

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

AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO EM ISQUEMIA E
REPERFUSÃO RENAL SOB VARIAÇÃO TÓPICA DE
TEMPERATURA EM MODELO ANIMAL

Emanuel Burck dos Santos
Orientador: professor doutor Carlos Otávio Corso
Coorientador: professor doutor Walter José Koff

TESE DE DOUTORADO

Porto Alegre
2012

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

AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO EM ISQUEMIA E
REPERFUSÃO RENAL SOB VARIAÇÃO TÓPICA DE
TEMPERATURA EM MODELO ANIMAL

Emanuel Burck dos Santos
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 Doutor em
Medicina: Ciências Cirúrgicas.

TESE DE DOUTORADO

Porto Alegre
2012

Pode-se facilmente perdoar uma criança que tenha medo do escuro; a real tragédia da vida é quando homens têm medo da luz.

Platão

Dedico esta Tese ao meu pai, Ubiracy Gonçalves dos Santos, homem exemplar, médico dedicado, e pai brilhante. Rendo meu amor incondicional a ele, cujo espírito está no mundo das ideias, conforme ensinado por Platão, nosso filósofo predileto.

A dedico também à minha mãe, Anália Isaura Burck dos Santos, que encheu minha vida com ternura, dedicação e amor.

Ao meu filho, Eduardo Hessel dos Santos, que me fez redescobrir o amor incondicional e infinito, e que me ensina todos os dias a arte de ser pai.

A minha esposa, Andressa Cristiane Hessel, por quase 20 anos de cumplicidade.

E ao professor doutor Walter J. Koff. Homem agregador, professor erudito, e médico exemplar. Devo a ele as conquistas mais relevantes da minha carreira como urologista. Minha gratidão ao professor Koff se estenderá por toda vida.

AGRADECIMENTOS

Uma Tese de Doutorado é um empreendimento que não é fruto de um único indivíduo. É o resultado da ação de muitas pessoas e de instituições que acreditaram em uma ideia.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador, professor doutor Carlos Otávio Corso, e ao meu coorientador, professor doutor Walter José Koff. Sem a aceitação deles para minha proposta de pesquisa, o embrião não teria se desenvolvido. Agradeço a ambos pela imprescindível e luminosa orientação. Agradeço ao professor Corso por me aceitar como seu orientando, e ao professor Koff por ter me apoiado na escolha do tema de investigação, que faz parte da linha de pesquisa do professor Corso. Ambos compreenderam que meus interesses pela exploração dos meandros relacionados à isquemia e reperfusão se devem, justamente, à minha dedicação ao transplante de órgãos e tecidos, onde se dá grande parte da minha atuação como médico do Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Ao Serviço de Urologia do HCPA, aliás, devo muitos agradecimentos. Meu reconhecimento e gratidão à Dr^a. Nancy Tamara Denicol, que foi uma de minhas mestras mais importantes, me treinou como transplantador, e hoje é minha colega de equipe. A paixão pelo transplante renal me contaminou. Não é à toa que esta Tese se vincula aos intrincados mecanismos que se relacionam ao que ocorre na intimidade dos rins submetidos à isquemia, ao resfriamento, e à reperfusão. Nancy é um exemplo de médica e de mulher. É uma profissional visceralmente dedicada ao nosso Serviço de Urologia. Agradeço também ao meu colega urologista, e também transplantador de rim,

Dr. Leonardo Infantini Dini. Grande companheiro, excepcional cirurgião, amigo, e incentivador.

Não obstante, o Serviço de Urologia do HCPA é muito mais que a equipe de Transplante Renal. Por isso estendo meus mais sinceros reconhecimentos ao doutor Cláudio Luiz Martins Lima. O Dr. Lima é um mestre, um amigo, um verdadeiro ídolo para mim. É uma grande honra poder trabalhar ao lado dele e tê-lo tido como meu orientador na monografia que escrevi, antes mesmo da minha dissertação de mestrado, para obtenção do título de especialista pela Sociedade Brasileira de Urologia. Agradeço também muito ao professor doutor Brasil Silva Neto. Brasil não é tão somente um colega, mas é, sobretudo, um amigo espetacular. Nós fomos contemporâneos na graduação em medicina pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e estamos vinculados à essa universidade desde 1991. Também fomos companheiros de residência em cirurgia geral e depois em urologia no HCPA, passando quatro dos cinco anos de residência juntos. Ele é um exemplo a ser seguido. Uma carreira acadêmica meteórica e brilhante. Um homem inteligente, visionário, lutador, cheio de personalidade e de um caráter excepcional. Visitou o laboratório para ver meus experimentos e me deu grande apoio para a realização deste trabalho. Não posso também deixar de reconhecer todo estímulo que recebi de nosso Chefe de Serviço de Urologia do HCPA, e também professor do Departamento de Cirurgia da UFRGS, professor doutor Milton Berger. O professor Berger também é um ícone para mim. Meus agradecimentos se estendem ao Dr. Bernardo da Silva Moreira, homem de cultura e inteligência superior, grande estimulador da educação médica continuada. Minha gratidão também ao professor Protásio Martins Costa Alves. Um ser humano indescritível, simples, altruísta, agregador. O Dr. Protásio é repleto de virtudes. Não

posso também deixar de agradecer ao doutor Tiago Elias Rosito. Tiago me deu um grande estímulo para realizar meu trabalho em um modelo experimental. Foi realmente um importante incentivador, e lhe sou bastante grato. Também agradeço ao Dr. Marlon Roberto Fiorentini que está seguindo com nossa linha de hipotermia renal em isquemia e reperfusão no seu curso de mestrado pela UFRGS. Agradeço ao Marlon por ter acreditado na ideia e ter colocado seu espírito investigativo, sua inteligência e energia neste projeto. Minha gratidão ao Dr. Marcelo Quintanilha Azevedo. O Marcelo foi meu sucessor em um *fellowship* que realizei, de agosto de 2006 a agosto de 2007, na *Wayne State University School of Medicine*, Detroit, Michigan, Estados Unidos. Além de me suceder na *Wayne State*, Marcelo foi muito persistente e dedicado nos ajustes que me ajudou a fazer para a publicação do artigo da minha Dissertação de Mestrado na *Applied Cancer Research*. Ouso dizer que sem a ajuda dele não teria conseguido levar a diante a publicação. Gostaria também de agradecer ao Dr. Guilherme Behrend Silva Ribeiro. Guilherme atualmente é residente do Serviço de Urologia do HCPA e certamente tem um futuro muito promissor. Ajudou-me bastante com algumas dicas de tecnologia. É um jovem médico inteligente e um apaixonado pela urologia. Outra pessoa a quem devo agradecimento é a dinâmica e eficiente secretária do Serviço de Urologia do HCPA, senhora Norma da Silva. Norma é um grande exemplo de mulher lutadora e competente.

Minha gratidão também ao Programa de Pós-Graduação (PPG) em Cirurgia da UFRGS. Obviamente foi graças ao aceite do PPG da cirurgia é que pude levar à cabo o trabalho que redundou na presente Tese. Agradeço pelo valioso estímulo do professor doutor Cleber Dario Pinto Krueel. O professor Cleber sempre me incentivou a levar adiante meus estudos nesta academia. Sou muitíssimo grato a ele. Agradeço também a

inestimável ajuda da secretária do PPG da Cirurgia desta universidade federal, senhora Estela Maris Araripe.

