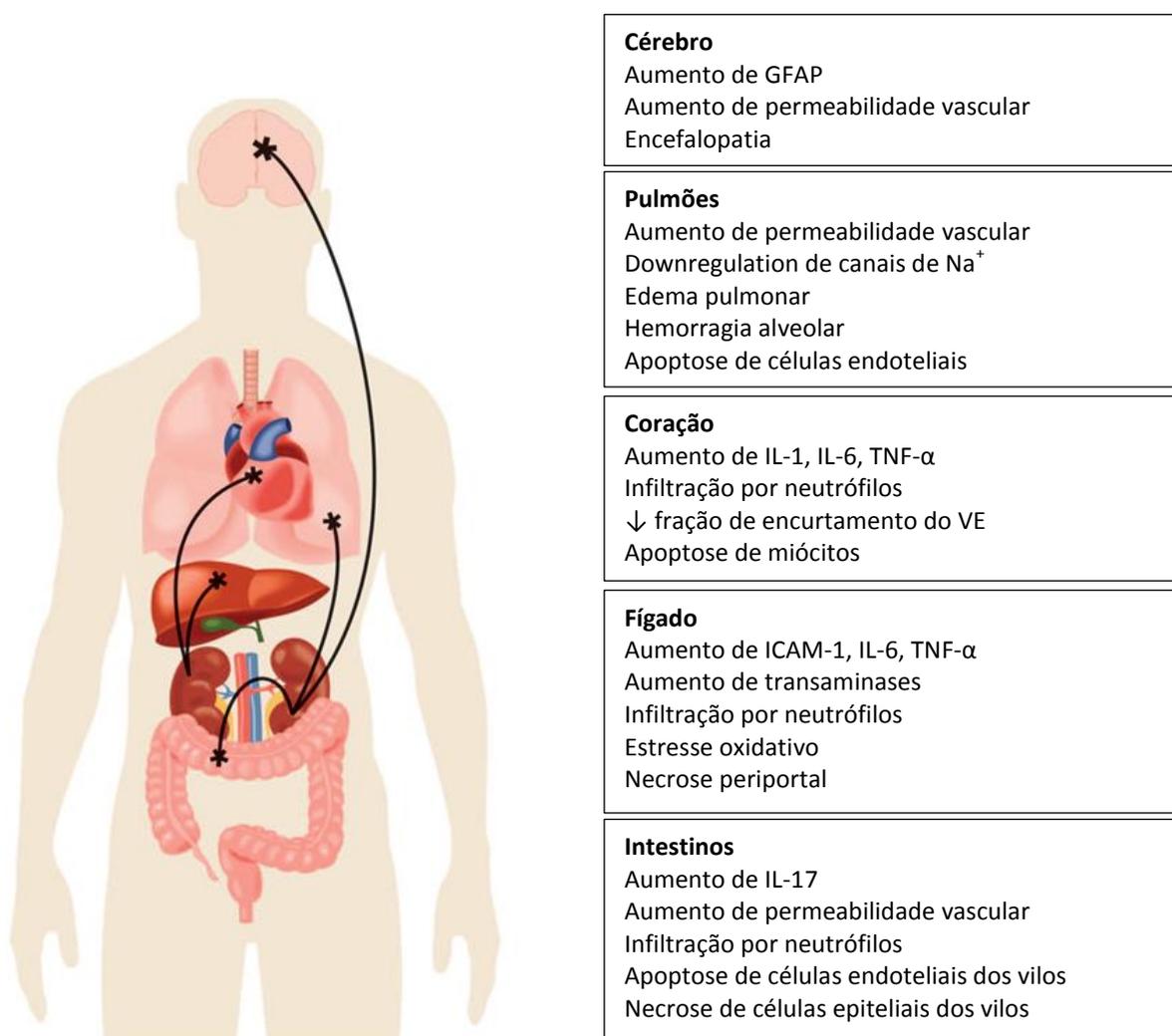


Figura 2: Efeitos deletérios em órgãos remotos decorrentes de isquemia e reperfusão renal. GFAP= proteína glial fibrilar ácida; IL= Interleucina; TNF- α = fator de necrose tumoral alfa; VE= ventrículo esquerdo; ICAM-1= molécula de adesão intercelular-1. Figura traduzida e adaptada de Yap SC et al., 2012.

IV - Hipotermia na Redução de Danos Decorrentes de Isquemia e Reperfusão

A I/R de órgãos viscerais é um problema comum e presente em vários cenários clínicos como sepse, choque, nefrectomias parciais, cirurgias vasculares e transplantes de órgãos. A I/R está associada a significativa morbidade e mortalidade e há poucas estratégias disponíveis na amenização destes danos. Ela determina sistematicamente danos locais, reação inflamatória sistêmica e disfunção de múltiplos órgãos. Neste sentido, um número crescente de estudos tem avaliado o papel da hipotermia na diminuição destes danos (Santora RJ et al., 2010).

Estudos experimentais em infarto agudo do miocárdio, transplante de órgãos, bypass cardiopulmonar, lesão de medula espinhal e isquemia intestinal têm demonstrado melhora do prognóstico com a utilização de hipotermia sistêmica. No nível clínico, vários estudos randomizados têm demonstrado melhora do desfecho neurológico pós-parada cardíaca e hipóxia neonatal. Pesquisas recentes têm demonstrado que a hipotermia pode alterar inúmeros mecanismos de sobrevivência e morte celular, como a regulação gênica por exemplo, resultando na inibição da apoptose e da reação inflamatória (Tang XN et al., 2010). Entretanto, o uso de hipotermia sistêmica tem sido limitado devido aos riscos decorrentes do método, como distúrbios hemodinâmicos, coagulopatia, acidose metabólica e arritmias. Devido a isso, o resfriamento localizado surgiu como um método menos invasivo e mais custo efetivo.

Grezzana Filho e colaboradores demonstraram que o uso de hipotermia tópica hepática não apresentou nenhuma influência significativa na temperatura corporal e pressão arterial média durante 90 minutos de isquemia e 120 minutos de reperfusão (Grezzana Filho TJ et al., 2009). O mesmo autor, em outra publicação, demonstrou que a hipotermia tópica protegeu o fígado isquêmico contra os danos decorrentes de I/R e permitiu uma recuperação precoce da função hepática (Grezzana Filho TJ et al., 2011). Santos e colaboradores estudaram os efeitos da hipotermia tópica do rim e observaram uma redução da concentração tecidual de catalase nos animais submetidos a isquemia renal sob hipotermia tópica intensa (4°C) em comparação ao grupo submetido a I/R renal normotérmica (37°C) concluindo que o resfriamento do rim a este nível acarreta menor estresse oxidativo tecidual (Santos EB et al., 2013).

Curiosamente, os efeitos protetores da hipotermia tópica parecem não só proteger ao próprio órgão que está sendo submetido à hipotermia como também atenuar danos em outros órgãos à distância. Em modelos animais, foi demonstrado que a hipotermia tópica hepática e também mesentérica atenua danos pulmonares em modelos de I/R destes órgãos. Patel e colaboradores observaram que a hipotermia tópica hepática a 25°C reduziu em 42% os níveis da atividade pulmonar da mieloperoxidase - um marcador da infiltração de neutrófilos utilizado como marcador de lesão tecidual - comparado com os animais submetidos a processo de I/R normotérmica. A permeabilidade vascular pulmonar aferida através da medida de extravasamento do corante *Evans Blue* também foi reduzida em 39% com a utilização de hipotermia tópica. Também neste estudo, foi observado que os níveis séricos de TNF- α

apresentaram aumento 73% inferior no grupo submetido à hipotermia tópica (25°C) em relação àqueles submetidos à isquemia normotérmica (37°C) após 30 minutos de reperfusão. Santora e colaboradores avaliaram os efeitos protetores da hipotermia tópica mesentérica e observaram que os pulmões de ratos submetidos a I/R mesentérica sob normotermia (37°C) apresentaram significativa infiltração por neutrófilos e hemorragia alveolar, achados que não foram tão evidentes naqueles animais submetidos a hipotermia tópica durante o período de isquemia intestinal (Patel S et al., 2000; Santora RJ et al., 2010).

V - Modelos Animais

Os estudos clínicos nesta área são bastante limitados. Sendo assim, os modelos animais de dano renal agudo têm sido fundamentais na determinação dos danos locais e também em órgãos distantes. Dos vários modelos animais, a I/R renal e a nefrectomia em ratos são os mais estudados devido à factibilidade e reprodutibilidade do método. A isquemia renal envolve o clampeamento temporário da artéria renal e tem relevância clínica em reparos de aneurisma de aorta supra-renal, nefrectomias parciais, transplante renal, nefropatia decorrente de uso de contraste, choque e parada cardíaca. A síndrome pós-reperfusão é caracterizada por intenso dano nos túbulos proximais do rim, responsáveis pela liberação citocinas e mediadores inflamatórios. Além disso, após o desclampeamento do pedículo renal, persiste uma redução do fluxo renal de cerca de 50% decorrente da presença de disfunção endotelial e mediadores vasoativos (Yap SC et al., 2012).

Modelos animais de dano renal têm limitações devido a diferenças entre espécies. Em humanos, o choque e a hipotensão levam a hipoperfusão com consequente necrose tubular aguda de etiologia isquêmica. Entretanto, mesmo hipotensão severa e prolongada em ratos tipicamente não determina dano renal agudo. Em contraste, a I/R renal em humanos determina alterações histológicas focais e sutis enquanto o mesmo estímulo em ratos determina necrose extensa e difusa dos túbulos proximais. Apesar das limitações, o uso de modelos animais tem fundamental importância em demonstrar que o dano renal agudo não é um evento isolado, mas determina danos em órgãos à distância através de mecanismos pro-inflamatórios que envolvem a migração de neutrófilos, expressão de citocinas e aumento do estresse oxidativo (Yap SC et al., 2012).

Também foi demonstrado que a isquemia renal determina alterações funcionais e transcrição de genes pró-inflamatórios e apoptóticos no tecido pulmonar de maneira distinta ao que acontece na nefrectomia bilateral, demonstrando que os danos em órgãos à distância não são decorrentes de uremia, perda da capacidade de eliminar toxinas ou alteração do balanço hídrico e sim decorrem da própria I/R do rim (Hassoun HT et al., 2007).

VI - Marcadores de Reação Inflamatória e de Dano Tecidual

A inflamação tem um papel central na fisiopatologia nos danos decorrentes da I/R. A I/R determina hipóxia celular que é acompanhada por uma resposta inflamatória que leva ao recrutamento de leucócitos e subsequentes danos celulares (Zuidema MY et al., 2010). Com o objetivo de

mensurar a atividade inflamatória e a lesão tecidual no parênquima pulmonar, pode-se utilizar diversos marcadores, considerando-se de fundamental importância os descritos a seguir:

- **Atividade de mieloperoxidase (MPO):** A peroxidase é uma enzima encontrada em leucócitos polimorfonucleares. A MPO é a peroxidase secretada pelos neutrófilos. Esta enzima é encontrada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido usada com sucesso como um marcador bioquímico do recrutamento destas células no pulmão e em outros órgãos submetidos a I/R. A dosagem da mieloperoxidase correlaciona-se fortemente com a quantidade de neutrófilos recrutados na lesão durante a inflamação, permitindo demonstrar o componente inflamatório de forma quantitativa (Bradley PP et al., 1982; Patel S et al., 2000).

- **TNF- α :** O TNF- α é considerado o mediador primário do processo inflamatório decorrente de I/R em vários tecidos como rins, pulmões, coração, fígado, olhos e cérebro. Várias células do sistema imunológico quando ativadas expressam TNF- α , como, por exemplo, neutrófilos, linfócitos B e T, células *natural killer* (NK), linfócitos T *natural killer* (NKT), monócitos e macrófagos. Os macrófagos residentes nos tecidos – astroglia, microglia, células de Langerhans, células de Kupffer e macrófagos alveolares – são produtores primários de TNF- α . A ligação do TNF- α a um de seus receptores, TNFR1 ou TNFR2, ativa vias de transdução de sinais celulares, sendo que a maioria dos efeitos do TNF- α decorre da sua ligação ao receptores TNFR1 (Shuh M et al., 2013). Estudos em modelos murinos mostraram que esta citocina apresenta níveis séricos e teciduais aumentados logo após I/R renal (Campanholle G et al., 2010; El Sharif A et al., 2011; Kelly KJ, 2003).

- **IL-1 β** : a IL-1 β e o TNF- α são as duas principais citocinas envolvidas na mediação do processo inflamatório. Ambas citocinas são essenciais na resposta do hospedeiro a qualquer insulto ou patógeno e também são responsáveis pela exacerbação dos danos decorrentes de lesão tecidual aguda e crônica. A IL-1 β é, dentre os 11 membros que compõem a família da IL-1, a melhor estudada e caracterizada. Ela é produzida e secretada por várias células, embora a vasta maioria dos estudos tenha focado na sua produção por células do sistema imune inato, como monócitos e macrófagos. Ela é produzida como um precursor inativo, a pro-IL-1 β , e é clivada à sua forma ativa pela protease pró-inflamatória caspase-1 (Lopez-Castejon G et al., 2011). Estudos em modelos murinos também mostraram que esta citocina apresenta níveis séricos e em órgãos à distância aumentados após I/R renal (Campanholle G et al., 2010; El Sharif A et al., 2011; Hoke TS et al., 2007).

- **Histologia pulmonar**: estudos em modelos animais demonstram que a I/R renal acarreta danos no tecido pulmonar, podendo-se observar os seguintes achados à avaliação histológica: congestão vascular pulmonar, infiltração leucocitária (neutrófilos, especialmente), hemorragia alveolar e acúmulo de hemácias no interstício.

REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Prado RA, Pereyra LHT, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/Reperfusion Injury. *J Surg Res.* 2002; 105(2): 248-58.
2. Abbas AK, Kumar V, Fausto N. Robbins & Cotran: Pathologic Basis of Disease. Ed. Elsevier. 2010; 8th edition: pp 59-71 e pp 98-118.
3. Kramer AA, Postler G, Salhab KF, Mendez C, Carey LC, Rabb H. Renal ischemia-reperfusion leads to macrophage mediated increase in pulmonary vascular permeability. *Kidney Int.* 1999; 55(6):2362-2367.
4. Lie ML, White LE, Santora RJ, Park JM, Rabb H, Hassoun HT. Lung T Lymphocyte trafficking and activation during ischemic acute kidney injury. *J Immunol.* 2012; 189(6):2843-51.
5. Lien YH, Lai LW, Silva AL. Pathogenesis of renal ischemia/reperfusion injury: lessons from knockout mice. *Life Sci.* 2003; 74(5):543-52.
6. El Sharif A, Awad AS. Curcumin immune-mediated and anti-apoptotic mechanism protect against renal ischemia/reperfusion and distant organ induced injuries. *Int Immunopharmacol.* 2011; 11(8):992-996.
7. Caron A, Desrosiers RR, Béliveau R. Kidney ischemia-reperfusion regulates expression and distribution of tubulin subunits, beta-actin and rho GTPases in proximal tubules. *Arch Biochem Biophys.* 2004; 431(1):31–46.
8. Price PM, Hodeify R. A possible mechanism of renal cell death after ischemia/reperfusion. *Kidney Int.* 2012; 81(8):720–721.
9. Ye S, Zhu Y, Ming Y, She X, Liu H, Ye Q. Glycyrrhizin protects mice against renal ischemia-reperfusion injury through inhibition of apoptosis and

inflammation by downregulating p38 mitogen-activated protein kinase signaling. *Exp Ther Med*. 2014; 7(5):1247-1252.

10. Yap SC, Lee HT. Acute kidney injury and extrarenal organ dysfunction: new concepts and experimental evidence. *Anesthesiology*. 2012; 116(5): 1139-48.

11. Paladino JD, Hotchkiss JR, Rabb H. Acute Kidney injury and lung dysfunction: a paradigm for remote organ effects of kidney disease? *Microvasc Res*. 2009; 77(1): 8-12.

12. Ko GJ, Rabb H, Hassoun HT. Kidney-lung crosstalk in the critically ill patient. *Blood Purif*. 2009; 28(2):75-83.

13. Grigoryev DN, Liu M, Hassoun HT, Cheadle C, Barnes KC, Rabb H. The local and systemic inflammatory transcriptome after acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19(3):547–558.

14. Hoke TS, Douglas IS, Klein CL, He Z, Fang W, Thurman JM, Tao Y, Dursun B, Voelkel NF, Edelstein CL, Faubel S. Acute renal failure after bilateral nephrectomy is associated with cytokine-mediated pulmonary injury. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18(1):155–164.

15. Kelly KJ. Distant effects of experimental renal ischemia/ reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14(6):1549–58.