Meu reconhecimento ao meu colega, médico contratado do Serviço de Cirurgia do HCPA, cirurgião da equipe de transplante hepático do HCPA, doutor Tomaz de Jesus Maria Grezzana Filho. A Tese de Doutorado do Tomaz, sob a também orientação do professor doutor Carlos Otávio Corso, não apenas foi exemplo para mim como foi o que me levou a pesquisar isquemia e reperfusão, e ainda a desenvolver o modelo experimental aqui apresentado. Foi ele que me estimulou a solicitar a orientação do professor Corso, bem como a levar o projeto de doutorado adiante. O Dr. Tomaz, eu diria, é o mentor intelectual dos pródromos do projeto. É claro que a ideia inicial do Dr. Tomaz foi sendo estudada e aperfeiçoada, em conjunto com meu orientador, para se chegar ao presente trabalho. Mas ainda assim posso afirmar que o estopim foi aceso pelo Tomaz. Uma vez iniciado o trabalho, tive a felicidade de contar com a ajuda fundamental de duas acadêmicas de medicina muito interessadas, inteligentes e dedicadas. A acadêmica Samanta Daiana De Rossi sem dúvida alguma foi meu braço direito. Ela participou ativamente das etapas mais importantes do projeto, desde o desenvolvimento da técnica operatória até a análise estatística e preparo das tabelas. Samanta participou de todas as cirurgias e ainda elaborou vários pôsteres com nosso trabalho, além das planilhas que foram usadas nas análises. A outra acadêmica a quem devo agradecimento é Lisiane Treis. Lisiane me ajudou muito durante a fase de experimentação animal do estudo. Samanta, e também Lisiane, foram indispensáveis para a obtenção dos resultados que estamos aqui publicando.

A parte de cirurgia experimental do nosso estudo foi realizada no primoroso Centro de Experimentação Animal do HCPA, que contém inoxidáveis aparatos tecnológicos, amplo espaço físico e gabaritados recursos humanos. Meu agradecimento especial à enfermeira Marta Justina Giotti Cioato e à médica veterinária Fabíola Schons Meyer, pessoas que foram absolutamente imprescindíveis para que o estudo experimental se tornasse possível. Meu agradecimento se estende a toda competente equipe que compõe o Centro de Experimentação Animal do HCPA.

Além das instalações do Centro de Experimentação Animal do HCPA, pude contar com a participação ativa e vital do Laboratório de Fisiologia e Hepatologia Experimental do HCPA/UFRGS. Sem as análises realizadas por esse laboratório de excelência, não teríamos resultados para apresentar. Agradeço principalmente à professora doutora Norma Anair Possa Marroni que desde o início apoiou esse projeto e se voluntariou a ajudar no que fosse preciso para realiza-lo. A professora Norma foi quem ofereceu o suporte científico, teórico, e tecnológico para a medida dos marcadores de estresse oxidativo. Meu reconhecimento se estende obrigatoriamente à bióloga, mestre e doutoranda Silvia Regina Bona. Silvia foi a responsável direta por todas as análises. Devo a ela muito mais que um muito obrigado. Devo a ela essa publicação. Meu agradecimento a todas as pessoas do Laboratório de Fisiologia e Hepatologia Experimental do HCPA/UFRGS que auxiliaram a professora Norma e a bióloga Silvia na concretização das análises que apresento aqui.

Agradeço também ao Laboratório de Patologia do HCPA pelas análises histológicas que se constituem em um dos dados mais importantes da presente Tese. Em especial meu agradecimento às médicas patologistas Dr^a. Betina Katz e Dr^a. Karla Laís

Pêgas. Elas foram as responsáveis diretas pelos exames histológicos que estamos apresentando.

Minha gratidão e reconhecimento à estatística Vânia Naomi Hirakata, do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA. Ela foi fundamental para o tratamento estatístico de todos os resultados. Sempre se mostrou solícita e com incrível preparo e conhecimento.

Termino agradecendo ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do HCPA pelo indispensável apoio financeiro. Sem o financiamento do FIPE, que acreditou neste projeto, ele não poderia ter sido realizado. Obrigado à UFRGS, universidade pública e gratuita, por toda minha carreira. Obrigado ao HCPA por ser minha segunda casa. A UFRGS e o HCPA fazem parte da minha vida há 21 anos. Tudo que conquistei profissionalmente nessas duas décadas de formação se devem a essas exemplares instituições. Espero poder estar à altura de tão grande investimento do poder público. E, finalmente, obrigado a todas as pessoas que não citei nominalmente. Perdoem-me por minha falha por um eventual esquecimento na hora de escrever.

LISTA DE ABREVIATURAS

- I/R: isquemia e reperfusão
- CAT: catalase
- SOD: superóxido dismutase
- TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
- C₆H₁₂O₆: glicose
- NO₂: nitritos
- NO₃: nitratos
- F2IP: f2-isoprostanos
- UVC: ultravioleta C
- CO₂: dióxido de carbono
- O₂: oxigênio
- ATP: trifosfato de adenosina
- Fe²⁺: ferro iônico (II)
- Fe³⁺: ferro iônico (III)
- NAD⁺: adenina nicotinamida
- FMN: mononucleotídeo de flavina
- FAD: dinucleotídeo de flavina
- NADH: NAD reduzida
- FMNH₂: FMN reduzida
- FAD₂: FAD reduzida
- OH[•]: radical hidroxila
- H₂O₂: peróxido de hidrogênio
- Cu: cobre
- Fe: ferro
- CYP: citocromo P450
- N₂: nitrogênio
- SNC: sistema nervoso central
- H[•]: hidrogênio atômico
- O^{•-}: superóxido
- NO[•]: óxido nítrico
- O₃: ozônio
- HNO₂: ácido nitroso
- O₂NOO^{•-}: peroxinitrato
- Zn: zinco
- Mn: manganês
- RNA: ácido ribonucleico
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- Co: cobalto
- LEC (*ESWL*): litotripsia extracorpórea (*External Shock Wave Lithotripsy*)
- HCO₃⁻: bicarbonato
- RO₂[•]: radical peroxila
- RO[•]: radical alcóxila
- ROOH: peróxido de hidrogênios orgânicos
- NO₂[•]: radical dióxido de nitrogênio
- GMP cíclico: monofosfato cíclico de guanosina
- Ca²⁺: cálcio iônico
- EDRF: fator relaxante derivado do endotélio
- NOS: óxido nítrico sintetase
- eNOS: óxido nítrico sintetase endotelial
- ONOO⁻: peroxinitrito
- HOCl: ácido hipocloroso
- MPO: mieloperoxidase
- OCl⁻: hipoclorito
- Cl₂: cloro
- pH: potencial hidrogeniônico
- SOR: superóxido redutase
- CuZnSOD: superóxido dismutase ligada ao cobre ao zinco
- FeSOD: superóxido dismutase ligada ao ferro
- H₂O: água
- ADP: difosfato de adenosina
- AMP: monofosfato de adenosina
- GPx: glutathione peroxidase
- LPO: lactoperoxidase
- Se: selênio
- MDA: malondialdeído
- Na⁺/K⁺-ATPase: trifosfatase de adenosina sódio-potássio (bomba de sódio-potássio)
- NaCl: cloreto de sódio
- ATP-MgCl₂: trifosfato de adenosina cloreto de magnésio
- AST: aspartato aminotransferase
- ALT: alanina aminotransferase
- UW: universidade de Wisconsin
- HTK: histidina-triptofano-cetoglutarato
- NADPH: fosfato de dinucleotídeo adenina nicotinamida reduzida
- HE: hematoxilina e eosina
- RPM: rotações por minuto

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	4
AGRADECIMENTOS	5
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DA LITERATURA	14
LISTA DE TABELAS DOS ANEXOS	15
RESUMO E <i>ABSTRACT</i>	16
Resumo	17
<i>Abstract</i>	20
INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	22
Introdução	23
Revisão da Literatura	24
I – Mecanismos de Ação do Estresse Oxidativo	24
II – Defesas Antioxidantes	37
III – Isquemia e Reperfusão	42
IV – Hipotermia na Diminuição dos Danos por Isquemia e Reperfusão	49
V – Marcadores de Estresse Oxidativo	55
VI – Técnica Cirúrgica: Desenvolvimento do Modelo Experimental	58
Referências Bibliográficas da Revisão da Literatura	65
OBJETIVOS	72
ARTIGO EM INGLÊS (<i>PAPER</i>)	74
<i>LIST OF FIGURES OF THE PAPER</i>	92

ARTIGO EM PORTUGUÊS	95
LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO	115
ANEXOS	118

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1: mecanismos de produção de radicais livres em tecidos submetidos à isquemia e reperfusão. A figura mostra os mecanismos que levam à lesão tecidual. Também mostra a ação de duas importantes enzimas antioxidantes: a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT). Figura modificada de Bulkley, G.B. (14). (PÁGINA 44)