16. Rodrigo R, Trujillo S, Bosco C. Biochemical and ultrastructural lung damage induced by rhabdomyolysis in the rat. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006; 231(8):1430–1438.

17. Serteser M, Koken T, Kahraman A, Yilmaz K, Akbulut G, Dilek ON. Changes in hepatic tnf-alpha levels, antioxidant status, and oxidation products after renal ischemia/reperfusion injury in mice. *J Surg Res* 2002; 107(2):234–240.
18. Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F, Liang K, Pandian R. Enhanced nitric oxide inactivation and protein nitration by reactive oxygen species in renal insufficiency. *Hypertension*. 2002; 39(1):135–141.
19. Hassoun HT, Lie ML, Grigoryev DN, Liu M, Tudor RM, Rabb H. Kidney ischemia-reperfusion injury induces caspase-dependent pulmonary apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009; 297(1):125-137.
20. Hassoun HT, Grigoryev DN, Lie ML, Liu M, Cheadle C, Tudor RM, Rabb H. Ischemic acute kidney injury induces a distant organ functional and genomic response distinguishable from bilateral nephrectomy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 293(1):30-40.
21. Park SW, Chen SW, Kim M, Brown KM, Kolls JK, D'Agati VD, Lee HT. Cytokines induce small intestine and liver injury after renal ischemia or nephrectomy. *Lab Invest*. 2011; 91(1):63–84.
22. Golab F, Kadkhodae M, Zahmatkesh M, Hedayati M, Arab H, Schuster R, Zahedi K, Lentsch AB, Soleimani M. Ischemic and non-ischemic acute kidney injury cause hepatic damage. *Kidney Int*. 2009; 75(8):783–92.
23. Santora RJ, Lie ML, Grigoryev DN, Nasir O, Moore FA, Hassoun HT. Therapeutic distant organ effects of regional hypothermia during mesenteric ischemia-reperfusion injury. *J Vasc Surg*. 2010; 52(4):1003-14.

24. Tang XN, Yenari MA. Hypothermia as a cytoprotective strategy in ischemic tissue injury. *Ageing Res Rev.* 2010; 9(1):61-8.
25. Grezzana Filho Tde J, Mendonça TB, Gabiatti G, Krueel CD, Corso CO. Topical liver hypothermia and ischemic preconditioning. A new model of ischemia and reperfusion in rats. *Acta Cir Bras.* 2009; 24(4):262-6.
26. Grezzana Filho TJ, Mendonça TB, Gabiatti G, Rodrigues G, Marroni NA, Treis L, De Rossi SD, Corso CO. Topical hepatic hypothermia plus ischemic preconditioning: analysis of bile flow and ischemic injuries after initial reperfusion in rats. *Acta Cir Bras.* 2011; 26(3):194-201.
27. Santos EB, Koff WJ, Grezzana Filho TJ, De Rossi SD, Treis L, Bona SR, Pêgas KL, Katz B, Meyer FS, Marroni NA, Corso CO. Oxidative stress evaluation of ischemia and reperfusion in kidneys under various degrees of hypothermia in rats. *Acta Cir Bras.* 2013; 28(8):568-73.
28. Patel S, Pachter HL, Yee H, Schwartz JD, Marcus SG, Shamamian P. Topical Hepatic Hypothermia Attenuates Pulmonary Injury after Hepatic Ischemia and Reperfusion. *J Am Coll Surg.* 2000; 191(6):650-6.
29. Zuidema MY, Zhang C. Ischemia/Reperfusion injury: the role of immune cells. *World J Cardiol.* 2010; 2(10): 325-32.
30. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982; 78:206–209.

31. Shuh M, Bohorquez H, Loss GE Jr, Cohen AJ. Tumor Necrosis Factor- α : Life and Death of Hepatocytes During Liver Ischemia/Reperfusion Injury. *Ochsner J.* 2013; 13(1):119-30.
32. Campanholle G, Landgraf RG, Gonçalves GM, Paiva VN, Martins JO, Wang PHM, Monteiro RMM, Silva RC, Cenedeze MA, Teixeira VPA, Reis MA, Silva AP, Jancar S, Camara NOS. Lung inflammation is induced by renal ischemia and reperfusion injury as part of the systemic inflammatory syndrome. *Inflamm Res.* 2010; 59(10): 861-9.
33. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011; 22(4):189-95.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar, em um modelo experimental, se a aplicação de hipotermia tópica sobre o rim é capaz de atenuar os danos ao tecido pulmonar decorrentes de isquemia e reperfusão renal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar se a hipotermia tópica renal, em diferentes níveis, é capaz de atenuar a ativação do processo inflamatório no tecido pulmonar ocasionado pela I/R do rim.
2. Avaliar se o resfriamento renal tópico, sob diferentes temperaturas, é capaz de atenuar a infiltração pulmonar por neutrófilos e os decorrentes danos no parênquima pulmonar decorrentes de I/R do rim.

ARTIGO EM INGLÊS

Analysis of the Effects of Topical Kidney Hypothermia on Lung Tissue after Kidney Ischemia and Reperfusion in Rats

**Marlon Roberto Fiorentini¹, Emanuel Burck dos Santos², Larisse Longo³,
Lúcia Kliemann⁴, Walter José Koff⁵, Carlos Otávio Corso⁶**

¹MD. Student of the Postgraduate Program in Medicine: Surgical Sciences, *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, Brazil.

²MD, MSc, PhD. Physician of the Division of Urology of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, Brazil.

³Biomedical. MSc Student of the Department of Clinical Medicine. Biomedical Scientist of the Laboratory of Experimental Research in Hepatology and Gastroenterology, *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, Brazil.

⁴MD, MSc, PhD. Professor of the Department of Pathology of the *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, School of Medicine, Brazil.

⁵MD, PhD. Professor of the Department of Surgery of the *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, School of Medicine, Brazil.

⁶MD, MSc, PhD. Professor of the Department of Surgery of the *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, School of Medicine, Brazil.

Abstract

Background: Animal studies have demonstrated that kidney ischemia and reperfusion (I/R) cause not only renal injury but also determine damage to the lungs. Recent data have shown that topical hepatic and mesenteric hypothermia attenuates lung injury after I/R. However, there is no study to date evaluating if topical kidney hypothermia (TKH) attenuates lung damage after kidney I/R.

Purpose: Evaluate whether TKH at different levels of temperature provides protective effects on lung tissue after kidney I/R through the analysis of organ histology and inflammatory markers in lung tissue.

Methods: Male Wistar rats (n=28) were randomized into four groups and underwent renal ischemia at different levels of kidney topical temperature: normothermic (without cooling, 37°C), mild hypothermia (26°C), moderate hypothermia (15°C) and deep hypothermia (4°C). Only the left kidney of each animal had his vessels clamped for 40 minutes followed by reperfusion. After 4 hours, new procedure was performed to remove tissues of interest. TNF- α , IL-1 β and myeloperoxidase activity were measured in lung tissue. Organ histology was evaluated using hematoxylin and eosin-stained lung specimens.

Results: Renal I/R under deep topical hypothermia resulted in a significant decrease of TNF- α lung concentration compared with normothermic I/R ($P < 0,05$). A trend toward significant correlation was found between lung IL-1 β concentration and the intensity of hypothermia (Spearman $r = -0,37$; $p = 0,055$). No difference was found in myeloperoxidase activity or histologic injury between groups.

Conclusion: These results suggest that TKH reduces the inflammatory cascade activation in the lung parenchyma. However tissue protection was not observed.

INTRODUCTION

Ischemia and reperfusion (I/R) play a central role in the pathophysiology of transplants and partial nephrectomy surgeries. Blood flow interruption causes tissue injury and paradoxically its restoration leads to a cascade of events that determines additional damage (1). Although the mechanisms are still not well understood, inflammation is involved in the pathophysiology of damage. The inflammatory response results in endothelial activation and impairment of microvascular blood flow. Inflammatory mediators such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), interleukin-12 (IL-12), interleukin-18 (IL-18), keratinocyte-derived chemokine (KC) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) are produced by the renal tubular epithelium during kidney I/R (2-4).

In addition to local damage, lung injury has also been reported as resulting from renal I/R and the circulating leukocytes and cytokines released into the systemic circulation appear to have a central role in this process (2). Additionally, increased pulmonary expression of TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1 and ICAM-1

(intercellular adhesion molecule-1) due to upregulation of these mediators also occurs after kidney I/R and has a synergistic effect in determining tissue lung damage (2). Histologically, lung injury is characterized by inflammation and hemorrhagic infiltration of the alveoli and parenchyma with consequent loss of endothelial barrier function (5).

More recently, research groups have pursued strategies to minimize the damage resulting from I/R. In this context, non-pharmacological strategies have attracted increasing interest and hypothermia has been pointed as a promising alternative due to its recognized cytoprotective effect in different experimental scenarios such as acute myocardial infarction, organ transplantation, cardiopulmonary bypass, spinal cord injury, intestinal ischemia and neonatal hypoxia. At the clinical level, prospective randomized clinical trials have demonstrated improved neurological outcomes following cardiac arrest and neonatal hypoxia (6). However, systemic hypothermia application has been limited due to the risks of the method such as hemodynamic disturbances, coagulopathy, metabolic acidosis and arrhythmias. Thus, the localized cooling has emerged as a less invasive, safer and cost effective method (7). In experimental studies, topical hepatic and also topical mesenteric hypothermia attenuated lung injury in models of I/R of these organs (8,9). However, the lung tissue effects resulting from topical kidney hypothermia (TKH) have not been studied yet. The purpose of this study was to evaluate if TKH during renal I/R leads to protective effects on the lung tissue and determine how much cooling is necessary to achieve protection.

METHODS

Animals:

The protocol was approved by the Animal Research Ethical Committee (Research and Post-Graduation Group, Porto Alegre Clinics Hospital) under number 1200-52 and procedures were consistent with the Good Animal Practice Guidelines of the National Institutes of Health (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Bethesda, USA, 2011). Procedures were performed on 28 male Wistar rats, weighting between 240g and 487g, housed under standard environmental conditions with free access to water and food.

Anesthesia and Surgical Protocol:

The surgical technique, the I/R model and the method of kidney cooling and its control are detailed in a previous publication of our research group (10). Briefly, procedures were performed under general anesthesia obtained by intraperitoneal administration of ketamine (75 mg/Kg) and xylazine (10 mg/Kg). Assessment of adequate anesthesia was obtained by rear paw reflexes. Each animal was placed on a heating pad and core body temperature was monitored by a rectal probe and maintained at 37°C during the entire procedure. A longitudinal median incision was performed, a right nephrectomy was carried out and only left kidney had his vessels clamped by placement of a nontraumatic vascular clamp for 40 minutes (ischemia time). During this period of ischemia, the animals were subjected to one of 4 different topical kidney temperature levels according to the group to which they had been randomized: normothermic (without cooling, 37°C), mild hypothermia (26°C), moderate hypothermia (15°C) and deep hypothermia (4°C). A thermal insulation device

made of latex and polystyrene was applied to isolate the left kidney from the rest of the abdominal cavity in the hypothermic I/R groups. An intraparenchymal temperature probe was inserted within the kidney to monitor the core temperature. The left kidney target-temperature was achieved through irrigation of iced saline solution and maintained during all the time of ischemia. After the ischemia time, the renal pedicle was unclamped and abdominal wall was closed. Animals were returned to their cages and allowed to recover. After 240 minutes of reperfusion (reperfusion time), the rats were reanesthetized and underwent another surgery. Lungs were removed and a fragment was placed in liquid nitrogen and stored in a freezer at -80°C . Remaining lung tissue was placed in formalin for subsequent histologic evaluation.

Myeloperoxidase assay:

The activity of myeloperoxidase (MPO) was measured according to Bradley et al. 1982 (11). The extraction of MPO was performed by homogenization of the lung tissue in phosphate buffer (50mM), pH 6.0, containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (100mg tissue/ml phosphate buffer). The samples were sonicated, frozen in liquid nitrogen and thawed three times. Afterwards, homogenates were centrifuged at 12.000rpm for 10 minutes at 4°C (5810R centrifuge). Seven- μL of supernatant was added to 200 μL phosphate buffer (50mM, pH 6.0, containing 0.167mg/ml o-dianisidine and $5 \times 10^{-4}\%$ H_2O_2) for the measurement of MPO activity. The changes in absorbance at 460nm visible light were measured by spectrophotometry (Zenyth 200rt) and recorded at intervals of 20 seconds for 10 minutes. Results are expressed as units/microgram of tissue (U/ μg tissue).

Assessment of TNF- α and IL-1 β in lung tissue

Lung tissue previously stored at -80°C was thawed and homogenized in a buffer composed of phosphate buffered saline, 0.5% Triton X-100 and protease inhibitor (Sigma P8340, St. Louis, MO, USA), pH 7.2. Upon completion of homogenization the material was centrifuged at 4.000rpm for 10minutes at 4°C and the supernatant collected for conducting ELISA tests (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). TNF- α (88-7340 eBioscience, San Diego, CA, USA) and IL-1 β (88-6010 eBioscience, San Diego, CA, USA) in lung tissue was determined by immunoassay according to the manufacturer's directions. Results are expressed as pg/ml.

Lung Histology:

Formalin-fixed lung specimens were paraffin-embedded for light microscopy. Sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histologic examination. Analysis were performed on all specimens by a pathologist blinded to the experimental condition of the animals. Histologic criteria for the evaluation of lung injury was the degree of interstitial and alveolar hemorrhage after kidney I/R. Hemorrhagic areas were quantitatively assessed using Image Pro Plus software (Media Cybernetics, Silver Spring, US).

Statistical Analysis

Statistical analyses were conducted using SPSS (v 18.0). Measurement of TNF- α , IL-1 β , MPO and degree of histologic injury were presented as mean \pm standard deviation and compared between groups using one-way analysis of variance (ANOVA) with robust standard error (Welch's test) followed by post hoc comparisons using Dunnett's T3 test. Spearman's correlation coefficient

was employed to assess correlation among variables. The level of statistical significance was set at $P \leq 0.05$ (two-sided).

RESULTS

Effect of TKH on pulmonary neutrophil infiltration after renal I/R

Pulmonary polymorphonuclear infiltration after renal I/R was quantitated by measuring pulmonary MPO activity. After 240 minutes of reperfusion, statistically significant differences were not found in the level of MPO activity among the four groups. The following means and standard deviations were observed: G1 (ischemia without hypothermia, 37°C): $30,8 \pm 5,6$ U/ μ g; G2 (ischemia with mild hypothermia, 26°C): $33,6 \pm 5,1$ U/ μ g; G3 (ischemia with moderate hypothermia, 15°C): $32,6 \pm 1,6$ U/ μ g; G4 (ischemia with deep hypothermia, 4°C): $32,9 \pm 3,7$ U/ μ g. (Figure 1)

Effect of TKH on lung TNF- α and IL-1 β levels in animals undergoing renal I/R

TNF- α levels in the lung tissue were significantly lower in the deep hypothermia group as compared to the group undergoing ischemia without topical cooling. Means and standard deviations observed were: : G1 $31,3 \pm 14,8$ pg/ml; G2 $14,1 \pm 4,7$ pg/ml; G3 15 ± 4 pg/ml; G4 $9,6 \pm 3,2$ pg/ml ($P < 0,05$) (Figure 2). IL-1 β concentration in the lung also showed lower values among animals undergoing renal ischemia under hypothermic conditions but the results did not reach statistical significance. The following means and standard deviations were

observed: G1 $210,5 \pm 64,7$ pg/ml; G2 $179 \pm 57,1$ pg/ml; G3 $169,6 \pm 28,4$ pg/ml; G4 $156,2 \pm 25,8$ pg/ml (Figure 3). The intensity of TKH showed a significant correlation with pulmonary levels of TNF- α (Spearman $r=-0,71$; $p<0,001$) and a borderline significant correlation with pulmonary concentration of IL-1 β (Spearman $r=-0,37$; $p=0,055$).

Effect of TKH on pulmonary histology after renal I/R

H&E-stained sections of the lung were analyzed under light microscopy. Quantitative assessment of hemorrhagic areas in the lung parenchyma was performed through Image Pro Plus analysis. It was observed no significant difference in the degree of alveolar and interstitium hemorrhage between groups. (Figure 4)

DISCUSSION

Little is still known about kidney-lung crosstalk in the clinical setting of acute ischemic kidney injury. Growing interest in this area is observed due to high morbidity and mortality rates associated with acute kidney injury (AKI). Despite recent improvements in supportive care, these rates have remained unchanged over the past two decades (12,13). Both experimental and clinical studies have pointed to an association between AKI and extrarenal organ injury. Pulmonary insufficiency is perhaps one of the most clinically apparent and studied distant organ effects of kidney injury. AKI was found to determine serious consequences on the lung of critically ill patients with increased length of time on mechanical ventilation and increased difficulty weaning from the ventilator (14).

The remote effects of AKI in the lungs are due to multiple distinct mechanisms: uncontrolled inflammatory cascade, oxidative stress, apoptosis, lung leukocyte activation and trafficking, and down regulation of sodium-potassium pump and water channels. These events lead to increased pulmonary vascular permeability, interstitial edema, alveolar hemorrhage, red blood cell sludging and consequently compromised lung mechanics. Extravasation of fluid into alveoli also inactivates surfactant, causing further compromise in lung function (12,13,15,16).

Growing number of publications have shown that renal I/R determines increase in serum, kidney and lung levels of cytokines such as TNF- α , IL-1 β , ICAM-1 and NF- κ B (nuclear factor κ B) (2,4,16-18). Remote organ increased levels of these inflammatory mediators is due not only to the increase in their systemic levels but also to transcriptional changes in extrarenal organs during ischemic AKI leading to the expression of proinflammatory genes (16). Exposure of leucocytes to inflammatory mediators allows their rolling on activated endothelium. Additionally, interaction of adhesion receptors with their counterreceptors on white blood cells provides mobilization of leukocytes on the endothelium and diapedesis across the vessel wall leading to accumulation of neutrophils and mononuclear cells in the interstitium (2,19).

Several strategies have been evaluated with the aim of reducing both the local injury as the secondary systemic injuries caused by renal I/R. In this scenario, the curcumin, an orange-yellow polyphenol present in curry spice, has been shown to reduce renal and pulmonary damage by inhibition of apoptotic mechanisms and also by reducing systemic and tissue levels of cytokines such as TNF- α and IL-1 β (3). Alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH), an

anti-inflammatory cytokine, and dexmedetomidine, an alpha adrenergic agonist with anti-inflammatory properties, were also evaluated as potential strategies to prevent secondary lung injury during renal I/R. Both substances have shown to inhibit upregulation of both lung TNF- α and ICAM-1 messenger RNA and also to reduce leucocyte infiltration into the lung (16,20).

Grezzana et al. (21), using very similar methodology to the present study, demonstrated that induction of 26°C topical hepatic hypothermia protected the ischemic liver against I/R injuries and allowed an early recovery of the hepatic function. Santos et al. (10) demonstrated that kidney levels of catalase were reduced in rats undergoing deep TKH (4°C) as compared to normothermic renal I/R, concluding that topical hypothermia can reduce oxidative-stress in the kidney.

The results of this study demonstrated a significantly decrease in the concentration of TNF- α in lung tissue resulting from the application of topical hypothermia on ischemic kidney. Although not statistically significant, a small reduction in lung levels of IL-1 β was also observed in the animals undergoing hypothermic kidney ischemia. In addition, we could demonstrate a strong correlation between intensity of hypothermia and lung TNF- α concentration suggesting that lesser the temperature less is the inflammatory reaction activation on lung tissue. Also IL-1 β showed a trend toward significant correlation with the intensity of topical hypothermia supporting the hypothesis that reduction of the temperature could attenuate the mechanisms involved in lung damage. These results are consistent with previous work which demonstrated that the administration of specific TNF- α and IL-1 β inhibitory agents prevents ischemia and reperfusion related remote organ injury (22-27).

Furthermore, there is good evidence that agents which decrease distant lung injury after I/R also decrease pulmonary TNF- α (20,28,29).

As the specific objective of this study was to compare lung damage between groups that underwent normothermic and hypothermic renal ischemia, it was considered that the absence of a sham group would not affect analysis and interpretation of results. A sham group would be of interest mainly to document the actual occurrence of lung injury following renal ischemia and this is already clearly demonstrated by previous studies (2,4,5,12,16,17,30). In this study, changes in lung parenchyma at 4 hours after renal ischemia of 40 minutes were evaluated and we found the presence of significant number of red blood cells in the interstitium and alveoli in all groups. However, there was not statistically significant difference between animals undergoing kidney ischemia under hypothermic or normothermic conditions. Similar findings were found previously by our research group investigating tissue protection by topical kidney hypothermia where histologic attenuation of renal injuries was not observed (10).

Kelly and colleagues (17) showed increased leukocyte infiltration in the heart, kidney, liver and lungs already evident 6 hours after 30 minutes of renal ischemia assessed by measurement of MPO activity in these systems. Similar findings were found by Deng J et al. (16) in which they reported increased MPO activity in the kidney as well as the lung already present 4 hours after 40 minutes of renal ischemia. In this study, where all animals underwent renal I/R, we did not find any significant difference among groups in the level of MPO activity regardless of the intensity of hypothermia during kidney ischemia. These

findings match with the histopathological analysis where no protection could be demonstrated.

In conclusion, these data suggest that kidney ischemia under topical hypothermic conditions results in decreased activation of the inflammatory cascade in the lung tissue. However, TKH did not show any significant change in the lung neutrophil infiltration rate or lung histological damage after renal ischemia and reperfusion.

Conflict of Interest

The authors have nothing to disclose.

Acknowledgement

We would like to acknowledge Marta Cioato, nurse from Animal Experimentation Center. We would also like to thank the Department of Pathology and the Laboratory of Physiology and Experimental Hepatology of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, Brazil.

Financial Support

The financial support came from FIPE (Incentive Fund to Research and Events) from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre

References

1. Prado RA, Pereyra LHT, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/Reperfusion Injury. *J Surg Res.* 2002; 105(2): 248-58.
2. Campanholle G, Landgraf RG, Gonçalves GM, Paiva VN, Martins JO, Wang PHM, Monteiro RMM, Silva RC, Cenedeze MA, Teixeira VPA, Reis MA, Silva AP, Jancar S, Camara NOS. Lung inflammation is induced by renal ischemia and reperfusion injury as part of the systemic inflammatory syndrome. *Inflamm Res.* 2010; 59(10): 861-9.
3. El Sharif A, Awad AS. Curcumin immune-mediated and anti-apoptotic mechanism protect against renal ischemia/reperfusion and distant organ induced injuries. *Int Immunopharmacol.* 2011; 11(8):992-96.
4. Hoke TS, Douglas IS, Klein CL, He Z, Fang W, Thurman JM, Tao Y, Dursun B, Voelkel NF, Edelstein CL, Faubel S. Acute Renal Failure after bilateral nephrectomy is associated with cytokine mediated pulmonary injury. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18(1): 155–64.
5. Kramer AA, Postler G, Salhab KF, Mendez C, Carey LC, Rabb H. Renal ischemia-reperfusion leads to macrophage mediated increase in pulmonary vascular permeability. *Kidney Int.* 1999; 55(6):2362-67.
6. Xian N, Tang, Midori A, Yenari. Hypothermia as a cytoprotective strategy in ischemic tissue injury. *Ageing Res Rev.* 2010; 9(1):61-8.
7. Grezzana Filho TJ, Mendonça TB, Gabiatti G, Krueel CD, Corso CO. Topic liver hypothermia and ischemic preconditioning: a new model of ischemia and reperfusion in rats. *Acta Cir Bras.* 2009; 24(4):262-6.

8. Patel S, Pachter HL, Yee H, Schwartz JD, Marcus SG, Shamamian P. Topical hepatic hypothermia attenuates pulmonary injury after hepatic ischemia and reperfusion. *J Am Coll Surg.* 2000; 191(6):650-6.
9. Santora RJ, Lie ML, Grigoryev DN, Nasir O, Moore FA, Hassoun HT. Therapeutic distant organ effects of regional hypothermia during mesenteric ischemia-reperfusion injury. *J Vasc Surg.* 2010; 52(4):1003-14.
10. Santos EB, Koff WJ, Grezzana Filho TJ, De Rossi SD, Treis L, Bona SR, Pêgas KL, Katz B, Meyer FS, Marroni NA, Corso CO. Oxidative stress evaluation of ischemia and reperfusion in kidneys under various degrees of hypothermia in rats. *Acta Cir Bras.* 2013; 28(8):568-73.
11. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982; 78(3): 206-9.
12. Hassoun HT, Lie ML, Grigoryev DN, Liu M, Tuder RM, Rabb H. Kidney ischemia-reperfusion injury induces caspase-dependent pulmonary apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009; 297(1): 125-37.
13. Ko GJ, Rabb H, Hassoun HT. Kidney-lung crosstalk in the critically ill patient. *Blood purif.* 2009; 28(2):75-83.
14. Vieira JM Jr, Castro I, Curvello-Neto A, Demarzo S, Caruso P, Pastore L Jr, Imanishe MH, Abdulkader RC, Deheinzelin D. Effect of acute kidney injury on weaning from mechanical ventilation in critically ill patients. *Crit Care Med.* 2007; 35(1):184–91.

15. Yap SC, Lee HT. Acute kidney injury and extrarenal organ dysfunction: new concepts and experimental evidence. *Anesthesiology*. 2012; 116(5):1139-48.
16. Deng J, Hu X, Yuen PS, Star RA. Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits lung injury after renal ischemia/reperfusion. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 169(6): 749–56.
17. Kelly KJ. Distant effects of experimental renal ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14(6): 1549-58.
18. Meldrum KK, Meldrum DR, Meng X, Ao L, Harken AH. TNF-alpha dependent bilateral renal injury is induced by unilateral renal ischemia reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 282(2): 540-46.
19. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell*. 1994; 76(2): 301-14.
20. Gu J, Chen J, Xia P, Tao G, Zhao H, Ma D. Dexmedetomidine attenuates remote lung injury induced by renal ischemia-reperfusion in mice. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2011; 55(10): 1272-8.
21. Grezzana Filho TJ, Mendonça TB, Gabiatti G, Rodrigues G, Marroni NA, Treis L, De Rossi SD, Corso CO. Topical hepatic hypothermia plus ischemic preconditioning: analysis of bile flow and ischemic injuries after initial reperfusion in rats. *Acta Cir Bras*. 2011; 26(3):194–201.
22. Otani Y, Takeyoshi I, Koibuchi Y, Matsumoto K, Muramoto M, Morishita Y. The effect of FR167653 on pulmonar ischemia-reperfusion injury in rats. *J Heart Lung Transplant*. 2000; 19(4): 377-83.

23. Esposito E, Mazzon E, Muia C, Meli R, Sessa E, Cuzzocrea S. Splanchnic ischemia and reperfusion injury is reduced by genetic or pharmacological inhibition of TNF-alpha. *J Leukoc Biol.* 2007; 81(4): 1032-43.
24. Yamada T, Murase N, Maeda T, Ye Q, Sakamoto T, Terakura M, Starzl TE, Todo S. Protective Effect of TNF-alpha and IL-1beta Inhibitor FR167653 on Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Small Intestinal Transplantation. *Transplant Proc.* 1998; 30(6):2638.
25. Seekamp A, Warren JS, Remick DG, Till GO, Ward PA. Requirements for tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in limb ischemia/reperfusion injury and associated lung injury. *Am J Pathol.* 1993; 143(2): 453-63.
26. Krishnadasan B, Naidu BV, Byrne K, Fraga C, Verrier ED, Mulligan MS. The role of proinflammatory cytokines in lung ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003; 125(2): 261-72.
27. Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA Jr. Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest.* 1990; 85(6):1936-43.
28. Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, Lentsch AB. Interleukin-10 inhibits pulmonary NF-kappaB activation and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1999; 277: 919-23.
29. Yang J, Murphy C, Denham W, Botchkina G, Tracey KJ, Norman J. Evidence of a central role for p38 map kinase induction of tumor necrosis factor

alpha in pancreatitis-associated pulmonary injury. *Surgery*. 1999; 126(2):216-22.

30. Hassoun HT, Grigoryev DN, Lie ML, Liu M, Cheadle C, Tudor RM, Rabb H. Ischemic acute kidney injury induces a distant organ functional and genomic response distinguishable from bilateral nephrectomy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 293(1):30-40.

LIST OF FIGURES OF THE PAPER

FIGURE 1. *MPO activity in rats undergoing renal ischemia and reperfusion under four different levels of topical kidney temperature. No difference was found between groups. (PAGE 74)*

FIGURE 2. *Changes in pulmonary levels of TNF- α after application of topical kidney hypothermia. TNF- α was significantly decreased in animals under intense topical hypothermia (4°C) during renal ischemia compared with animals undergoing renal ischemia under normothermic condition ($p < 0,05$). A significantly correlation was observed between intensity of topical hypothermia and lung TNF- α level. (PAGE 75)*

FIGURE 3. *Pulmonary levels of IL-1 β in animals undergoing renal ischemia under four distinct levels of topical kidney temperature. Although no significant difference was seen among groups, a correlation of borderline statistical significance was noted between intensity of topical hypotermia and lung IL-1 β level. (PAGE 76)*

FIGURE 4. *Quantitative assessment of hemorrhagic areas in the lung parenchyma in animals undergoing renal ischemia under four different levels of topical kidney temperature. Results express the percentage of tissue affected by hemorrhagic changes. No difference was found among groups. (PAGE 77)*

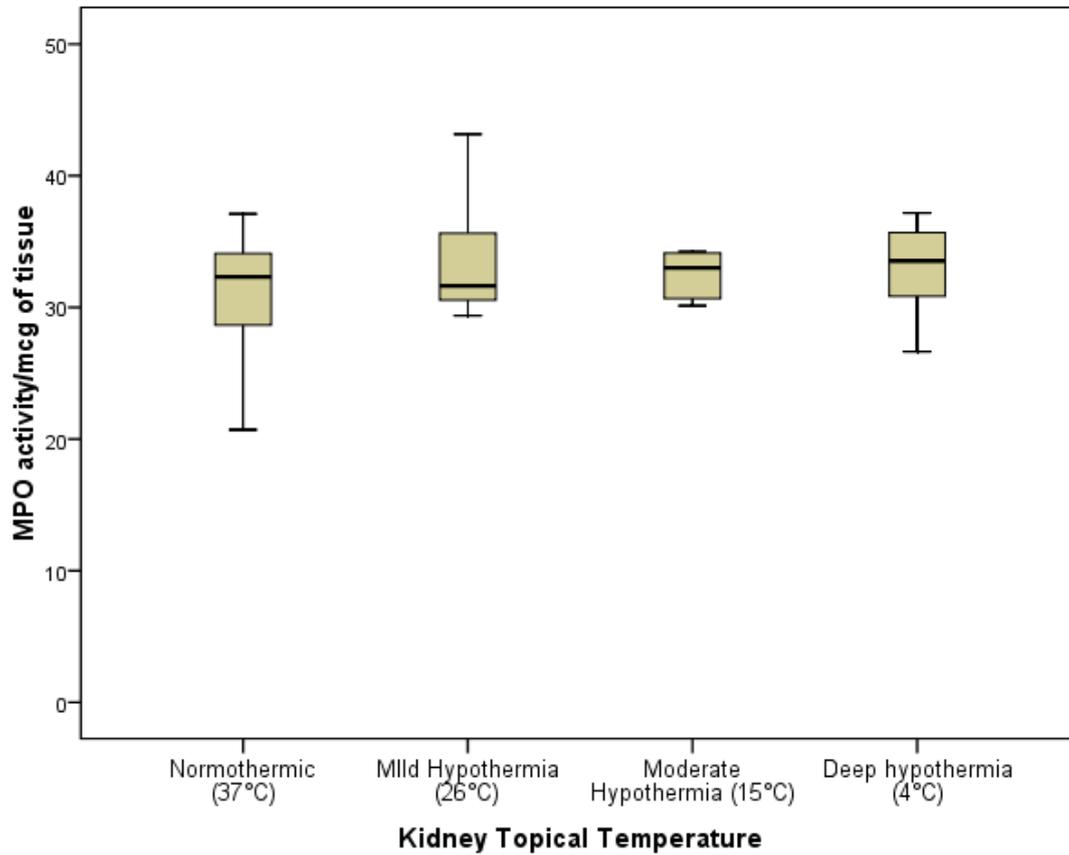
FIGURES OF THE PAPER

FIGURE 1. MPO activity in rats undergoing renal ischemia and reperfusion under four different levels of topical kidney temperature. No difference was found between groups.