Figura 2: rato submetido à laparotomia. Isolamento do rim do restante da cavidade abdominal. Microsonda (*probe* parenquimatoso) inserido na córtex renal. Sistema de resfriamento com solução fisiológica e aspiração contínua. Afastadores cirúrgicos imantados fixos à mesa aquecida. Clipe metálico no pedículo vascular do rim esquerdo (isquemia fria). Termômetro retal (temperatura sistêmica). (PÁGINA 63)

Figura 3: cobertores de papel alumínio e gaze. Campânula com oxigênio a 1L/min. Rim esquerdo em isquemia e hipotermia tópica. Termômetro parenquimatoso (temperatura cortical renal) e retal (temperatura sistêmica). (PÁGINA 63)

Figura 4: termômetro intraparenquimatoso BAT-12 registrando a temperatura cortical renal esquerda de animal do grupo 4 (4°C) durante isquemia sob hipotermia. (PÁGINA 64)

Figura 5: bancada de cirurgia. Animal anestesiado momentos antes do início da cirurgia. (PÁGINA 64)

LISTA DE TABELAS DOS ANEXOS

Tabela 1: análise estatística da catalase (CAT). (PÁGINA 119)

Tabela 2: resultados da CAT de cada animal em cada grupo. (PÁGINA 120)

Tabela 3: SOD. (PÁGINA 120)

Tabela 4: $\text{NO}_3\text{-NO}_2$. (PÁGINA 120)

Tabela 5: NO_3 . (PÁGINA 120)

Tabela 6: NO_2 . (PÁGINA 121)

Tabela 7: proteína. (PÁGINA 121)

Tabela 8: TBARS. (PÁGINA 121)

Tabela 9: histologia. GR = Grupo + Rato; RD = rim direito; RE = rim esquerdo. (PÁGINA 122)

Tabela 10: tabela com valores originais de cada animal para as amostras teciduais.
(PÁGINA 123)

Tabela 11: f2-isoprostanos. Amostras: 11= animal 1 do grupo 1, e assim sucessivamente. (PÁGINA 125)

RESUMO E *ABSTRACT*

RESUMO

**Avaliação de Estresse Oxidativo em Isquemia e Reperfusão Renal sob
Variação Tópica de Temperatura em Modelo Animal**

Introdução: embora a lesão por isquemia e reperfusão (I/R) renal possa ser reduzida por resfriamento, nenhuma análise sistemática *in vivo* da influência da temperatura foi empregada até o momento para avaliar o efeito de diferentes temperaturas nos danos provocados pela I/R renal.

Objetivos: desenvolver um modelo experimental em ratos para avaliar os efeitos da variação local de temperatura (hipotermia renal tópica) nos danos, ou na prevenção destes, provocados por I/R. Além do desenvolvimento do modelo experimental, outro objetivo foi medir o efeito do estresse-oxidativo em diferentes grupos de temperatura no modelo experimental desenvolvido por nós.

Métodos: estudo randomizado com ratos Wistar, machos adultos, pesando cerca de 400g, foram randomizados para quatro grupos experimentais com 7 animais em cada grupo. No grupo 1 a temperatura renal tópica foi ambiental; no grupo 2 foi induzida hipotermia local leve (26°C) através do gotejamento de solução fisiológica resfriada até o alcance da temperatura-alvo; no grupo 3 a hipotermia tópica foi moderada (15°C); e no grupo 4 a hipotermia profunda (4°C) foi atingida através da utilização de solução fisiológica congelada (gelo). A temperatura sistêmica foi medida por termômetro retal. Já a temperatura cortical renal foi medida por termômetro com sonda intraparenquimatosa. Após anestesia geral através de injeção intraperitoneal de Ketamina (75mg/Kg) e Xilazina (10mg/Kg), os ratos foram submetidos a canulação retrorbital para obtenção de amostra de sangue antes da

laparotomia. A seguir procedeu-se com nefrectomia direita (rim controle, removido logo após a laparotomia e não submetido a I/R ou hipotermia). O rim esquerdo teve interrupção do fluxo arterial ao longo de 40 minutos (isquemia). De acordo com o grupo, o rim era ou não resfriado. O resfriamento era mantido na temperatura alvo até o término dos 40 minutos. O rim era então reperfundido e o abdome era suturado. Os animais permaneciam em gaiola aquecida com água a disposição, mas não alimentos. Após 240 minutos de reperfusão os animais eram reoperados sob nova anestesia geral. O rim esquerdo e o sangue eram coletados, e os ratos eram sacrificados. O rim direito foi considerado o grupo controle, assim como o sangue coletado antes da laparotomia. A avaliação dos desfechos incluiu a medida de catalase (CAT), de superóxido dismutase (SOD), de ácido tiobarbícúrico (TBARS), de nitritos (NO_2) e de nitratos (NO_3) teciduais, além da medida de F2-isoprostanos (F2IP) plasmáticos. Também foi realizado exame histopatológico renal em hematoxilina-eosina (HE).

Resultados: o exame histopatológico revelou que I/R (40'/240') provocou lesão renal, independentemente da temperatura cortical renal, quando comparado com o grupo controle ($P < 0,001$). TBARS, um dos produtos da peroxidação lipídica, mostrou aumento em todos os grupos submetidos a I/R, independentemente da temperatura, em relação ao grupo controle. Catalase, enzima protetora contra o estresse oxidativo, mostrou aumento no grupo I/R normotérmico (G1, 37°C) quando comparado ao grupo controle, indicando mobilização celular de mecanismos protetores intrínsecos. À medida que a temperatura era diminuída no grupo I/R, ocorreu diminuição da catalase em relação ao controle, mas sobretudo em relação ao I/R normotérmico, indicando que a hipotermia foi um mecanismo extrínseco de proteção, dispensando a mobilização da catalase. Foi detectada uma diferença

estatisticamente significativa entre o grupo I/R normotérmico (G1, 37°C) e o grupo submetido à hipotermia profunda (G4, 4°C), com um $P < 0.03$. A avaliação dos demais marcadores de desfecho não mostrou diferenças estatisticamente significativas.

Conclusões: isquemia renal de 40 minutos seguida de reperfusão por 240 minutos provocou lesão renal com alterações histopatológicas e também em um marcador de estresse oxidativo (TBARS). A avaliação da catalase (CAT) demonstrou que a hipotermia profunda (4°C) foi provavelmente protetora, embora não tenha havido tradução histopatológica dessa proteção, nesse experimento agudo (240 minutos de reperfusão pós-isquêmica).

ABSTRACT

Oxidative Stress Evaluation in Ischemia and Reperfusion in Kidneys Underwent to Variation of Local Temperature in an Animal Model

Introduction: Hypothermia has been associated with prevention against ischemia-reperfusion (I/R) damage, but there is no experimental analysis, *in vivo*, regarding the role that hypothermia plays on renal injury induced by I/R.

Objectives: The aims of this study were to design an animal model and evaluate the impact of predetermined ranges of temperatures on markers of oxidative stress and renal histologic sections.

Methods: 28 Wistar male rats, under general anesthesia, undergone laparotomy to collect the right kidney (control group in each animal). The vascular pedicle of the left kidney was clamped during 40 minutes (ischemia). Four temperatures groups were designed, with 7 animals randomized for each group: normothermic (around 37°C), mild local hypothermia (26°C), moderate local hypothermia (15°C) and deep hypothermia (4°C). The systemic body temperature was kept during the operation through the warming of the surgical table. The left kidney cortical temperature was assessed with an intra parenchymal probe connected to a thermometer. For the systemic temperature measurement it was applied a common electronic rectal thermometer. After 40 minutes of ischemia, the left kidney had the vascular clamp removed, and the abdominal wall had been closed in two layers. The animals were kept alive in an incubator for 240 minutes, so they were re-laparotomized, under new anesthesia, and the left kidney was removed. Afterwards it was performed heart puncture in order to collect blood sample for plasmatic f2-isoprostanes. Half of each kidney (right and left,

of all animals) had been kept on formalin and sent to pathological evaluation. The tissues stored on the freezer were used to analyze oxidative stress markers: catalase, SOD, TBARS, NO₃, and NO₂.