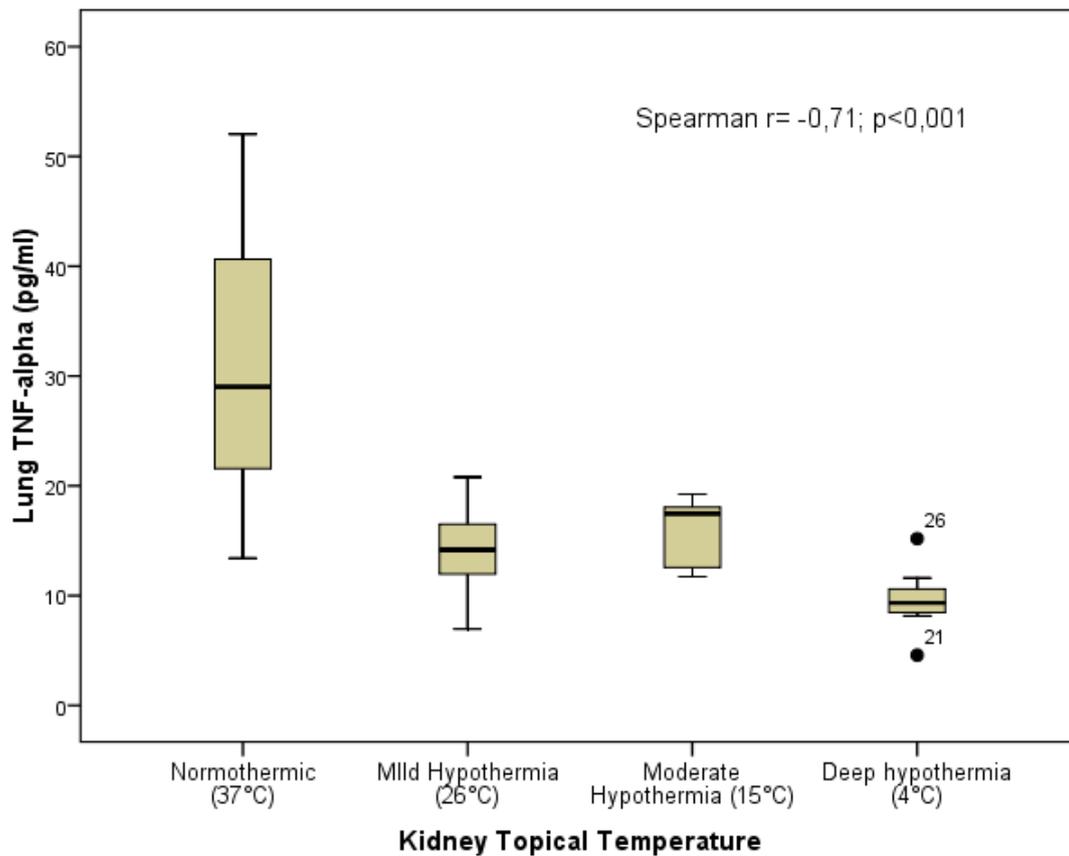


FIGURE 2. Changes in pulmonary levels of TNF- α after application of topical kidney hypothermia. TNF- α was significantly decreased in animals under intense topical hypothermia (4°C) during renal ischemia compared with animals undergoing renal ischemia under normothermic condition ($p < 0,05$). A significantly correlation was observed between intensity of topical hypothermia and lung TNF- α level.

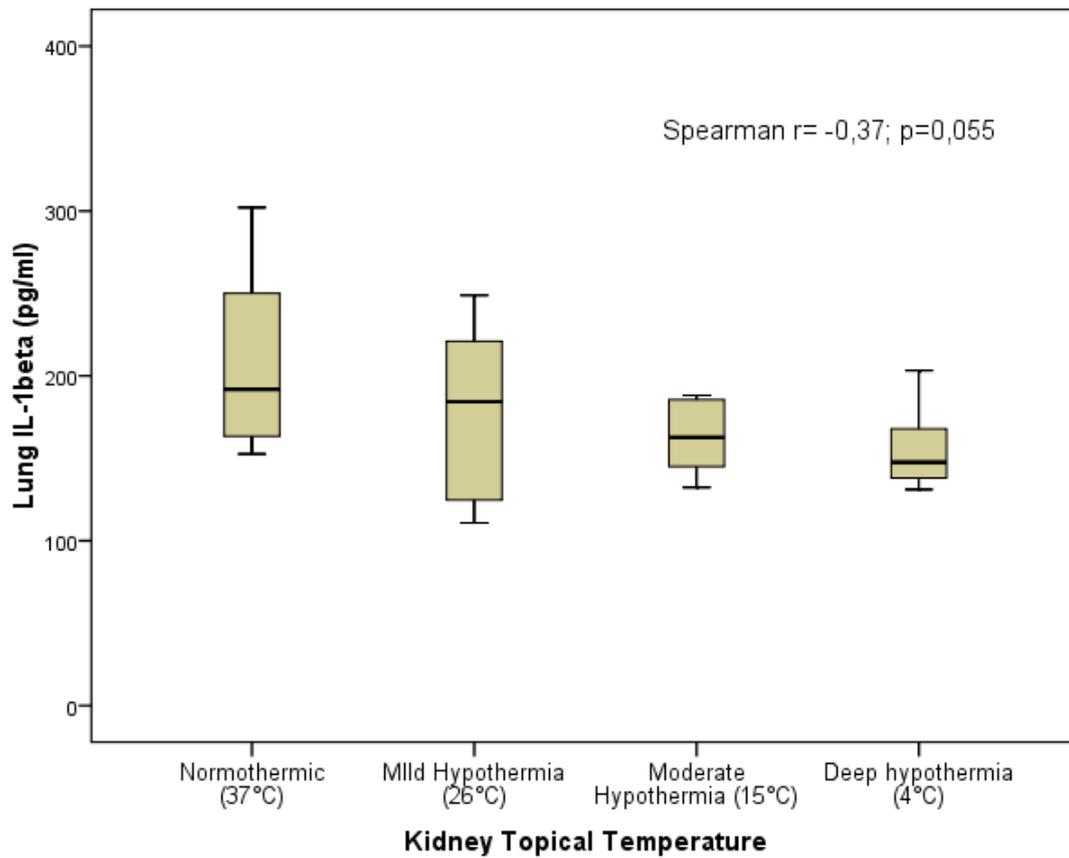


FIGURE 3. Pulmonary levels of IL-1 β in animals undergoing renal ischemia under four distinct levels of topical kidney temperature. Although no significant difference was seen among groups, a correlation of borderline statistical significance was noted between intensity of topical hypothermia and lung IL-1 β level.

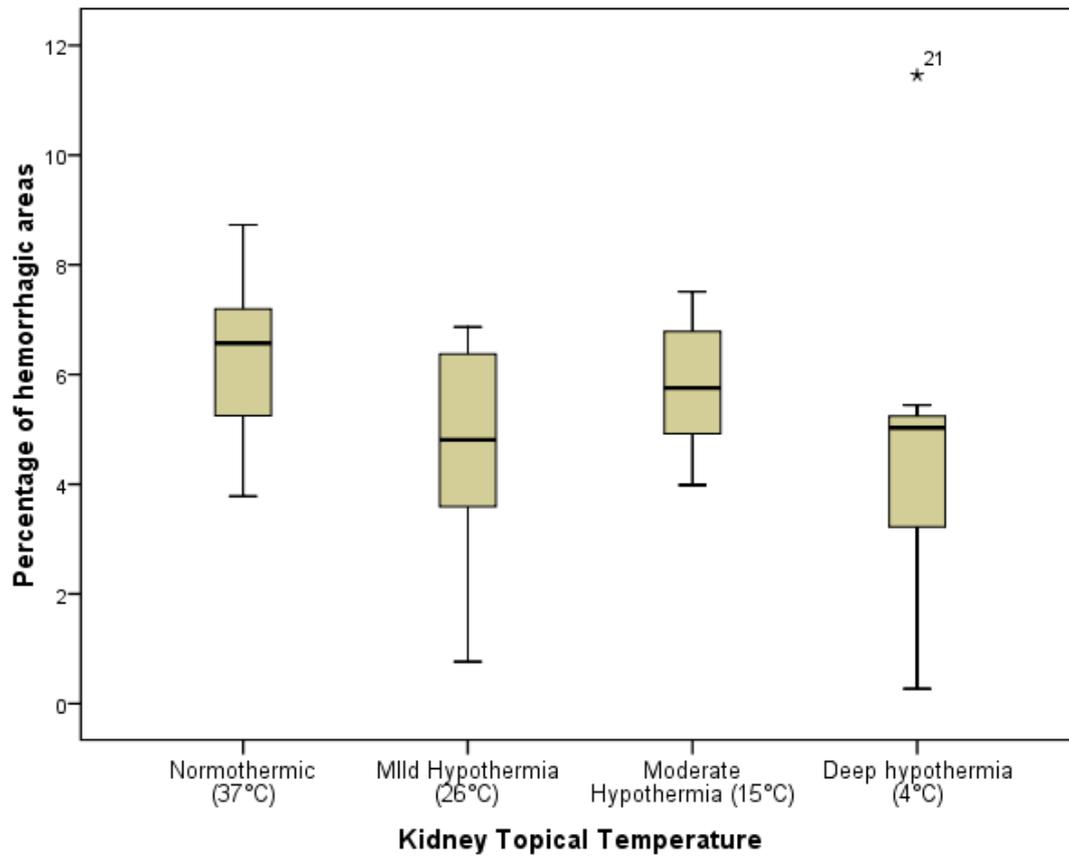


FIGURE 4. Quantitative assessment of hemorrhagic areas in the lung parenchyma in animals undergoing renal ischemia under four different levels of topical kidney temperature. Results express the percentage of tissue affected by hemorrhagic changes. No difference was found among groups.

ARTIGO EM PORTUGUÊS

Análise dos Efeitos da Hipotermia Tópica do Rim Sobre o Tecido Pulmonar Durante Isquemia e Reperfusão Renal em Ratos

**Marlon Roberto Fiorentini¹, Emanuel Burck dos Santos², Larisse Longo³,
Lúcia Kliemann⁴, Walter José Koff⁵, Carlos Otávio Corso⁶**

¹Médico Urologista: Aluno do Curso de Mestrado em Medicina: Ciências Cirúrgicas da Faculdade de Medicina (FAMED) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

²Médico do Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Mestre e Doutor em Medicina: Ciências Cirúrgicas.

³Biomédica do Laboratório Experimental de Gastroenterologia e Hepatologia do HCPA. Aluna do Curso de Mestrado em Medicina: Ciências Médicas da UFRGS.

⁴Médica Patologista. Professora Assistente do Departamento de Patologia da UFRGS. Mestre e Doutora em Medicina.

⁵Médico Urologista. Professor do Departamento de Cirurgia da UFRGS. Livre-Docente.

⁶Médico Cirurgião. Professor Associado do Departamento de Cirurgia da UFRGS. Mestre, Doutor e Pós-Doutor em Medicina.

Resumo

Introdução: Estudos em animais têm demonstrado que a isquemia e reperfusão (I/R) do rim acarreta danos não apenas ao tecido renal mas também ao parênquima pulmonar. Dados recentes puderam constatar que a hipotermia tópica hepática e também mesentérica atenua danos pulmonares em modelos de I/R destes órgãos. Entretanto, nenhum estudo até o momento avaliou o efeito da hipotermia tópica renal (HTR) na atenuação de danos pulmonares decorrentes do processo de I/R do rim.

Objetivo: Avaliar se a HTR em diferentes níveis de temperatura acarreta efeitos protetores sobre o parênquima pulmonar após I/R renal através da análise de marcadores inflamatórios e cortes histológicos do tecido pulmonar.

Métodos: Ratos Wistar (n=28) do sexo masculino foram randomizados em 4 grupos submetidos a diferentes níveis de temperatura tópica renal durante a isquemia renal: normotermia (sem resfriamento), hipotermia leve (26°C), moderada (15°C) e intensa (4°C). Apenas o rim esquerdo de cada animal foi submetido a clampeamento hilar com duração de 40 minutos seguido de reperfusão durante 240 minutos. Após este período, foi realizado novo procedimento para remoção dos tecidos de interesse. Foi realizada aferição das concentrações de TNF- α , IL-1 β e grau de atividade de mieloperoxidase no tecido pulmonar. Avaliação histopatológica foi realizada utilizando cortes de tecido pulmonar submetidos à coloração pela hematoxilina-eosina (H&E).

Resultados: A I/R renal sob hipotermia tópica intensa acarretou concentrações de TNF- α no tecido pulmonar significativamente menores comparativamente ao grupo submetido a I/R normotérmica ($p < 0,05$). Uma correlação de significância

limítrofe foi observada entre o nível pulmonar de IL-1 β e a intensidade da hipotermia tópica (Spearman $r=-0,37$; $p=0,055$). Em relação ao grau de atividade de mieloperoxidase e aos danos à avaliação histológica não foi observada diferença significativa entre os grupos

Conclusão: os resultados sugerem que a aplicação de HTR durante a I/R do rim reduz a ativação da cascata inflamatória no tecido pulmonar. Entretanto, não foi observada proteção à avaliação histológica.

INTRODUÇÃO

A lesão renal decorrente de isquemia e reperfusão (I/R) têm papel central na fisiologia dos transplantes e nas cirurgias de ressecção parcial do rim. A interrupção do fluxo sanguíneo determina dano tecidual e o reestabelecimento do fluxo ocasiona, paradoxalmente, uma cascata de eventos que determina um agravamento do dano inicialmente provocado (1). Embora os mecanismos não estejam ainda muito claros, a inflamação está envolvida na fisiopatologia destes danos. A resposta inflamatória resulta em ativação endotelial e comprometimento do fluxo sanguíneo microvascular. Durante a I/R do rim, mediadores inflamatórios como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), interleucina 12 (IL-12), interleucina 18 (IL-18), quimiocina derivada de queratinócitos (KC) e proteína quimiotática de monócitos tipo 1 (MCP-1) são produzidos pelo epitélio tubular renal (2-4).

Além dos danos locais, danos pulmonares têm sido relatados como resultantes da I/R renal, sendo que os leucócitos circulantes e as citocinas produzidas e

liberadas na circulação sistêmica desempenham importante papel neste processo (2). Adicionalmente, o aumento da expressão pulmonar de TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1 e ICAM-1 (molécula de adesão intracelular-1) decorrentes de *upregulation* destes mediadores após I/R renal atua de maneira sinérgica na determinação de danos ao tecido pulmonar (2). Histologicamente, o dano pulmonar é caracterizado por inflamação e infiltração hemorrágica do parênquima acarretando perda da função endotelial de barreira (5).

Mais recentemente, grupos de pesquisa têm buscado estratégias para minimizar os danos decorrentes da I/R. Neste contexto, estratégias não farmacológicas têm despertado crescente interesse. A hipotermia tem sido apontada como a mais promissora representante desta categoria devido ao seu reconhecido efeito citoprotetor em diversos cenários como, por exemplo, infarto agudo do miocárdio, transplante de órgãos, bypass cardiopulmonar, lesão de medula espinhal, isquemia intestinal e hipóxia neonatal. Em nível clínico, já se pôde demonstrar, através de estudos randomizados, melhora de desfechos neurológicos após parada-cardíaca e hipóxia neonatal (6). Entretanto, o uso da hipotermia sistêmica tem sido limitado devido aos riscos decorrentes do método, incluindo distúrbios hemodinâmicos, coagulopatia, acidose metabólica e arritmias. Devido a isso, o resfriamento localizado surgiu como um método menos invasivo, mais seguro e de boa relação custo-eficácia (7). Em ratos, a hipotermia tópica hepática e também mesentérica demonstrou atenuar danos pulmonares em modelos de I/R destes órgãos (8,9). Entretanto, neste mesmo cenário, os efeitos sobre o tecido pulmonar decorrentes da hipotermia tópica renal (HTR) não foram avaliados até o momento. O objetivo deste estudo é avaliar se a HTR durante a I/R renal acarreta efeitos protetores sobre o tecido

pulmonar, utilizando-se para isto diferentes níveis de temperatura tópica durante a isquemia renal.

MÉTODOS

Animais:

Todos os procedimentos foram realizados após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Grupo de Pesquisa e Pós Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) (número do projeto: 1200-52) respeitando os guias internacionais de boas práticas em pesquisa com animais do *National Institutes of Health (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Bethesda, EUA, 2011)*. Os experimentos foram realizados em 28 ratos Wistar do sexo masculino pesando entre 240 e 487 g, mantidos em condição padrão de alojamento, com livre acesso a ração e água.

Anestesia e Cirurgia:

A técnica cirúrgica, o modelo de I/R e o método de resfriamento renal e seu controle encontram-se detalhados em uma publicação anterior de nosso grupo (10). Resumidamente, os procedimentos foram realizados sob anestesia geral mediante injeção intraperitoneal de Ketamina (75 mg/Kg) e Xilazina (10 mg/Kg). O plano anestésico adequado foi assegurado através da avaliação de reflexos das patas traseiras. A mesa cirúrgica foi mantida aquecida e a temperatura sistêmica de cada animal foi monitorizada através de termômetro retal e mantida em 37°C durante todo o procedimento. Foi realizada laparotomia mediana seguida da remoção do rim direito. O fluxo sanguíneo apenas do rim

esquerdo foi interrompido durante 40 minutos (tempo de isquemia) através da aplicação de pinça vascular atraumática no hilo renal. Durante este período de isquemia, o rim foi submetido a resfriamento leve (26°C), moderado (15°C), intenso (4°C) ou não foi resfriado (mantido a 37°C), conforme o grupo a que havia sido randomicamente alocado cada animal. Um dispositivo constituído por látex e poliestireno foi utilizado para isolar o rim do restante da cavidade abdominal nos animais submetidos a hipotermia tópica. Foi utilizada irrigação com soro fisiológico gelado sobre o rim para obtenção da temperatura alvo, a qual foi monitorizada através de *probe* intraparenquimatoso durante o período de isquemia. Após este período, a pinça vascular foi removida, a cavidade abdominal aspirada e a ferida operatória suturada. Os animais foram transferidos para uma incubadora e após 240 minutos do reestabelecimento da circulação renal (tempo de reperfusão), os animais foram anestesiados e submetidos a nova cirurgia. Os pulmões foram removidos, sendo um fragmento colocado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -80°C e o restante do tecido colocado em formalina para posterior avaliação histológica.

Aferição da atividade de mieloperoxidase:

A atividade da mieloperoxidase (MPO) foi aferida de acordo com Bradley *et al.* 1982 (11). A extração de MPO foi realizada a partir da homogeneização do tecido pulmonar em tampão fosfato (50mM), pH=6.0, contendo 0.5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (100mg de tecido/mL de tampão fosfato). As amostras foram sonicadas, congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas três vezes. Posteriormente os homogenatos foram centrifugados a 12.000rpm por 10 minutos a 4°C (centrifuga 5810R). Sete- μ L do sobrenadante foram adicionados a 200 μ L de tampão fosfato (50mM,

pH=6.0, contendo 0.167mg/ml de dicloridrato de o-dianisidina e 0,0005% de peróxido de hidrogênio) para a medida da atividade de MPO. As alterações na absorbância a 460nm foram medidas por espectrofotometria (Zenyth 200rt) e registradas em intervalos de 20 segundos por 10 minutos. Os resultados foram expressos em unidade/micrograma de tecido (U/ μ g tecido).

Detecção dos níveis de TNF- α e IL-1 β no tecido pulmonar:

Os tecidos pulmonares previamente armazenados em freezer -80°C foram descongelados e homogeneizados em tampão fosfato salino com 0,5% de Triton X-100 e inibidor de protease (Sigma P8340, Saint Louis, MO, USA), pH 7.2. Após a realização da homogeneização, o material foi centrifugado a 4.000rpm durante 10 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado para a realização da técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). A determinação da concentração dos níveis de TNF- α (eBioscience 88-7340, San Diego, CA, USA) e IL-1 β (eBioscience 88-6010, San Diego, CA, USA) no tecido pulmonar foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em pg/ml.

Histologia pulmonar:

Os pulmões armazenados em formalina foram embebidos em parafina, seccionados e corados pela técnica de hematoxilina e eosina (H&E) para análise ao microscópio óptico. As análises foram realizadas em todas as amostras por um patologista que desconhecia o grupo a que cada animal havia sido alocado. O critério histológico utilizado para a avaliação do dano pulmonar foi o grau de hemorragia alveolar e do interstício. As áreas hemorrágicas foram

analisadas quantitativamente através da utilização do software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA).

Análise estatística:

Os níveis de TNF- α , IL-1 β , grau de atividade de MPO e o grau de hemorragia no tecido foram expressos em média \pm desvio padrão e comparados entre os grupos utilizando análise de variâncias (*one way ANOVA*) com erro padrão robusto (teste de Welch). As diferenças entre as médias, quando presentes no teste de ANOVA, foram avaliadas através do teste de comparações múltiplas de Dunnett. O teste de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar a associação entre o grau de hipotermia e o nível de marcadores teciduais. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Para as análises utilizamos o programa estatístico SPSS 18.0.

RESULTADOS

Efeito sobre o grau de atividade da mieloperoxidase pulmonar

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de atividade de MPO entre os 4 grupos. As respectivas médias e desvios padrão observados foram os seguintes: G1 (isquemia sem hipotermia, 37°C): 30,8 \pm 5,6 U/ μ g; G2 (isquemia com hipotermia leve, 26°C): 33,6 \pm 5,1 U/ μ g; G3 (isquemia com hipotermia moderada, 15°C): 32,6 \pm 1,6 U/ μ g; G4 (isquemia com hipotermia intensa, 4°C): 32,9 \pm 3,7 U/ μ g. (Figura 1)

Efeito sobre os níveis de TNF- α e IL-1 β no tecido pulmonar

Os níveis de TNF- α no tecido pulmonar foram significativamente menores no grupo submetido a hipotermia intensa (4°C) comparativamente ao grupo submetido a isquemia sem hipotermia. As médias e desvios padrão observados foram os seguintes: G1 31,3 \pm 14,8 pg/ml; G2 14,1 \pm 4,7 pg/ml; G3 15 \pm 4 pg/ml; G4 9,6 \pm 3,2 pg/ml (P<0,05) (Figura 2). A concentração de IL-1 β no tecido pulmonar também apresentou valores menores nos animais submetidos a isquemia com hipotermia, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. Foram observadas as seguintes médias e desvios padrão: G1 210,5 \pm 64,7 pg/ml; G2 179 \pm 57,1 pg/ml; G3 169,6 \pm 28,4 pg/ml; G4 156,2 \pm 25,8 pg/ml (Figura 3). O aumento da intensidade da HTR apresentou uma correlação significativa com os níveis pulmonares de TNF- α (Spearman r= -0,71; p<0,001) e uma correlação de significância limítrofe com a concentração pulmonar de IL-1 β (Spearman r= -0,37; p=0,055).

Avaliação Histológica

Não foi observada diferença significativa no grau de hemorragia intersticial e alveolar entre os grupos (Figura 4).

DISCUSSÃO

Pouco é conhecido sobre as interações nefro-pulmonares durante os cenários clínicos de dano renal agudo isquêmico. Esta área tornou-se alvo de intenso interesse devido às altas taxas de morbidade e mortalidade associadas ao dano renal agudo (DRA). Apesar dos recentes avanços nas terapias de suporte, estas taxas têm se mantido inalteradas ao longo das últimas duas décadas (12,13). Estudos clínicos e experimentais têm identificado uma

associação entre DRA e disfunção de órgãos à distância. A insuficiência pulmonar é um dos efeitos à distância mais evidentes e investigados neste contexto. Vieira e cols. (14) demonstraram que o DRA acarreta sérios agravos pulmonares em pacientes críticos como o aumento do tempo em ventilação mecânica e maior dificuldade no processo de desmame do ventilador.

Os efeitos pulmonares remotos decorrentes do DRA são resultado de vários mecanismos distintos: ativação da cascata inflamatória, estresse oxidativo, apoptose, ativação e migração leucocitária e *down regulation* de bombas de sódio-potássio e aquaporinas no tecido pulmonar. Estes eventos acarretam aumento da permeabilidade vascular pulmonar, edema intersticial, hemorragia alveolar, aglutinação e acúmulo de eritrócitos no interstício que juntos são responsáveis pelo comprometimento da função pulmonar. Além disso, o extravasamento de fluido para os alvéolos acarreta inativação do surfactante, causando prejuízo adicional à mecânica pulmonar (12,13,15,16).

Crescente número de publicações têm demonstrado que a I/R renal determina aumento dos níveis séricos, renais e pulmonares de citocinas como TNF- α , IL-1 β , ICAM-1 e NF-kB (fator nuclear kB) (2,4,16-18). O aumento dos níveis destes mediadores em órgãos à distância não deve-se apenas ao aumento de seus níveis sistêmicos mas também às alterações de transcrição que ocorrem em órgãos extra-renais durante o DRA isquêmico levando ao aumento da expressão de genes pró-inflamatórios nestes tecidos (16). A exposição destes mediadores aos leucócitos leva ao processo de marginação, rolamento, adesão e diapedese leucocitária através das paredes dos capilares ocasionando acúmulo de neutrófilos e células mononucleares no interstício (2,19).

Diversas estratégias têm sido estudadas com o objetivo de reduzir danos ocasionados pela I/R renal, não apenas localmente mas também em nível sistêmico. Neste cenário, a curcumina, um polifenol presente no tempero “curry”, demonstrou ser capaz de reduzir o dano renal e pulmonar através da inibição de mecanismos apoptóticos e também através da redução dos níveis teciduais e sistêmicos de citocinas como o TNF- α e IL-1 β (3). Outras duas substâncias foram estudadas especificamente para avaliar seu papel protetor sobre o tecido pulmonar decorrente da I/R renal: o hormônio estimulador alfa-melanocítico (α -MSH), uma citocina anti-inflamatória, e a dexmedetomidina, um agonista alfa adrenérgico com propriedades anti-inflamatórias. Ambas substâncias mostraram reduzir as concentrações de TNF- α , a expressão de ICAM-1 e a infiltração leucocitária no tecido pulmonar (16,20).

Grezzana e cols. (21), utilizando metodologia muito semelhante à utilizada no presente estudo, observaram que a indução de hipotermia tópica hepática a 26°C protegeu o fígado isquêmico das lesões decorrentes de I/R e permitiu uma recuperação mais rápida da função hepática. Santos e cols. (10) demonstraram que os níveis de catalase no parênquima renal foram reduzidos em animais submetidos a hipotermia tópica intensa (4°C) durante I/R renal, concluindo que a hipotermia tópica pode atenuar o estresse oxidativo no rim.

Neste estudo pode-se demonstrar uma significativa diminuição da concentração de TNF- α no tecido pulmonar decorrente da aplicação de hipotermia tópica no rim isquêmico. Adicionalmente, pudemos constatar em nosso experimento uma forte correlação entre a intensidade da hipotermia tópica e a concentração pulmonar de TNF- α , sugerindo que quanto menor a temperatura, menor a ativação da cascata inflamatória no tecido pulmonar. Os

níveis pulmonares de IL-1 β também apresentaram correlação com a intensidade de hipotermia tópica, porém de menor intensidade e de significância estatística limítrofe, mas também reforçam a hipótese de que a redução da temperatura poderia atenuar os mecanismos envolvidos na fisiopatologia dos danos pulmonares. Estes resultados são consistentes com estudos prévios que demonstraram que a administração de agentes inibitórios específicos de TNF- α e IL-1 β atenua danos em órgãos à distância decorrentes de I/R (22-27). Além disso, também há evidências de que agentes que diminuem os danos pulmonares à distância após I/R determinam também uma redução dos níveis pulmonares de TNF- α (20,28,29).

Consideramos que a não utilização de um grupo *sham* não acarretaria prejuízo à avaliação de nossos resultados, pois nosso principal objetivo foi comparar as alterações no tecido pulmonar entre os grupos submetidos a isquemia renal normotérmica e hipotérmica. Além disso, a ocorrência de danos pulmonares decorrentes de I/R renal já foi bem demonstrada em estudos anteriores (2,4,5,12,16,17,30). Avaliamos as alterações do parênquima pulmonar em 4 horas após insulto isquêmico de 40 minutos e observamos em todos os grupos a ocorrência de hemorragia alveolar e extravasamento de hemácias no parênquima, embora não tenha sido possível demonstrar diferença estatisticamente significativa entre os grupos submetidos a isquemia renal sob hipotermia ou normotermia. Achados semelhantes foram encontrados em estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa em que foi observado que a hipotermia tópica renal não acarretou proteção tecidual à avaliação histológica do rim (10).

Kelly e cols. (17) demonstraram aumento da infiltração leucocitária nos rins, fígado, coração e pulmões já presentes 6 horas após isquemia renal de 30 minutos avaliada através da aferição da atividade de MPO nestes tecidos. Achado semelhante foi encontrado em estudo de Deng J e cols. (16) em que foi observado aumento da atividade de MPO no tecido renal e pulmonar já presente 4 horas após isquemia renal de 40 minutos. Em nosso estudo, em que todos os animais foram submetidos a I/R renal, não encontramos diferença no nível de atividade de MPO entre os grupos submetidos a isquemia normotérmica ou isquemia sob diferentes graus de hipotermia tópica do rim.

Em conclusão, os dados obtidos sugerem que a isquemia renal sob hipotermia proporciona uma diminuição da ativação da cascata inflamatória, porém sem acarretar significativa alteração do grau de infiltração por neutrófilos ou atenuar os danos pulmonares à avaliação histológica.

Conflitos de Interesse

Os autores declaram não possuir conflitos de interesse.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer o apoio e suporte técnico de Marta Cioato, enfermeira do Centro de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Também gostaríamos de agradecer ao Serviço de Patologia e ao Laboratório de Hepatologia e Fisiologia Experimental do HCPA.

Apoio Financeiro

Este trabalho foi financiado pelo FIPE (Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos) do HCPA.

Referências

1. Prado RA, Pereyra LHT, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/Reperfusion Injury. *J Surg Res.* 2002; 105(2): 248-58.
2. Campanholle G, Landgraf RG, Gonçalves GM, Paiva VN, Martins JO, Wang PHM, Monteiro RMM, Silva RC, Cenedeze MA, Teixeira VPA, Reis MA, Silva AP, Jancar S, Camara NOS. Lung inflammation is induced by renal ischemia and reperfusion injury as part of the systemic inflammatory syndrome. *Inflamm Res.* 2010; 59(10): 861-9.
3. El Sharif A, Awad AS. Curcumin immune-mediated and anti-apoptotic mechanism protect against renal ischemia/reperfusion and distant organ induced injuries. *Int Immunopharmacol.* 2011; 11(8):992-96.
4. Hoke TS, Douglas IS, Klein CL, He Z, Fang W, Thurman JM, Tao Y, Dursun B, Voelkel NF, Edelstein CL, Faubel S. Acute Renal Failure after bilateral nephrectomy is associated with cytokine mediated pulmonary injury. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18(1): 155–64.
5. Kramer AA, Postler G, Salhab KF, Mendez C, Carey LC, Rabb H. Renal ischemia-reperfusion leads to macrophage mediated increase in pulmonary vascular permeability. *Kidney Int.* 1999; 55(6):2362-67.

6. Xian N, Tang, Midori A, Yenari. Hypothermia as a cytoprotective strategy in ischemic tissue injury. *Ageing Res Rev.* 2010; 9(1):61-8.
7. Grezzana Filho TJ, Mendonça TB, Gabiatti G, Krueel CD, Corso CO. Topical liver hypothermia and ischemic preconditioning: a new model of ischemia and reperfusion in rats. *Acta Cir Bras.* 2009; 24(4):262-6.
8. Patel S, Pachter HL, Yee H, Schwartz JD, Marcus SG, Shamamian P. Topical hepatic hypothermia attenuates pulmonary injury after hepatic ischemia and reperfusion. *J Am Coll Surg.* 2000; 191(6):650-6.
9. Santora RJ, Lie ML, Grigoryev DN, Nasir O, Moore FA, Hassoun HT. Therapeutic distant organ effects of regional hypothermia during mesenteric ischemia-reperfusion injury. *J Vasc Surg.* 2010; 52(4):1003-14.
10. Santos EB, Koff WJ, Grezzana Filho TJ, De Rossi SD, Treis L, Bona SR, Pêgas KL, Katz B, Meyer FS, Marroni NA, Corso CO. Oxidative stress evaluation of ischemia and reperfusion in kidneys under various degrees of hypothermia in rats. *Acta Cir Bras.* 2013; 28(8):568-73.
11. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982; 78(3): 206-9.
12. Hassoun HT, Lie ML, Grigoryev DN, Liu M, Tuder RM, Rabb H. Kidney ischemia-reperfusion injury induces caspase-dependent pulmonary apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009; 297(1): 125-37.
13. Ko GJ, Rabb H, Hassoun HT. Kidney-lung crosstalk in the critically ill patient. *Blood purif.* 2009; 28(2):75-83.

14. Vieira JM Jr, Castro I, Curvello-Neto A, Demarzo S, Caruso P, Pastore L Jr, Imanishe MH, Abdulkader RC, Deheinzelin D. Effect of acute kidney injury on weaning from mechanical ventilation in critically ill patients. *Crit Care Med.* 2007; 35(1):184–91.
15. Yap SC, Lee HT. Acute kidney injury and extrarenal organ dysfunction: new concepts and experimental evidence. *Anesthesiology.* 2012; 116(5):1139-48.
16. Deng J, Hu X, Yuen PS, Star RA. Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits lung injury after renal ischemia/reperfusion. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 169(6): 749–56.
17. Kelly KJ. Distant effects of experimental renal ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14(6): 1549-58.
18. Meldrum KK, Meldrum DR, Meng X, Ao L, Harken AH. TNF-alpha dependent bilateral renal injury is induced by unilateral renal ischemia reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 282(2): 540-46.
19. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell.* 1994; 76(2): 301-14.
20. Gu J, Chen J, Xia P, Tao G, Zhao H, Ma D. Dexmedetomidine attenuates remote lung injury induced by renal ischemia-reperfusion in mice. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2011; 55(10): 1272-8.
21. Grezzana Filho TJ, Mendonça TB, Gabiatti G, Rodrigues G, Marroni NA, Treis L, De Rossi SD, Corso CO. Topical hepatic hypothermia plus ischemic preconditioning: analysis of bile flow and ischemic injuries after initial reperfusion in rats. *Acta Cir Bras.* 2011; 26(3):194–201.