Results: Core body temperature had not differed significantly between the groups. According to the pathological evaluation, all kidneys that suffered ischemia were significantly more injured than the controls ($p < 0.001$). No injury was found on the control group (right kidney of each rat). TBARS showed quite similar findings, showing increased levels in all I/R groups compared with the control group ($P < 0.001$). Concerning the protective enzyme catalase, it was observed an increase of this enzyme on the ischemic normothermic kidney when compared to the control. As the temperature was decreasing, more the catalase was decreasing, reaching a significant statistical difference ($P < 0.03$) between the ischemic normothermic group (G1, 37°C) and the deepest hypothermic group (G4, 4°C). No difference was found on nitrites and nitrates, superoxide dismutase, or on the plasmatic isoprostanes.

Conclusion: This model was efficient in produce oxidative stress by I/R. Deep hypothermia has offered protection in this acute experiment (40 min of ischemia followed by 240 min of reperfusion).

INTRODUÇÃO
E
REVISÃO DA LITERATURA

INTRODUÇÃO

A adequada perfusão dos órgãos que compõe os diversos sistemas orgânicos é fundamental ao funcionamento normal do organismo como um todo. A isquemia leva à uma cascata de eventos que podem evoluir de disfunção até morte celular. Embora a interrupção da perfusão provoque lesão celular, a reperfusão paradoxalmente leva a um agravamento da situação. Esse fenômeno é conhecido como lesão celular induzida por isquemia-reperfusão (I/R). Os mecanismos pelos quais a I/R causa efeitos nefastos sobre a citofisiologia envolvem a produção de espécies reativas de oxigênio denominadas de radicais livres (1). Com o intuito de prevenir que o estresse oxidativo promova graves lesões com comprometimento da fisiologia do órgão acometido por I/R, várias estratégias tem sido consideradas e empregadas, tais como: hipotermia, antioxidantes, pré-condicionamento isquêmico, estabilizadores de lisossomos, soluções hipertônicas, etc. (2,3). A hipotermia, por sua vez, está relacionada a uma diminuição do metabolismo celular, com uma conseqüente menor produção de espécies reativas de oxigênio. Apesar das considerações teóricas acerca do papel desempenhado pela hipotermia nos danos decorrentes do estresse oxidativo, a temperatura com a melhor relação risco-benefício ainda não foi determinada para o rim. Não obstante, para o fígado já foi determinado que hipotermia leve é benéfica (26°C), não havendo benefício em se diminuir mais profundamente a temperatura tópica (4).

REVISÃO DA LITERATURA

I – MECANISMOS DE AÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

O oxigênio é um gás altamente reativo e tóxico. Essa toxicidade nos conduz ao conceito de “Paradoxo do Oxigênio”. Ao mesmo tempo em que esse gás é fundamental ao metabolismo aeróbico dos organismos pluricelulares, ele paradoxalmente responde pelo envelhecimento e envenenamento celular. A concentração de oxigênio na atmosfera, ao nível do mar, é de 21% (1). Contudo as condições atmosféricas terrenas nem sempre foram as mesmas. Há cerca de 2,2 bilhões de anos o oxigênio passou a aparecer em grandes quantidades no planeta em virtude da fotossíntese das cianobactérias. Elas evoluíram no sentido de reagirem com a água usando a energia solar, assim ganhando poder de redução (átomos de hidrogênio) para energizar seu metabolismo, todavia produzindo toneladas de oxigênio que eram liberados na atmosfera. Inicialmente esse oxigênio era consumido pela formação de depósitos oxidados nas rochas. O inexorável aumento do oxigênio (O_2) atmosférico levou a formação da camada de ozônio (O_3) na estratosfera. A habilidade do ozônio em filtrar a radiação solar ultravioleta intensa (UVC) que bombardeava a terra, ajudou que os organismos primitivos deixassem os oceanos e colonizassem a Terra. No entanto, o aumento dramático dos níveis de oxigênio levou a um grande estresse sobre os organismos então presentes. Quando do surgimento da vida na Terra, a atmosfera continha muito nitrogênio (N_2) e dióxido de carbono (CO_2), mas muito pouco oxigênio livre (O_2). Os microrganismos iniciais eram, portanto, anaeróbios. Esses microrganismos existem até hoje, embora seu crescimento seja inibido e frequentemente eles sejam mortos pela exposição a uma atmosfera com 21% de oxigênio. Foi então que

um importante mecanismo evolutivo surgiu, e permitiu o advento de criaturas resistentes a toxicidade desse poluente: os chamados sistemas de defesa antioxidantes. Os organismos que toleravam a toxicidade do oxigênio puderam evoluir para transformações metabólicas catalisadas pelas enzimas oxidase, oxigenase e hidroxilase, tais como a tirosina hidroxilase, o citocromo P450, e as hidroxilases prolina e lisina (necessárias à biossíntese do colágeno). Mas o melhor de tudo era que o oxigênio poderia facilitar enormemente a produção de energia, empregando cadeia de transporte de elétrons com o oxigênio como o receptor final de elétrons (5). Esse desvio para o metabolismo aeróbio aumentou em quinze vezes a produção de trifosfato de adenosina (ATP) que poderia ser sintetizada a partir das moléculas de alimentos, tais como a glicose ($C_6H_{12}O_6$). A mitocôndria produz mais de 80% do ATP necessário para a maioria das células animais. Essa evolução para uma produção eficiente de energia permitiu o desenvolvimento de organismos pluricelulares complexos, que passaram a necessitar de um sistema de distribuição de oxigênio ao organismo que assegurasse que o oxigênio chegasse a todas as células, agora dependentes desse gás para a produção de energia. Assim, grande parte das células não fica exposta diretamente ao oxigênio atmosférico, dependendo do sistema respiratório e circulatório para sua captação e suprimento. Outrossim, como os organismos pluricelulares foram ficando cada vez maiores e mais complexos, ocorreu a necessidade de suporte estrutural. Esse suporte foi levado a cabo pelo tecido conjuntivo (frouxo, denso, adiposo, cartilaginoso, ósseo). Sendo a síntese de colágeno um processo que requer obrigatoriamente a presença de oxigênio, esse aumento da oferta desse gás veio a calhar, considerando que o colágeno é a mais abundante proteína do tecido conjuntivo, incluindo o ósseo (1).

Complexos organismos pluricelulares, como os mamíferos, desenvolveram mecanismo de transporte de oxigênio para os tecidos. Um pouco de oxigênio é transportado dissolvido no plasma, mas a solubilidade do oxigênio em água a 37°C é limitada. Por isso a maior parte do oxigênio é transportada por uma proteína carregadora: a hemoglobina. Essa proteína é uma globulina com quatro subunidades: duas cadeias α e duas β . Cada cadeia carrega um grupo heme contendo ferro (Fe^{2+}). O oxigênio reversivelmente se liga ao ferro no estado ferroso (Fe^{2+}), sendo a ligação dependente da concentração do gás. Nos pulmões a concentração de oxigênio é alta, então ocorre ligação. A dissociação ocorre nos demais tecidos pelo mesmo mecanismo (gradiente de concentração de O_2). O músculo estriado cardíaco e o músculo estriado esquelético contêm mioglobina. Essa molécula é uma cadeia peptídica simples que apresenta apenas um grupo heme. A mioglobina ajuda a estocar oxigênio nesses tecidos, se ligando mais fortemente ao oxigênio, só se dissociando quando a concentração do gás está em níveis muito baixos e provavelmente críticos. De modo semelhante existe a neuroglobina no cérebro (1).