22. Otani Y, Takeyoshi I, Koibuchi Y, Matsumoto K, Muramoto M, Morishita Y. The effect of FR167653 on pulmonar ischemia-reperfusion injury in rats. *J Heart Lung Transplant*. 2000; 19(4): 377-83.
23. Esposito E, Mazzon E, Muia C, Meli R, Sessa E, Cuzzocrea S. Splanchnic ischemia and reperfusion injury is reduced by genetic or pharmacological inhibition of TNF-alpha. *J Leukoc Biol*. 2007; 81(4): 1032-43.
24. Yamada T, Murase N, Maeda T, Ye Q, Sakamoto T, Terakura M, Starzl TE, Todo S. Protective Effect of TNF-alpha and IL-1beta Inhibitor FR167653 on Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Small Intestinal Transplantation. *Transplant Proc*. 1998; 30(6):2638.
25. Seekamp A, Warren JS, Remick DG, Till GO, Ward PA. Requirements for tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in limb ischemia/reperfusion injury and associated lung injury. *Am J Pathol*. 1993; 143(2): 453-63.
26. Krishnadasan B, Naidu BV, Byrne K, Fraga C, Verrier ED, Mulligan MS. The role of proinflammatory cytokines in lung ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003; 125(2): 261-72.
27. Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA Jr. Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest*. 1990; 85(6):1936-43.
28. Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, Lentsch AB. Interleukin-10 inhibits pulmonary NF-kappaB activation and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1999; 277: 919-23.

29. Yang J, Murphy C, Denham W, Botchkina G, Tracey KJ, Norman J. Evidence of a central role for p38 map kinase induction of tumor necrosis factor alpha in pancreatitis-associated pulmonary injury. *Surgery*. 1999; 126(2):216-22.
30. Hassoun HT, Grigoryev DN, Lie ML, Liu M, Cheadle C, Tuder RM, Rabb H. Ischemic acute kidney injury induces a distant organ functional and genomic response distinguishable from bilateral nephrectomy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 293(1):30-40.

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

FIGURA 1. Atividade de mieloperoxidase em ratos submetidos a isquemia e reperfusão renal sob quatro diferentes níveis de temperatura tópica do rim. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos. (PÁGINA 98)

FIGURA 2. Alterações dos níveis pulmonares de TNF- α decorrentes da utilização de hipotermia tópica renal. Os níveis de TNF- α foram significativamente menores nos animais submetidos a hipotermia tópica intensa (4°C) durante a isquemia renal quando comparados a animais submetidos a isquemia renal sob condições normotérmicas ($p < 0,05$). Foi observada uma correlação significativa entre a intensidade da hipotermia tópica e os níveis pulmonares de TNF- α . (PÁGINA 99)

FIGURA 3. Níveis pulmonares de IL-1 β em animais submetidos a isquemia renal sob quatro níveis distintos de temperatura tópica do rim. Embora não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos, observou-se uma correlação de significância estatística limítrofe entre a intensidade de hipotermia tópica e a concentração pulmonar de IL-1 β . (PÁGINA 100).

FIGURA 4. Avaliação quantitativa das áreas hemorrágicas no parênquima pulmonar em animais submetidos a quatro diferentes níveis de temperatura tópica renal durante a isquemia do rim. Os resultados expressam o percentual de tecido acometido por alterações hemorrágicas em relação à área total avaliada. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos. (PÁGINA 101)

FIGURAS DO ARTIGO

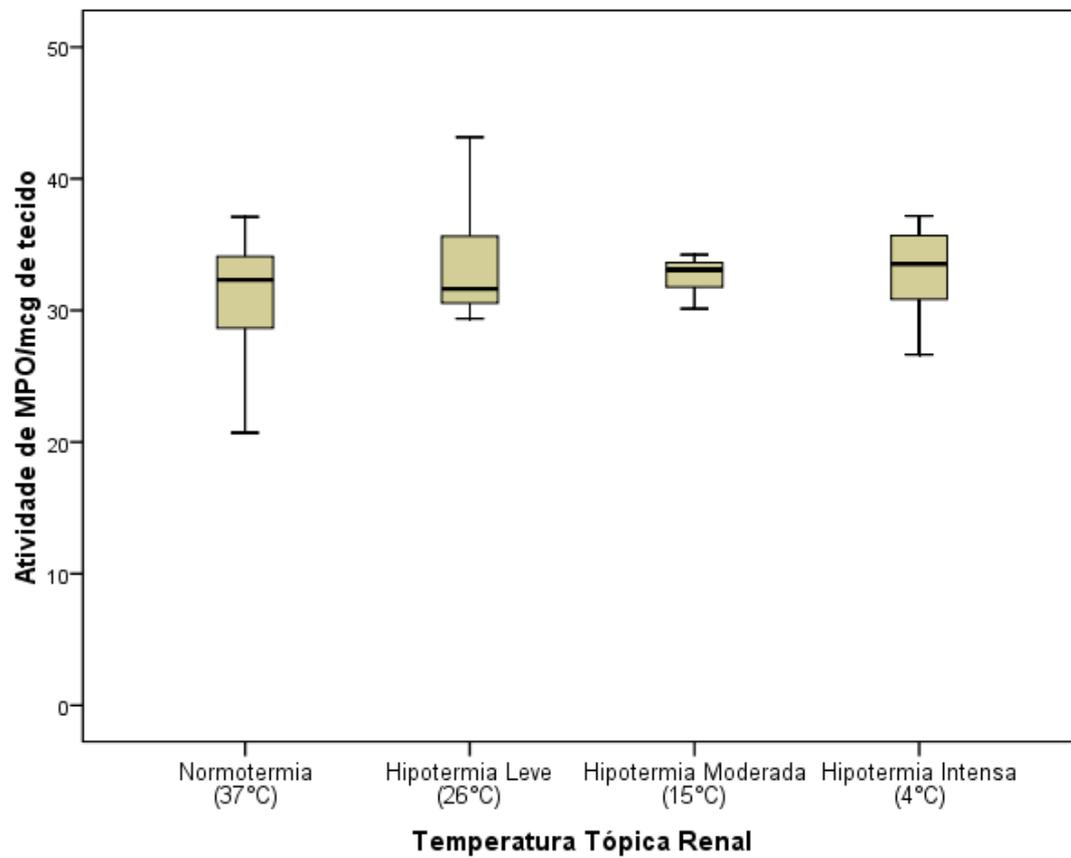


FIGURA 1. Atividade de mieloperoxidase em ratos submetidos a isquemia e reperfusão renal sob quatro diferentes níveis de temperatura tópica do rim. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos.

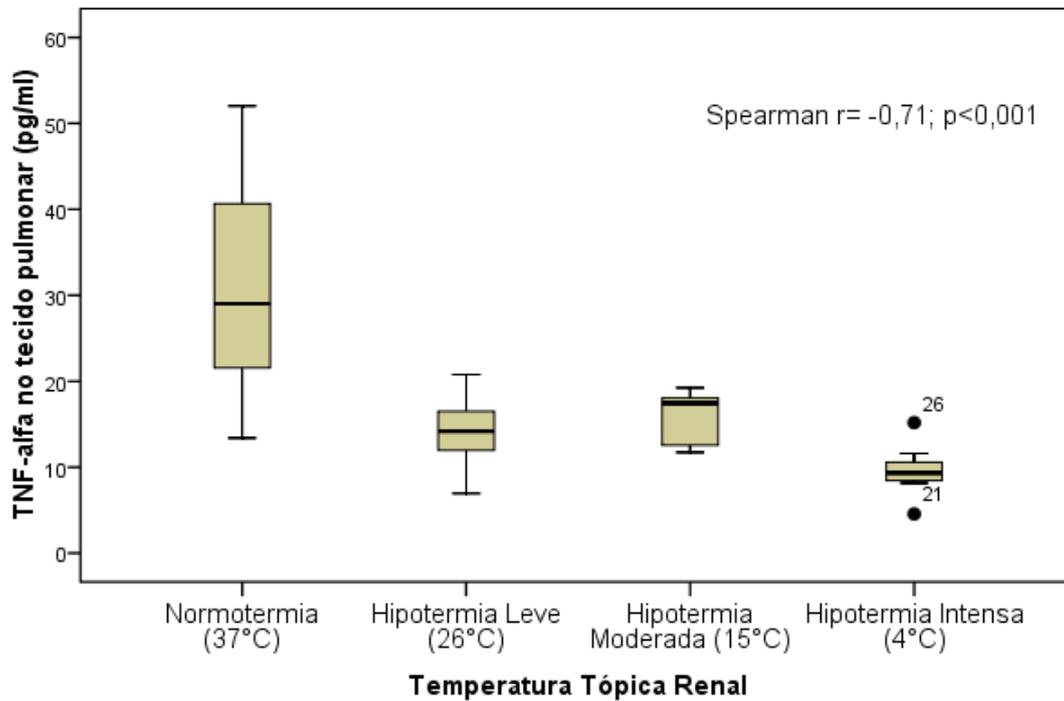


FIGURA 2. Alterações dos níveis pulmonares de TNF- α decorrentes da utilização de hipotermia tópica renal. Os níveis de TNF- α foram significativamente menores nos animais submetidos a hipotermia tópica intensa (4°C) durante a isquemia renal quando comparados a animais submetidos a isquemia renal sob condições normotérmicas ($p < 0,05$). Foi observada uma correlação significativa entre a intensidade da hipotermia tópica e os níveis pulmonares de TNF- α .

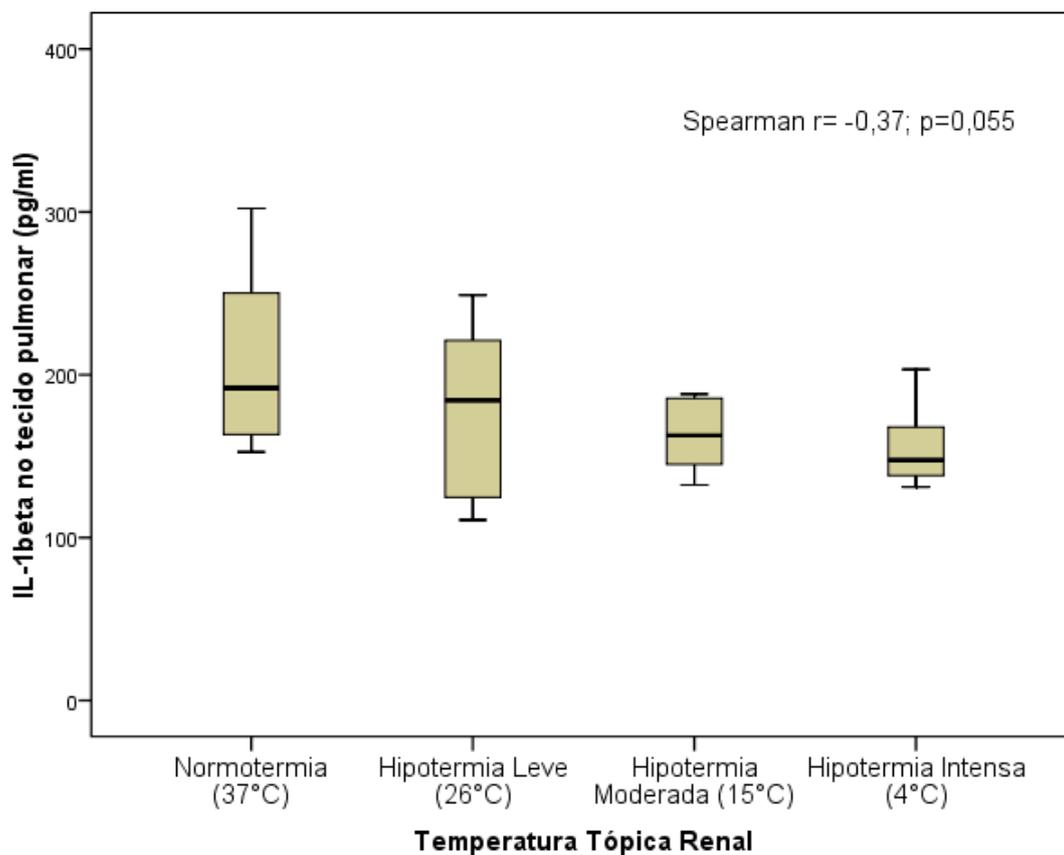


FIGURA 3. Níveis pulmonares de IL-1 β em animais submetidos a isquemia renal sob quatro níveis distintos de temperatura tópica do rim. Embora não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos, observou-se uma correlação de significância estatística limítrofe entre a intensidade de hipotermia tópica e a concentração pulmonar de IL-1 β .

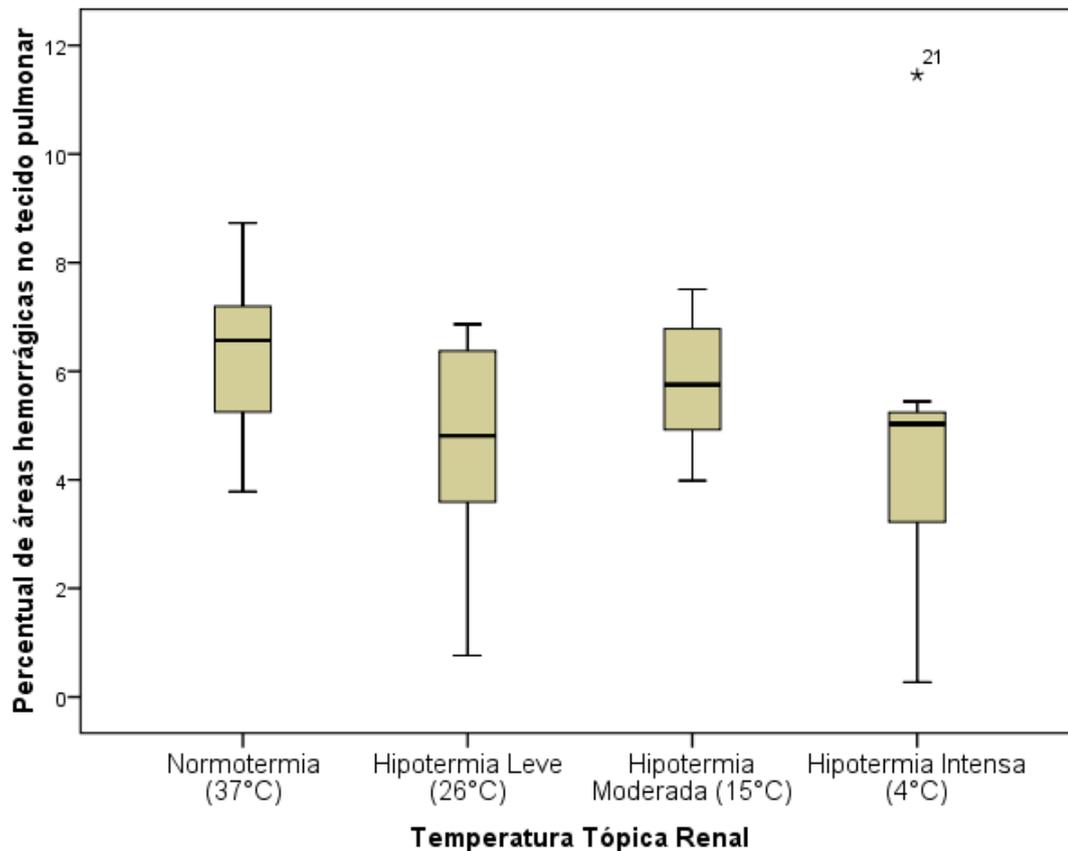


FIGURA 4. Avaliação quantitativa das áreas hemorrágicas no parênquima pulmonar em animais submetidos a quatro diferentes níveis de temperatura tópica renal durante a isquemia do rim. Os resultados expressam o percentual de tecido acometido por alterações hemorrágicas em relação à área total avaliada. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos.

ANEXOS

ANEXO I – MATERIAL E MÉTODOS – TEXTO COMPLEMENTAR

Tendo em vista a relevância de um maior detalhamento da secção “Material e Métodos” do artigo e considerando-se que uma descrição mais detalhada acarretaria em um artigo demasiado extenso, optou-se por descrever neste anexo algumas observações importantes a respeito da metodologia empregada para a realização deste trabalho.