As mitocôndrias são a maior fonte de ATP das células, e usam 80% do oxigênio que nós respiramos. As moléculas dos alimentos são oxidadas, perdendo elétrons que são capturados pelos carregadores de elétrons. Os carregadores de elétrons mais importantes são os dinucleótidos de adenina nicotinamida (NAD^+) e as flavinas (mononucleótidos de flavina – FMN – e os dinucleótidos de adenina flavina – FAD). Os NADs reduzidos (NADH) e as flavinas reduzidas (FMNH_2 e FADH_2) são reoxidadas pelo oxigênio mitocondrial, produzindo assim grande quantidade de ATP (1,5). Essa oxidação é catalisada em vários passos a fim de liberar energia gradualmente. Isso é alcançado graças à cadeia de transporte de elétrons na membrana mitocondrial interna.

Elétrons passam do NADH para proteínas férricas não-heme, que aceitam elétrons pela conversão do seu ferro (Fe_{III}) a Fe^{2+} . Mais adiante na cadeia os citocromos trabalham da mesma forma, exceto pelo fato que seu ferro está presente no grupo heme. A parte da cadeia transportadora de elétrons que usa oxigênio é a enzima oxidase terminal: a citocromo oxidase. A citocromo oxidase dos mamíferos tem alta afinidade por O_2 , funcionando mesmo quando os níveis de oxigênio estão menores que 1 mmHg (1). O sequestro de espécies parcialmente reduzidas pela citocromo oxidase, adicionada a operacionalidade das células com baixos níveis intracelulares de pO_2 , são mecanismos de defesa antioxidantes. Ademais, as mitocôndrias são a maior fonte de calor do organismo, ajudando a manter a temperatura corporal. Como 80 a 90% do oxigênio são consumidos pelas mitocôndrias através de reação tetravalente, com aceitação de quatro elétrons e formação de água, apenas 10% a 20% são metabolizadas por oxigenases, oxidases ou mesmo por oxidação direta (1,5,6). Relembrando que na mitocôndria a enzima catalisadora é o citocromo oxidase, que na parte terminal da cadeia transportadora de elétrons, oxida quatro moléculas de citocromo *c*, removendo um elétron de cada um deles. Esses elétrons são adicionados ao oxigênio para formar água. Portanto, a ação da citocromo oxidase evita a formação excessiva de radicais livres, porém 2% a 5% são reduzidos de forma univalente fora da mitocôndria, gerando radicais livres (6). A redução univalente do oxigênio (O_2) forma o radical superóxido (O_2^{\cdot}) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}), e ainda a espécie altamente reativa de oxigênio (espécie reativa não-radical) peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Desse processo, além de enzimas catalisadoras, participam os metais de transição cobre (Cu) e ferro (Fe). O peróxido de hidrogênio não é um radical, mas forma facilmente um radical livre altamente reativo: a hidroxila. O peróxido de hidrogênio tem alto potencial de dano por ter uma meia-vida longa, e ainda por atravessar com facilidade as membranas lipídicas.

A toxicidade do peróxido de hidrogênio é aumentada pela presença do ferro (7). Embora sejam os radicais livres que provoquem dano direto às moléculas, as espécies reativas não-radicaais têm sua toxicidade ligada à produção desses radicais, levando ao estresse oxidativo. Já os íons ferro e cobre são muito ativos em termos de reações oxi-redutivas, que os qualificam como grandes promotores da formação de radicais livres (1,6,7).

A maior parte do oxigênio das células eucarióticas aeróbicas que não é usada pelas mitocôndrias é consumida pelas enzimas oxidase e oxigenase. Por exemplo: as xantinas e hipoxantinas são oxidadas a ácido úrico pela xantina oxidase. Durante a síntese de colágeno, a prolina e lisina hidroxilases usam oxigênio para adicionar grupo hidroxila (-OH) nos resíduos de prolina e lisina. A síntese dos hormônios epinefrina e norepinefrina inicia com a adição de um grupo -OH ao aminoácido tirosina através da enzima tirosina hidroxilase, dependente de oxigênio. Em geral as oxidases e as oxigenases têm menor afinidade pelo oxigênio que a citocromo oxidase. Principalmente o retículo endoplasmático contém citocromos conhecidos em conjunto como P450. Mais de 500 genes codificam a superfamília do citocromo P450 (CYP). O citocromo P450 está envolvido no metabolismo de diversas drogas, do ácido aracdônico, dos eicosanoides, do colesterol, da vitamina D3 e do ácido retinoico. Os citocromos P450 catalisam a oxidação de substratos pela molécula de oxigênio (O_2). Um átomo de oxigênio (O) entra no substrato e outro forma água, numa reação conhecida como monoxigenase. Os citocromos são proteínas heme contendo uma simples cadeia peptídica com quatro ligações com o ferro pelo grupo heme e uma quinta como ânion tiolato de um resíduo de cisteína. Do ponto de vista funcional percebemos que o oxigênio é fundamental para as reações químicas acima. Porém, como vimos antes, o oxigênio também é paradoxalmente tóxico (1).

Toxicidade do oxigênio em mamíferos: a toxicidade do oxigênio em humanos se relaciona com mergulho, natação subaquática, cuidados com prematuros, suprimento gasoso em naves espaciais e em submarinos, uso de câmaras hiperbáricas, infecções por anaeróbios, e na reperfusão após isquemia (objeto de estudo desta tese). Por exemplo, em mergulhadores a rápida subida até a superfície da água leva a formação de bolhas gasosas de N_2 que impedem a circulação (embolia). Oxigênio em alta pressão força os gases de volta a solução e substituem N_2 por O_2 , sendo a pressão gradualmente diminuída. Oxigênio em alta pressão pode causar toxicidade aguda no Sistema Nervoso Central (SNC) levando a convulsões, também podendo lesar os pulmões e a retina (exemplo: retinopatia da prematuridade por uso de O_2 puro). Os fatores que afetam a toxicidade do oxigênio em humanos variam em função da idade, estado fisiológico e dieta. Diferentes tecidos, ou mesmo diferentes células em um único tecido, podem ser afetadas diferentemente (8–10). Mas o que causa os efeitos tóxicos do oxigênio? As respostas para essa pergunta se relacionam tanto a um efeito direto do oxigênio como inibidor de certas enzimas essenciais como também através de um importante efeito tóxico indireto pela formação de radicais livres altamente reativos. Os radicais livres de oxigênio e seus efeitos (estresse oxidativo) serão abordados mais detalhadamente nos parágrafos seguintes.

Radicais livres de oxigênio: um radical livre é qualquer espécie capaz de existência independente e que contém um ou mais elétrons desemparelhados. O mais simples radical livre da natureza é o hidrogênio atômico (H^\cdot), porque o átomo de hidrogênio tem apenas um elétron, e esse está, portando, desemparelhado por ser único. Já o elemento hidrogênio (H^+) não é um radical livre, pois não tem elétrons (contém

apenas um próton). Os radicais livres podem ser ou não iônicos. O exemplo do hidrogênio mostra que um radical livre não-iônico (a forma iônica do hidrogênio, o cátion H^+ , não é considerada um radical livre) (1).

Os radicais de oxigênio, e outros tipos de espécies reativas, são alguns tipos de radicais livres. Cabe aqui uma definição, portanto, dos seguintes termos: radicais livres (de oxigênio e outras), espécies reativas (de oxigênio e outras), estresse oxidativo, e íons radicais e não-radicais.

Radical livre: são espécies reativas com elétrons desemparelhados. Todos os radicais livres de oxigênio são espécies reativas de oxigênio, mas nem todas as espécies reativas de oxigênio são radicais livres. Existem também radicais livres que não são de oxigênio, tais como os de cloro, de bromo e de nitrogênio. Espécies reativas: incluem radicais livres e não-radicais que são agentes oxidantes, ou ainda que facilmente sejam convertidos a radicais. Também existem espécies reativas não-radicais de oxigênio, de cloro, de bromo e de nitrogênio. Exemplos:

- Espécie reativa de oxigênio do tipo radical livre: superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxila (OH^{\bullet}).
- Espécie reativa de nitrogênio do tipo radical livre: óxido nítrico (NO^{\bullet}) e nitrato (NO_3^{\bullet}).
- Espécie reativa de oxigênio não-radical livre: peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ozônio (O_3).
- Espécie reativa de nitrogênio não-radical livre: ácido nitroso (HNO_2) e peroxinitrato (O_2NOO^{\bullet}).