A avaliação dos marcadores bioquímicos (mieloperoxidase, TNF- α e IL-1 β) foi realizada no Laboratório Experimental de Gastroenterologia e Hepatologia do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Foi utilizada metodologia apropriada para a realização das aferições conforme descrito na secção materiais e métodos do artigo em anexo nesta tese.

As análises histológicas foram realizadas na Unidade de Patologia Experimental (UPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os pulmões armazenados em formalina foram embebidos em parafina e de cada bloco foi obtido um corte de 4 micra que foi corado pela técnica de hematoxilina e eosina (H&E). Obteve-se assim, uma lâmina corada para cada animal do experimento. Os cortes foram então digitalizados com a utilização de câmera da marca Olympus, modelo DP72, acoplada a microscópio óptico Olympus (modelo BX-51) e conectada a um microcomputador. Foram obtidas imagens no aumento de 200 X, em formato TIFF (*Tag Image File Format*) e com resolução de 2560 x 1920 pixels. Foi utilizado o programa Image Pro Plus (*Media Cybernetics, Silver Spring, USA*) para a análise das imagens. Cada imagem teve sua área de interesse definida, sendo realizada sua análise quantitativa semiautomática. Os

dados foram exportados para uma planilha do programa Excel (*Microsoft*). Foram avaliadas 6 imagens de cada lâmina. O critério histológico utilizado para a avaliação do dano pulmonar foi o grau de hemorragia alveolar e do interstício. Este parâmetro foi avaliado através da contagem de pixels marcados para áreas hemorrágicas em relação à quantidade total de pixels por imagem (4915200 pixels por imagem) e os resultados transformados de números absolutos para os percentuais correspondentes. Estas análises foram realizadas por patologista cegado quanto ao grupo a que cada animal havia sido alocado.

- **Técnica Cirúrgica**

Este trabalho é derivado do projeto que originou a tese de doutoramento do Dr Emanuel Burck dos Santos. O Dr Emanuel buscou avaliar os efeitos da hipotermia tópica na atenuação de danos ao tecido renal decorrentes da I/R do rim e, no desenvolvimento de seu trabalho, teve a preocupação de coletar também os pulmões dos animais submetidos aos experimentos, o que possibilitaria a execução de futuros estudos sem a necessidade do sacrifício de maior número de animais. A partir desta preocupação, pôde-se desenvolver então o trabalho aqui apresentado (Santos EB et al., 2013).

Abaixo são descritos os principais pontos relevantes quanto ao desenvolvimento e a execução da técnica cirúrgica.

- Necessidade de duas cirurgias: a primeira para isquemia renal sob controle local e sistêmico da temperatura. A segunda, após a reperfusão, para coleta das amostras finais.

- Apenas o rim esquerdo foi submetido a isquemia e reperfusão. Foi escolhido este rim por apresentar um pedículo mais longo, facilitando a dissecação para interrupção temporária do fluxo sanguíneo com clipe não-traumático e removível. O rim direito serviu como grupo controle para as análises do trabalho do Dr Emanuel Burck dos Santos.
- Medida da temperatura intraparenquimatosa renal: para a medida constante da temperatura intraparenquimatosa do córtex renal esquerdo, durante a isquemia sob controle térmico, foi usada uma sonda denominada “*microprobe*” intraparenquimatosa IT-18 ligada o termômetro BAT-12 (*IITC Life Science, Woodland Hills, Califórnia, EUA*)
- Resfriamento tópico controlado do rim: solução fisiológica (NaCl 0,9%) resfriada e congelada, em gotejo contínuo e controlado, foi usada para manter o rim resfriado na temperatura alvo. No grupo normotérmico (37°C) não foi necessária essa solução. Isolamos o rim com látex e poliestireno para evitar o resfriamento dos tecidos circunjacentes bem como para proteger o rim contra aquecimento pelo restante do corpo. O soro fisiológico era constantemente aspirado.
- Manutenção da temperatura sistêmica durante todo período de isquemia renal: a mesa cirúrgica era aquecida e os animais eram cobertos com gaze e papel alumínio. Para verificação da temperatura sistêmica (retal) foi usado um termômetro clínico digital comum (Termomed 1.0, ref 29832, Incoterm, Brasil)

Para alcançar o modelo pensado, usamos ratos Wistar adultos do sexo masculino. Os animais pesaram entre 240,12g e 487,61g. Logo após a

pesagem, os animais eram anestesiados. A técnica anestésica constituiu-se na injeção intraperitoneal de Ketamina (75 mg/Kg) e de Xilazina (10 mg/Kg). Era realizada tricotomia abdominal e então o animal era transferido para a mesa cirúrgica aquecida. Oxigênio a 1L/min era administrado por campânula. Realizamos infiltração da parede abdominal com Bupivacaína 0,5% para assegurar analgesia no pós-operatório. A cavidade peritoneal era acessada através de incisão mediana. As alças intestinais eram mantidas úmidas e afastadas do campo operatório por meio de gazes umedecidas em solução fisiológica. O rim direito era inicialmente removido, após adequada ligadura de seu pedículo vascular. O rim esquerdo era então abordado. Antes da colocação do clipe metálico no pedículo, o rim era isolado com dispositivo de látex e poliestireno. Logo após o início da isquemia, a sonda para aferição de temperatura era introduzida e ligada ao termômetro intraparenquimatoso. A temperatura-alvo já havia sido determinada por sorteio antes da anestesia geral (randomização do grupo do animal). O procedimento de randomização contemplava todos os grupos. No grupo 1 (normotérmico) não havia necessidade de nenhum procedimento de resfriamento. Em todos os grupos era mantido o clipe no pedículo por 40 minutos (tempo total de isquemia). Nos grupos 2, 3 e 4 o rim era resfriado com soro fisiológico. A temperatura alvo era mantida ao longo dos 40 minutos. Após esse período, o clipe era retirado, assim como os isolantes de látex e poliestireno. A cavidade era aspirada, as gazes removidas e o abdome suturado em dois planos: muscular e cutâneo. Ao longo do procedimento, a anestesia era testada e repicada caso houvesse necessidade. Os animais eram então transferidos para uma gaiola aquecida

e com água livre. Ao cabo de 240 minutos (tempo de reperfusão), os animais eram colocados novamente em mesa cirúrgica aquecida com oxigênio (1 L/min) administrado por campânula e eram submetidos a nova anestesia com injeção intramuscular de Ketamina (75 mg/Kg) e de Xilazina (10 mg/Kg) e ainda Bupivacaína 0,5% na incisão. A incisão era reaberta e o rim esquerdo rapidamente coletado. Para garantir adequado sacrifício do animal, toda volemia era coletada e ainda era realizada cardiectomia. Os pulmões eram coletados, sendo uma amostra colocada em um Eppendorf em nitrogênio líquido (depois em freezer a -80°C) e o restante do tecido pulmonar em formol para posterior inclusão em bloco de parafina. Os pesquisadores envolvidos se preocuparam o tempo todo em evitar sofrimento dos animais, respeitando os guias internacionais de boas práticas em pesquisa com animais (*guide for the care and use of laboratory animals, National Institute of Health, Bethesda, EUA, 2011*). O projeto foi aprovado sob o número 1200-52 pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP-GPPG-HCPA). O número de animais destinados ao estudo foi calculado em 35, mas foi reduzido para 28 em virtude da modificação do protocolo inicial com a exclusão do grupo *sham*. Para a avaliação dos desfechos no tecido renal submetido a I/R (Santos EB et al., 2013), foi utilizado como grupo controle o rim direito de cada animal. Desta forma, o grupo *sham* foi considerado desnecessário na execução inicial do projeto, pois o próprio rim contralateral não submetido a I/R servia como grupo controle para a avaliação de desfechos relacionados ao tecido renal. No total foram utilizados 30 animais porque ocorreram dois óbitos

transoperatórios por choque hemorrágico. De um total de 28 animais, sete foram alocados aleatoriamente em cada um dos quatro grupos. Para o cálculo do tamanho da amostra foram usados os programas SigmaStat 9.0 e SPSS 18. A base para a construção do modelo experimental aqui descrito foi a idealizada por Grezzana-Filho e colaboradores, originalmente desenvolvido para o fígado, porém modificado e adaptado por nós para o rim e com a inclusão de tecnologia que permitiu a medição precisa da temperatura cortical renal em quatro grupos com faixas distintas de temperatura alvo (Grezzana Filho TJ et al., 2009 e 2011).

Nas figuras abaixo são demonstradas a abordagem cirúrgica utilizada e o termômetro empregado nos experimentos.

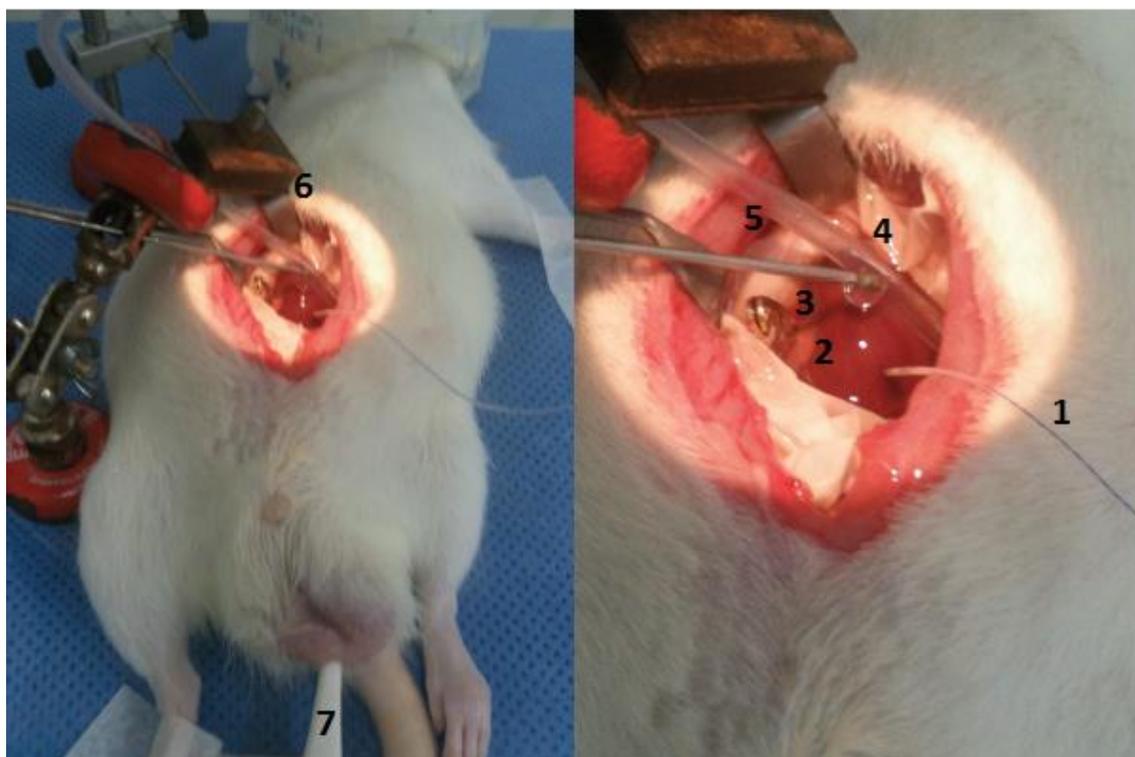


FIGURA 1: rato submetido a laparotomia com abordagem do rim esquerdo para realização do experimento. 1= termômetro intraparenquimatoso; 2= rim esquerdo; 3= clamp vascular atraumático tipo *bulldog*; 4= dispositivo para isolamento térmico constituído de látex e estireno; 5= sistema para irrigação contínua de soro fisiológico na temperatura desejada e aspiração constante do mesmo; 6= afastadores cirúrgicos; 7= termômetro retal para monitorização da temperatura sistêmica.



FIGURA 2: termômetro BAT-12 mostrando a temperatura alvo do córtex renal de animal submetido a hipotermia tóptica intensa (4°C) durante o período de isquemia renal.

TABELA 1. Análise estatística dos níveis de atividade de mieloperoxidase no tecido pulmonar.

ANOVA

Atividade de MPO/mcg de tecido

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	29,549	3	9,850	,539	,660
Within Groups	420,320	23	18,275		
Total	449,869	26			

Robust Tests of Equality of Means

Atividade de MPO/mcg de tecido

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	,305	3	10,895	,821

a. Asymptotically F distributed.

TABELA 2. Tabela das análises realizadas para aferição do nível de atividade de mieloperoxidase no tecido pulmonar. Os resultados da tabela são expressos em U/mg de tecido. No artigo, expressamos os resultados em U/ μ g de tecido a fim de trabalharmos com números inteiros.

		[] Proteínas	mg cubeta	Δ ABS	ABS/Tempo	1/mg proteínas	Act MPO	Média+DP
G1: 37°C	11	11,550	0,081	1,803	0,361	0,087	0,031224506	0,030802856
	21	15,744	0,110	2,053	0,411	0,064	0,026076649	0,005606039
	31	9,321	0,065	1,569	0,314	0,107	0,033668105	
	41	11,230	0,079	1,939	0,388	0,089	0,034534099	
	51	24,661	0,173	2,553	0,511	0,041	0,020703210	
	61	11,327	0,079	2,101	0,420	0,088	0,037097987	
	71	11,522	0,081	1,862	0,372	0,087	0,032315436	
G2: 26°C	22	7,886	0,055	1,702	0,340	0,127	0,043157942	0,033663848
	32	9,516	0,067	1,695	0,339	0,105	0,035633497	0,005131783
	42	11,564	0,081	1,782	0,356	0,086	0,030817642	
	52	8,805	0,062	1,345	0,269	0,114	0,030550302	
	62	11,773	0,082	1,729	0,346	0,085	0,029376174	
	72	10,505	0,074	1,704	0,341	0,095	0,032447527	
G3: 15°C	13	10,659	0,075	1,606	0,321	0,094	0,030127985	0,032607039
	23	11,035	0,077	1,693	0,339	0,091	0,030682268	0,001600279
	33	10,645	0,075	1,761	0,352	0,094	0,033086272	
	43	10,115	0,071	1,661	0,332	0,099	0,032843794	
	53	10,199	0,071	1,745	0,349	0,098	0,034227727	
	63	10,032	0,070	1,712	0,342	0,100	0,034123318	
	73	11,049	0,077	1,832	0,366	0,091	0,033157912	
G4: 4°C	14	16,399	0,115	2,185	0,437	0,061	0,026644619	0,032919850
	24	10,268	0,072	1,615	0,323	0,097	0,031459584	0,003757484
	34	8,290	0,058	1,523	0,305	0,121	0,036737179	
	44	11,871	0,083	1,795	0,359	0,084	0,030245120	
	54	9,126	0,064	1,581	0,316	0,110	0,034638662	
	64	9,042	0,063	1,516	0,303	0,111	0,033534485	
	74	9,586	0,067	1,782	0,356	0,104	0,037179303	

TABELA 3. Análise estatística dos níveis de TNF- α no tecido pulmonar.**ANOVA**TNF- α no tecido pulmonar (pg/ml)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1876,851	3	625,617	9,048	,000
Within Groups	1590,348	23	69,146		
Total	3467,198	26			

Robust Tests of Equality of MeansTNF- α no tecido pulmonar (pg/ml)

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	6,064	3	12,053	,009

a. Asymptotically F distributed.

Multiple Comparisons

(I) Temperatura Tópica Renal	(J) Temperatura Tópica Renal	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Normotermia (37°C)	Hipotermia Leve (26°C)	17,17700	5,92581	,104	-3,1939	37,5479
	Hipotermia Moderada(15°C)	16,25412	5,80563	,126	-4,1126	36,6208
	Hipotermia Intensa (4°C)	21,67215*	5,73718	,038	1,2713	42,0731
Hipotermia Leve (26°C)	Normotermia (37°C)	-17,17700	5,92581	,104	-37,5479	3,1939
	Hipotermia Moderada(15°C)	-,92288	2,45157	,999	-8,7759	6,9302
	Hipotermia Intensa (4°C)	4,49515	2,28476	,348	-3,0380	12,0284
Hipotermia Moderada(15°C)	Normotermia (37°C)	-16,25412	5,80563	,126	-36,6208	4,1126
	Hipotermia Leve (26°C)	,92288	2,45157	,999	-6,9302	8,7759
	Hipotermia Intensa (4°C)	5,41804	1,95198	,090	-,6656	11,5017
Hipotermia Intensa (4°C)	Normotermia (37°C)	-21,67215*	5,73718	,038	-42,0731	-1,2713
	Hipotermia Leve (26°C)	-4,49515	2,28476	,348	-12,0284	3,0380
	Hipotermia Moderada(15°C)	-5,41804	1,95198	,090	-11,5017	,6656

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

TABELA 4. Correlação entre o nível de temperatura tópica renal e a concentração pulmonar de TNF- α .