Estresse oxidativo: é o desequilíbrio entre a produção de compostos oxidantes e os sistemas de defesa antioxidante (11). O principal gerador de radicais livres é a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Mais adiante iremos abordar os sistemas de defesa antioxidante enzimáticos e não-enzimáticos. Íons: são átomos ou moléculas que perdem ou ganham elétrons, conferindo carga negativa (ânions) ou positiva (cátions). Os radicais livres podem ser ou não ser iônicos. O conceito de radical livre se deve ao emparelhamento de elétrons, e não a falta ou excesso deles.

Termodinâmica e cinética relacionada aos radicais livres: segundo as leis termodinâmicas, as reações químicas só são possíveis quando a troca de energia livre é negativa. Se a reação for possível a questão passa a ser com que velocidade ela ocorre. Esse é o campo da cinética. Uma reação termodinamicamente possível pode ser muito lenta, ou mesmo não ocorrer. Portanto, enzimas catalisadoras somente podem acelerar reações termodinamicamente possíveis. Aplicação da termodinâmica em organismos vivos é carregada de dificuldades porque os valores numéricos dos parâmetros termodinâmicos frequentemente se referem a condições inapropriadas para organismos vivos. Além do mais as reações bioquímicas são muito inter-relacionadas, sendo que uma reação aparentemente impossível pode acontecer com o amparo de outra. Um parâmetro frequentemente usado para o entendimento da química das espécies reativas é o potencial de redução (potencial redutivo), uma quantidade termodinâmica que determina a factibilidade e a direção das reações de oxidação e redução. A taxa de uma reação termodinamicamente possível depende da temperatura, da energia de ativação e da concentração dos reagentes. Muitas reações são extremamente rápidas, não sendo possível determinar o radical livre diretamente. Essa alta reatividade muitas vezes não permite a detecção direta de uma espécie reativa, sendo necessária, do ponto de vista

prático e operacional, a detecção de marcadores indiretos de que a reação ocorreu. Por isso em muitos estudos sobre o estresse oxidativo, os marcadores de desfecho não são os radicais livres, mas sim enzimas que catalisam as reações ou mesmo a detecção de alguns metabólitos. Muitos dos metais de transição (ferro, cobre, zinco, vanádio, cromo, manganês, cobalto, níquel, tungstênio, molibdênio) contêm elétrons desemparelhados nos seus átomos e íons que os qualificam como radicais livres. Uma notável exceção é o zinco. Os metais de transição, de um modo geral, têm a propriedade de aceitar ou doar elétrons. Uma simples transferência de elétron pode interferir na reação do oxigênio com não-radicais. O perigo está na possibilidade desses metais catalisarem reações indesejáveis com a formação de espécies reativas como o radical hidroxila (OH^{\cdot}) levando a uma reação em cadeia (1,7). Não obstante, alguns dos metais de transição supracitados são biologicamente importantes, e nem sempre a reatividade deles é deletéria. Por exemplo, o cobre é essencial em enzimas como a citocromo oxidase e lisina oxidase. A maior parte do cobre (Cu) está concentrada no fígado e no cérebro. O zinco (Zn) pode atuar como antioxidante. É encontrado, por exemplo, na RNA-polimerase e na anidrase carbônica. Quando em excesso é neurotóxico (12). Já o manganês (Mn) é um ativador de várias hidroxilases e carboxilases. Em excesso é neurotóxico (13). O ferro (Fe) é o metal de transição mais abundante no corpo humano. Sua falta causa anemia (ferropriva). Além da hemoglobina, substâncias como a mioglobina, cicloxigenases, citocromos, catalase necessitam do ferro. O excesso está relacionado a ocorrência de estresse oxidativo. O cobalto (Co) é essencial na vitamina B12, mas o excesso causa dano no ácido desoxirribonucléico (DNA) (1).

No estudo das reações dos metais de transição que levam a formação de radicais livres, é importante compreender a Reação de Fenton. Nessa reação os metais se

combinam com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para formar o radical hidroxila (OH^\bullet). É assim que o ferro, por exemplo, ao se combinar com a espécie reativa peróxido de hidrogênio, produz o radical livre, altamente reativo, hidroxila. A reação de Fenton é termodinamicamente favorável e ocorre a todo instante (1,14).

Além do radical hidroxila, outros importantes radicais biologicamente ativos são o radical carbonato, o radical superóxido, o radical peroxila, o radical alcoxila, os radicais de enxofre, e o óxido nítrico. O radical hidroxila, como visto antes, é altamente reativo (OH^\bullet). Pode ser gerado a partir da reação de metais de transição com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Pode ser gerado naturalmente na pele por exposição solar, ou mesmo em laboratório a partir do uso de radiação ultravioleta (de baixo comprimento de onda), radiação ionizante e mesmo litotripsia extracorpórea por ondas de choque quando se usa pulsos rápidos. Sonificação de lipídios na preparação de lipossomos em estudos de peroxidação lipídica também gera radicais hidroxila. Os radicais carbonatos são formados quando o radical hidroxila reage com carbonato ou com íon bicarbonato (HCO_3^-). O radical carbonato, por sua vez, pode oxidar várias biomoléculas (exemplo: ácido hialurônico). Já o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) é muito menos reativo que o radical hidroxila, e não reage com a maior parte das moléculas biologicamente ativas em solução aquosa. Entretanto, o superóxido pode reagir rapidamente com outros radicais como o óxido nítrico (NO^\bullet). O superóxido também pode acelerar a produção de radical hidroxila pela reação de Fenton. O radical peroxila (RO_2^\bullet) pode subtrair o radical hidrogênio (H^\bullet) de outras moléculas, uma reação de fato importante na peroxidação lipídica. Quando a glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) reage com o radical hidroxila, seis diferentes radicais peroxila são formados, porque há seis carbonos na molécula de glicose, permitindo a subtração do radical hidrogênio de cada um deles. Outro radical é a

alcoxila (RO^{\bullet}) que, assim como a peroxila, pode ser produto gerado na decomposição de peróxido de hidrogênios orgânicos (ROOH). Os radicais sulfúricos como os tiois (glutationa) podem ter um efeito antioxidante no cérebro. O óxido nítrico (monóxido de nitrogênio) é um radical livre (NO^{\bullet}) que reage com oxigênio (O_2) do ar para formar dióxido de nitrogênio (NO_2^{\bullet}), que é um radical livre muito mais reagente que o monóxido de nitrogênio que o originou. Porém o óxido nítrico, em solução aquosa, produz principalmente nitrito (NO_2^-). Na verdade o NO^{\bullet} atua como um varredor de radicais livres (*free radical scavenger*) por reagir facilmente com o radical hidroxila (OH^{\bullet}) para formar um não-radical ácido nitroso (HNO_2). A habilidade do óxido nítrico em reagir rapidamente com outros radicais livres pode ser mais protetora que danosa. Uma importante reação que ocorre nesse sentido é a do óxido nítrico com a peroxila (RO_2^{\bullet}), fazendo do óxido nítrico (NO^{\bullet}) um importante inibidor da peroxidação lipídica, tendo um papel antiaterosclerótico. Além do mais, o NO^{\bullet} diminui as propriedades pró-oxidantes das proteínas “heme” na presença de peróxido de hidrogênios, extinguindo tanto “heme” quanto radicais aminoácidos. O NO^{\bullet} produzido pelas células endoteliais forma GMP cíclico (monofosfato cíclico de guanosina) que por sua vez diminui o cálcio intracelular livre (Ca^{2+}), relaxando o músculo liso do vaso e diminuindo a pressão arterial (1). Em suma: o óxido nítrico é um importante protetor vascular por diminuir o dano endotelial relacionado à peroxidação lipídica e à hipertensão arterial. Contudo o excesso de óxido nítrico pode ser prejudicial, assim como é a carência. O excesso está implicado com a ocorrência de epilepsia, acidentes vasculares encefálicos, aumento do risco de câncer, choque séptico, rejeição de transplantes (15). Os nitritos (NO_2^-) e os nitratos (NO_3^-) são produtos finais do metabolismo do óxido nítrico. O problema é que os nitritos podem reagir com aminas secundárias no estômago gerando nitrosaminas que são carcinógenos em potencial. Nitritos e nitratos são usados para preservação de carnes

(salsicha, bacon, etc.). O nome original do óxido nítrico era “fator relaxante derivado do endotélio” (EDRF, *endothelium-derived relaxing factor*) (16). A maior parte do óxido nítrico é formada pelas enzimas NOS (óxido nítrico sintetase) que convertem a L-arginina em óxido nítrico. Para que a reação ocorra há participação de co-fatores como o FAD (dinucleótido de flavina-adenina), o FMN (mononucleótido de flavina), entre outros. NOS endotelial (eNOS, NOS3) é expresso no endotélio e sintetiza o óxido nítrico necessário para a regulação da pressão arterial (17).

No parágrafo acima abordei radicais livres de importância biológica. Entretanto há espécies reativas **não-radicaís** também fisiologicamente relevantes: peroxinitrito, peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso, *singlet* oxigênio, e ozônio. O peroxinitrito (oxoperoxonitrato, ONOO⁻) pode ser formado a partir de NO⁻ e O₂, ou através de NO[•] e O₂^{•-}. A hemoglobina é rapidamente oxidada à metaemoglobina pelo peroxinitrito (ONOO⁻). Apesar disso o peroxinitrito é pouco reativo, oxidando na verdade poucas moléculas. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é tóxico e está envolvido com senescência e apoptose, mas dependendo da concentração pode suprimir apoptose e promover proliferação celular. O peróxido de hidrogênio tem importantes propriedades antibacterianas. Várias substâncias geram peróxido de hidrogênio: xantinas, uratos, coproporfirinogênio III, glicose, monoaminoxidases ácidas, bem como a superóxido dismutase (SOD). As mitocôndrias contribuem muito com a produção de peróxido de hidrogênio. O ácido hipocloroso (HOCl) é produzido pela enzima mieloperoxidase (MPO). A ionização do HOCl leva a formação de hipoclorito (OCl⁻) que libera cloro (Cl₂) gasoso em uma reação com pH baixo. O Cl₂ é um bactericida importante (água sanitária é uma solução de hipoclorito). Por isso mesmo é também altamente reativo e causador de danos em biomoléculas. Pode inclusive inibir a síntese de ATP (trifosfato

de adenosina) por interferir na cadeia transportadora de elétrons e na ATP-sintetase. O *singlet* oxigênio (singleto) está associado a danos por fotossensibilização. As porfirias são causadas por defeitos na síntese do heme. Em alguns tipos de porfirias cutâneas, há acúmulo de porfirinas na pele. A exposição à luz solar provoca então erupções cutâneas. O ozônio (O_3) é pouco solúvel em água. Excesso de ozônio pode levar a danos pulmonares por induzir inflamação e ativação de macrófagos pulmonares. O ozônio é fundamentalmente uma toxina exógena (1).

Em síntese se pode dizer que o radical mais reativo e com maior potencial deletério é a hidroxila. Esse radical é extremamente instável (vida média de 10^{-9} segundos) e de difícil detecção (18). É o principal iniciador da peroxidação lipídica, alterando as membranas celulares, reagindo com proteínas e capaz de provocar mutações no DNA (1,5,6,18). O radical hidroxila é facilmente formado a partir do peróxido de hidrogênio, que é uma espécie reativa não-radical muito estável, capaz de cruzar membranas. A toxicidade do peróxido de hidrogênio se relaciona a sua capacidade de formar radical hidroxila. Por isso, como veremos adiante, é muito importante a neutralização do peróxido de hidrogênio a partir dos sistemas de defesa antioxidante (catalase). Especificamente no caso de isquemia e reperfusão como causa de estresse oxidativo, o peróxido de hidrogênio é formado através do superóxido. O superóxido é o produto da reação do excesso de hipoxantina, resultante da isquemia, com o excesso de oxigênio, resultante da reperfusão. A isquemia leva ao acúmulo de hipoxantina a partir da degradação em cascata desde o ATP (mais detalhes nos mecanismos antioxidantes). Com a reperfusão a hipoxantina reage com o oxigênio (reação catalisada pela xantina oxidase) para formar xantina e o radical superóxido. O superóxido é um radical livre que pode provocar dano diretamente, ou indiretamente

pela formação do radical hidroxila a partir do peróxido de hidrogênio (19). O peróxido de hidrogênio formado a partir do superóxido forma facilmente o radical hidroxila. Os mecanismos de defesa antioxidantes objetivam diminuir a produção de radicais livres, sobretudo o radical hidroxila, a partir de sistemas que veremos a seguir.

II – DEFESAS ANTIOXIDANTES

Como o oxigênio é venenoso, os organismos aeróbios só conseguem sobreviver na sua presença por terem desenvolvidos defesas antioxidantes. Os antioxidantes podem ser produzidos internamente (endógenos) ou adquiridos da dieta (exógenos). Também são necessárias defesas contra espécies reativas de nitrogênio (como o peroxinitrito) e contra as espécies reativas de cloro (como o ácido hipocloroso). O mais simples mecanismo de defesa é evitar superexposição ao oxigênio. Obviamente isso não é o bastante para complexos organismos aeróbios como os mamíferos. Os principais mecanismos antioxidantes são:

1. Agentes que cataliticamente removem as espécies reativas. Exemplos: superóxido dismutase (SOD), superóxido redutase (SOR), catalase (CAT) e enzimas peroxidases.
2. Agentes que diminuem a formação de espécies reativas. Exemplos: proteínas que reduzem a disponibilidade de pró-oxidantes tais como o ferro, o cobre, e o “heme”. Entre essas proteínas estão as transferrinas, a albumina, a haptoglobina, a hemopexina, heme oxigenases, e as metalotioneínas.
3. Proteínas que protegem biomoléculas contra dano oxidativo por outros mecanismos, como as chaperonas.

4. A extinção física das espécies reativas. Exemplo: extinção do singlete oxigênio pelos carotenóides.
5. Troca de moléculas sensíveis ao dano oxidativo por moléculas resistentes a isso. Exemplo: fumarase C da *E. coli*.
6. Agentes de sacrifício que são oxidados por espécies reativas para preservar biomoléculas de maior importância. Exemplos: tocoferol, bilirrubina, ascorbato, urato, albumina.

As defesas antioxidantes podem aumentar na presença de citocinas. As defesas antioxidantes não são 100% efetivas, já que dano oxidativo ao DNA, a proteínas, a lipídios, e a outras moléculas podem ser demonstradas em organismos vivos em O₂ ambiente. Antioxidante é qualquer substância que significativamente retarde ou impeça a oxidação de um substrato oxidável (11,20).

PRINCIPAIS ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE:

A) SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD): a descoberta da SOD trouxe as bases para o entendimento das defesas antioxidantes, bem como levou ao surgimento da teoria da toxicidade pelo oxigênio, e ainda pela compreensão que os radicais livres são importantes produtos do metabolismo. Os eritrócitos são capazes de remover o radical superóxido (O₂^{•-}) cataliticamente através da enzima SOD contendo cobre e zinco (CuZnSOD). Outra SOD importante contém manganês (Mn) e é designada por MnSOD. Catalisa essencialmente o mesmo tipo de reação que a CuZnSOD. Em células animais encontramos a MnSOD nas mitocôndrias. Há ainda as SODs contendo ferro, designadas por FeSOD.

Entretanto as células animais não contêm FeSOD. Essa enzima ocorre em bactérias, como a *Escherichia coli*. A SOD é usada como ferramenta para estabelecer o envolvimento do superóxido em processos biológicos (1,5,6).

B) SUPERÓXIDO REDUTASE (SOR): importantes em organismos anaeróbios e em bactérias microaerofílicas como o *Treponema pallidum*. Não entrarei em detalhes a cerca do papel dessa enzima, pois ela não tem maior importância no entendimento dos mecanismos antioxidantes em mamíferos (21).