Correlations			Temperatura Tópica Renal	TNF-alfa no tecido pulmonar (pg/ml)
Spearman's rho	Temperatura Tópica Renal	Correlation Coefficient	1,000	-,712**
		Sig. (2-tailed)		,000
		N	27	27
	TNF-alfa no tecido pulmonar (pg/ml)	Correlation Coefficient	-,712**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	
		N	27	27

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

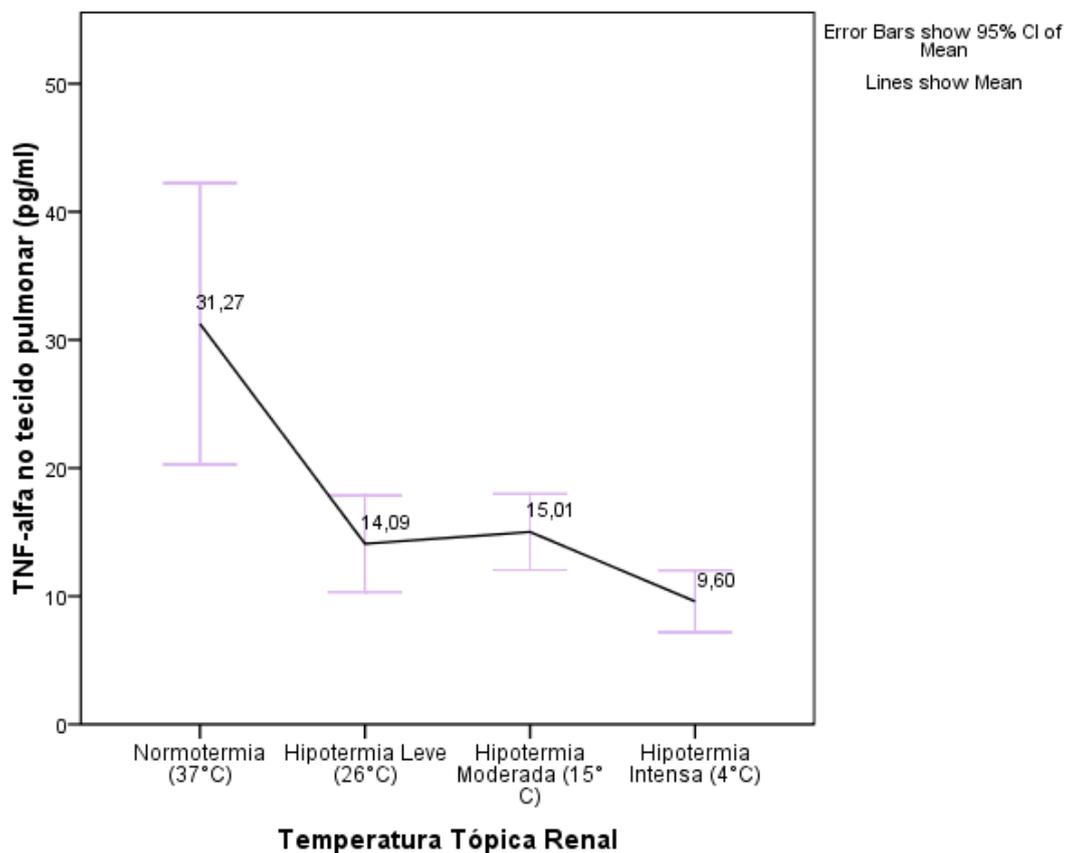


TABELA 5. Tabela das análises realizadas para aferição da concentração de TNF- α no tecido pulmonar através da técnica de ELISA.

	Ratos	Absorbância 1	Absorbância 2	Média	Concentração	TNF-a(pg/ml)
G1: 37°C	11	0,220	0,217	0,219	29,019	29,019
	21	0,229	0,222	0,226	30,689	30,689
	31	0,302	0,316	0,309	50,606	50,606
	41	0,176	0,194	0,185	21,028	21,028
	51	0,189	0,19	0,190	22,101	22,101
	61	0,153	0,153	0,153	13,395	13,395
	71	0,314	0,316	0,315	52,037	52,037
					Média	31,268
	Ratos	Absorbância 1	Absorbância 2	Média	Concentração	TNF-a(pg/ml)
G2: 26°C	22	0,150	0,149	0,150	12,560	12,560
	32	0,167	0,165	0,166	16,496	16,496
	42	0,164	0,162	0,163	15,780	15,780
	52	0,147		0,147	11,964	11,964
	62	0,186	0,182	0,184	20,790	20,790
	72	0,128	0,124	0,126	6,955	6,955
					Média	14,091
	Ratos	Absorbância 1	Absorbância 2	Média	Concentração	TNF-a(pg/ml)
G3: 15°C	13	0,173	0,166	0,170	17,331	17,331
	23	0,168	0,177	0,173	18,046	18,046
	33	0,130	0,136	0,133	8,624	8,624
	43	0,149	0,143	0,146	11,725	11,725
	53	0,149	0,150	0,150	12,560	12,560
	63	0,175	0,180	0,178	19,239	19,239
	73	0,167	0,174	0,171	17,569	17,569
					Média	15,014
	Ratos	Absorbância 1	Absorbância 2	Média	Concentração	TNF-a(pg/ml)
G4: 4°C	14	0,113	0,119	0,116	4,569	4,569
	24	0,138	0,136	0,137	9,579	9,579
	34	0,146	0,145	0,146	11,606	11,606
	44	0,130	0,142	0,136	9,340	9,340
	54	0,128	0,139	0,134	8,744	8,744
	64	0,162	0,159	0,161	15,184	15,184
	74	0,134	0,128	0,131	8,147	8,147
					Média	9,596

TABELA 6. Análise estatística dos níveis de IL-1 β no tecido pulmonar.**ANOVA**

IL-1beta no tecido pulmonar (pg/ml)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11196,796	3	3732,265	1,708	,193
Within Groups	50257,632	23	2185,114		
Total	61454,429	26			

Robust Tests of Equality of Means

IL-1beta no tecido pulmonar (pg/ml)

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	1,410	3	11,806	,289

a. Asymptotically F distributed.

TABELA 7. Tabela das análises realizadas para aferição da concentração de IL-1 β no tecido pulmonar através da técnica de ELISA.

	Ratos	Absorbância 1	Absorbância 2	Média	Concentração	IL-1
G1: 37°C	11	0,277	0,295	0,286	302,0838	302,084
	21	0,287	0,285	0,286	302,0838	302,084
	31	0,23	0,229	0,230	158,9524	158,952
	41	0,224	0,23	0,227	152,6191	152,619
	51	0,237	0,253	0,245	198,2185	198,219
	61	0,243	0,242	0,243	191,8853	191,885
	71	0,232	0,234	0,233	167,8189	167,819
					Média	210,523
	Ratos	Absorbância 1	Absorbância 2	Média	Concentração	IL-1
G2: 26°C	22	0,21	0,211	0,211	110,820	110,820
	32	0,22	0,234	0,227	152,619	152,619
	42	0,259	0,271	0,265	248,885	248,885
	52	0,229	0,203	0,216	124,753	124,753
	62	0,249	0,255	0,252	215,952	215,952
	72	0,266	0,242	0,254	221,018	221,018
					Média	179,008
	Ratos	Absorbância 1	Absorbância 2	Média	Concentração	IL-1
G3: 15°C	13	0,224		0,224	145,019	145,019
	23	0,24		0,240	185,552	185,552
	33	0,25		0,250	210,885	210,885
	43	0,237		0,237	177,952	177,952
	53	0,241		0,241	188,085	188,085
	63	0,225		0,225	147,553	147,553
	73	0,219		0,219	132,353	132,353
					Média	169,628
	Ratos	Absorbância 1	Absorbância 2	Média	Concentração	IL-1
G4: 4°C	14	0,225		0,225	147,553	147,553
	24	0,256	0,216	0,236	175,419	175,419
	34	0,225	0,221	0,223	142,486	142,486
	44	0,203	0,236	0,220	133,619	133,619
	54	0,23	0,23	0,230	160,219	160,219
	64	0,248	0,246	0,247	203,285	203,285
	74	0,214	0,223	0,219	131,086	131,086
					Média	156,238

TABELA 8. Correlação entre o nível de temperatura tóptica renal e a concentração pulmonar de IL-1 β .

Correlations			Temperatura Tópica Renal	IL-1beta no tecido pulmonar (pg/ml)
Spearman's rho	Temperatura Tópica Renal	Correlation Coefficient	1,000	-,373
		Sig. (2-tailed)		,055
		N	27	27
IL-1beta no tecido pulmonar (pg/ml)	Correlation Coefficient	Correlation Coefficient	-,373	1,000
		Sig. (2-tailed)	,055	
		N	27	27

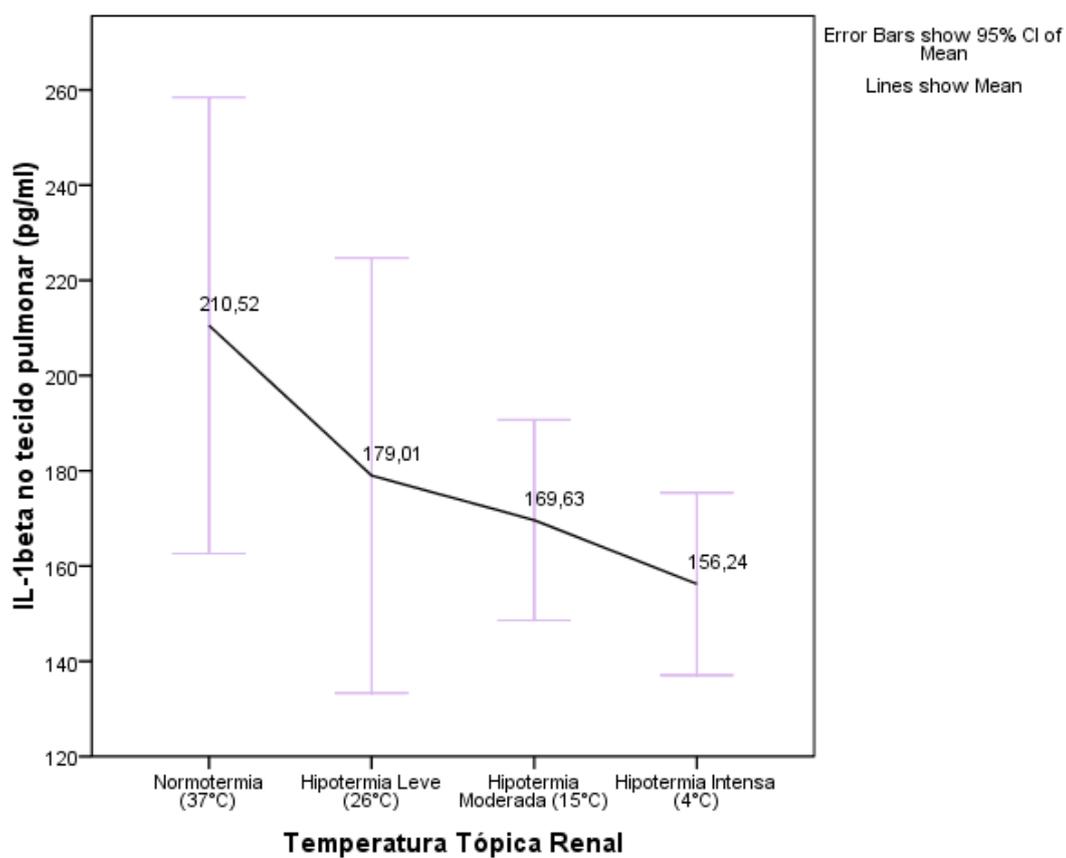


TABELA 9. Análise estatística das áreas comprometidas por alterações hemorrágicas no tecido pulmonar.

ANOVA

Percentual de áreas hemorrágicas no tecido pulmonar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13,192	3	4,397	,787	,514
Within Groups	122,978	22	5,590		
Total	136,170	25			

Robust Tests of Equality of Means

Percentual de áreas hemorrágicas no tecido pulmonar

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	,869	3	11,813	,484

a. Asymptotically F distributed.

TABELA 10. Análise individual das áreas pulmonares comprometidas por alterações hemorrágicas através do software Image Pro Plus. Para cada animal foram analisadas 6 fotos (3 fotos de áreas do parênquima expandido ou aerado; 3 fotos de áreas do parênquima não expandido ou sólido). Os resultados descritos na tabela abaixo expressam o somatório de áreas marcadas para alterações hemorrágicas em áreas sólidas e aeradas. Para a análise estatística foi comparado entre os grupos o percentual de áreas marcadas (áreas hemorrágicas) em relação à área total avaliada.

Total de pixels marcados em:	Rato 11	Rato 21	Rato 31	Rato 41	Rato 51	Rato 61	Rato 71
Σ Área sólida	1356817	1216396	1472613	1209705	1769939	1631733	608327
Σ Área aerada	265564	720812	0	866975	396965	942317	506892
Σ Área sólida + área aerada (total)	1622381	1937208	1472613	2076680	2166904	2574050	1115219
Pixels marcados em área sólida/total de pixels em área sólida	0,092015	0,082492	0,099868	0,082038	0,120032	0,110659	0,041255
Pixels marcados em área aerada/total de pixels em área aerada	0,01801	0,048883	0	0,058796	0,026921	0,063905	0,034376
Pixels marcados em área sólida+área aerada/total de pixels	0,055012	0,065688	0,049934	0,070417	0,073476	0,087282	0,037815
Porcentagem de pixels marcados em cada lâmina/rato	5,50%	6,57%	4,99%	7,04%	7,35%	8,73%	3,78%
Total de pixels marcados em:	Rato 12	Rato 22	Rato 32	Rato 42	Rato 52	Rato 62	Rato 72
Σ Área sólida		1268217	940575	700607	120029	1364402	1058558
Σ Área aerada		462270	939510	406169	105476	660766	0
Σ Área sólida + área aerada (total)	0	1730487	1880085	1106776	225505	2025168	1058558
Pixels marcados em área sólida/total de pixels em área sólida	0	0,086006	0,063787	0,047513	0,00814	0,092529	0,071788
Pixels marcados em área aerada/total de pixels em área aerada	0	0,03135	0,063715	0,027545	0,007153	0,044811	0
Pixels marcados em área sólida+área aerada/total de pixels	0	0,058678	0,063751	0,037529	0,007647	0,06867	0,035894
Porcentagem de pixels marcados em cada lâmina/rato	0,00%	5,87%	6,38%	3,75%	0,76%	6,87%	3,59%
Total de pixels marcados em:	Rato 13	Rato 23	Rato 33	Rato 43	Rato 53	Rato 63	Rato 73
Σ Área sólida	1417167	1190066	0	866560	1259020	996317	779131
Σ Área aerada	508451	810416	0	601446	956174	455194	396106
Σ Área sólida + área aerada (total)	1925618	2000482	0	1468006	2215194	1451511	1175237
Pixels marcados em área sólida/total de pixels em área sólida	0,096108	0,080707	0	0,058767	0,085383	0,067567	0,052838
Pixels marcados em área aerada/total de pixels em área aerada	0,034482	0,05496	0	0,040788	0,064845	0,03087	0,026863
Pixels marcados em área sólida+área aerada/total de pixels	0,065295	0,067833	0	0,049778	0,075114	0,049218	0,03985
Porcentagem de pixels marcados em cada lâmina/rato	6,53%	6,78%	0,00%	4,98%	7,51%	4,92%	3,99%
Total de pixels marcados em:	Rato 14	Rato 24	Rato 34	Rato 44	Rato 54	Rato 64	Rato 74
Σ Área sólida	2940783	987893	814510	1024113	889563	0	499768
Σ Área aerada	438022	494885	327697	580971	595962	79640	258214
Σ Área sólida + área aerada (total)	3378805	1482778	1142207	1605084	1485525	79640	757982
Pixels marcados em área sólida/total de pixels em área sólida	0,199435	0,066996	0,055237	0,069452	0,060327	0	0,033893
Pixels marcados em área aerada/total de pixels em área aerada	0,029705	0,033562	0,022223	0,0394	0,040416	0,005401	0,017511
Pixels marcados em área sólida+área aerada/total de pixels	0,11457	0,050279	0,03873	0,054426	0,050372	0,0027	0,025702
Porcentagem de pixels marcados em cada lâmina/rato	11,46%	5,03%	3,87%	5,44%	5,04%	0,27%	2,57%
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> Pixels por foto = 4915200 Pixels por área = 14745600 Total de pixels = 29491200 </div>							