C) CATALASES (CAT): as catalases catalisam diretamente a reação que transforma o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Sequencialmente na rota das xantinas, a SOD vem antes, pois catalisa a reação que transforma o superóxido em peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio então é inativado pela catalase, como segue:



A isquemia provoca inicialmente uma depleção energética pela falta de oxigênio para captação de elétrons. Quando sobrevém a perfusão, grande quantidade de oxigênio se torna disponível. A fim de minimizar o dano pela toxicidade do oxigênio, os sistemas de defesa antioxidantes são ativados. Assim, a catalase passa a ter uma atividade aumentada, a menos que algum outro fator protetor concorra. Em órgãos submetidos à isquemia e reperusão é esperado um aumento da catalase, mas se houver outro fator protetor que diminua o metabolismo, como a hipotermia, poderá não haver aumento da enzima em decorrência de uma diminuição na produção de superóxido a partir da rota das xantinas. A catalase aumenta quando houver excesso de peróxido de hidrogênio.

O excesso de peróxido de hidrogênio é resultante de uma atividade aumentada da SOD devido ao excesso de hipoxantinas decorrente da depleção de ATP provocada pela isquemia. A isquemia leva a formação de hipoxantinas a partir da inosina, que por sua vez são produzidas pelo deslocamento estequiométrico na seguinte sequência: $ATP \rightarrow ADP \rightarrow AMP \rightarrow$ adenosina \rightarrow inosina \rightarrow hipoxantina. Então na reperfusão o excesso de hipoxantina reage com o excesso de oxigênio para formar xantina e superóxido, em uma reação catalisada pela xantina oxidase. O superóxido é então transformado em peróxido de hidrogênio pela SOD, mas o peróxido de hidrogênio, embora não seja um radical livre como o superóxido, ainda assim é uma espécie reativa de oxigênio e facilmente forma o radical hidroxila. Então a catalase entra em cena catalisando a reação que transmuta o peróxido de hidrogênio em água. Resumidamente pode-se dizer que a falta de oxigênio, provocada pela isquemia, aumenta a degradação da reserva de ATP até a formação de hipoxantina. Então ocorre a reperfusão e o oxigênio reage com a hipoxantina formando o radical livre superóxido. Entram em ação os mecanismos antioxidantes sequenciais compostos pela SOD (transformando superóxido em peróxido de hidrogênio) e então a catalase, transformando o peróxido de hidrogênio em água. O sistema catalase não é apenas importante na defesa contra a geração de radicais livres a partir de isquemia e reperfusão, mas também como sistema de defesa contra espécies reativas formadas a partir dos metais de transição (reação de Fenton) (1,6).

D) GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx): remove o peróxido de hidrogênio o reduzindo a água. É uma enzima amplamente distribuída em tecidos animais. Assim como a catalase (CAT) a GPx tem importante papel na eliminação do peróxido de hidrogênio. Como não há um sistema enzimático de defesa voltado

diretamente para o radical hidroxila, a CAT e a GPx são fundamentais por impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio, que é o principal precursor do radical hidroxila. Como visto anteriormente, o radical hidroxila é o mais reativo dos radicais livres. A grande toxicidade do radical hidroxila confere toxicidade à espécie reativa que o forma diretamente e facilmente: o peróxido de hidrogênio. Por isso a glutathione peroxidase é uma importante enzima do sistema de defesa antioxidante. Existem pelo menos quatro enzimas na família GPx. O selênio (Se) está presente no sítio ativo das GPx1, 2 e 3. Por isso traços de selênio são fundamentais na dieta animal (1,6).

E) OUTRAS PEROXIDASES: outras peroxidases contribuem com o sistema antioxidante por prevenirem o acúmulo de peróxido de hidrogênio. Exemplos devem incluir o citocromo *c* peroxidase, o NADH oxidase, e as peroxidases inespecíficas como as mieloperoxidases (MPO) e as lactoperoxidases (LPO) (1).

Além dos mecanismos antioxidantes expostos acima, existem outros que conferem proteção antioxidante que se relacionam a agentes de baixo peso molecular. São compostos derivados da dieta. Destacam-se o β -caroteno (vitamina A), o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E), o cobre (Cu), o zinco (Zn), o manganês (Mn), o selênio (Se), outros carotenóides (licopeno), ácidos fenólicos (1,22). Não entrarei em detalhes acerca dos fatores antioxidantes não enzimáticos acima referidos, pois embora digam respeito à proteção contra o estresse oxidativo, não se aplicam ao caso específico do experimento com isquemia e reperfusão como produtor de excesso de radicais livres e de outras espécies reativas. A seguir passarei a tratar dos aspectos relacionados a isquemia e a reperfusão como causa de estresse oxidativo, bem

como do conceito de peroxidação lipídica como mecanismo de estresse oxidativo, dos marcadores da produção de radicais livres (marcadores de estresse oxidativo), do papel da hipotermia na diminuição do metabolismo, do papel da diminuição do metabolismo na proteção contra a formação de espécies reativas, e no papel protetor da hipotermia a prevenção da produção de radicais livres. Os próximos tópicos serão abordados na seguinte sequência: mecanismos pelos quais a isquemia e a reperfusão geram radicais livres a partir da peroxidação lipídica e de outros mecanismos, papel da hipotermia no metabolismo, e estudos relacionando hipotermia como mecanismo antioxidante. Logo a seguir farei uma análise dos marcadores de desfecho escolhidos para essa tese: TBARS como indicador de peroxidação lipídica e estresse oxidativo (e de sua relação com o malondialdeído - MDA), F2-isoprostanos (F2IP), nitritos, nitratos, SOD, CAT, e alterações histopatológicas. Finalmente abordarei as bases teóricas do modelo experimental que desenvolvemos para esta tese.

III – ISQUEMIA E REPERFUSÃO

A descoberta do varredor de radicais livres endógenos SOD (superóxido dismutase) em 1969 deu início a um maior entendimento do mecanismo de lesão tecidual mediado por radicais livres (14). Em condições não-isquêmicas, a atividade da xantina oxidase é muito baixa. Entretanto, quando o tecido é submetido à isquemia, a atividade dessa enzima aumenta rapidamente (14). Isso se deve a remoção de um fragmento proteolítico da enzima xantina desidrogenase (abundante em vários tecidos). A xantina oxigenase, formada a partir da desidrogenase, catalisa a reação que, durante a

reperusão, forma xantina e superóxido a partir da hipoxantina formada pela depleção de ATP no processo de isquemia em combinação com o oxigênio proveniente da reperusão. O superóxido, pela ação da SOD, forma peróxido de hidrogênio. Quando o peróxido de hidrogênio não é transformado em água pela catalase, forma facilmente o radical livre hidroxila, que é altamente tóxico e reativo, como vimos nos itens anteriores. Como a SOD é um inibidor extremamente específico do superóxido, sua ação indica a ocorrência de estresse oxidativo (14). O acúmulo de hipoxantina, decorrente da quebra do ATP, não se traduz na formação de superóxido sem a presença do oxigênio advindo da reperusão, mesmo considerando o acúmulo da xantina oxidase resultante da metabolização da xantina desidrogenase provocada pela isquemia. A lesão isquêmica por estresse oxidativo só se estabelece com a reperusão. A isquemia isolada produz depleção energética e até citólise, porém produz lesão por estresse oxidativo quando seguida de reperusão. O tempo de isquemia e as condições em que ela ocorre são importantes na determinação do prognóstico da lesão, além é claro da resistência tecidual específica e dos mecanismos antioxidantes envolvidos em cada órgão. Como vimos antes, o superóxido é um radical livre com alguma toxicidade intrínseca que se amplifica quando forma peróxido de hidrogênio, que não é um radical livre, mas que forma o radical extremamente citotóxico hidroxila a partir da reação de Haber-Weiss. O processo principal pelo qual o OH^\bullet (e outros metabólitos tóxicos do oxigênio) provoca dano é primariamente a peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica ocorre pela reação dos radicais livres com os lipídios que formam as membranas mitocondriais e celulares (23). O dano à membrana plasmática da célula endotelial aumenta a permeabilidade vascular e provoca edema.

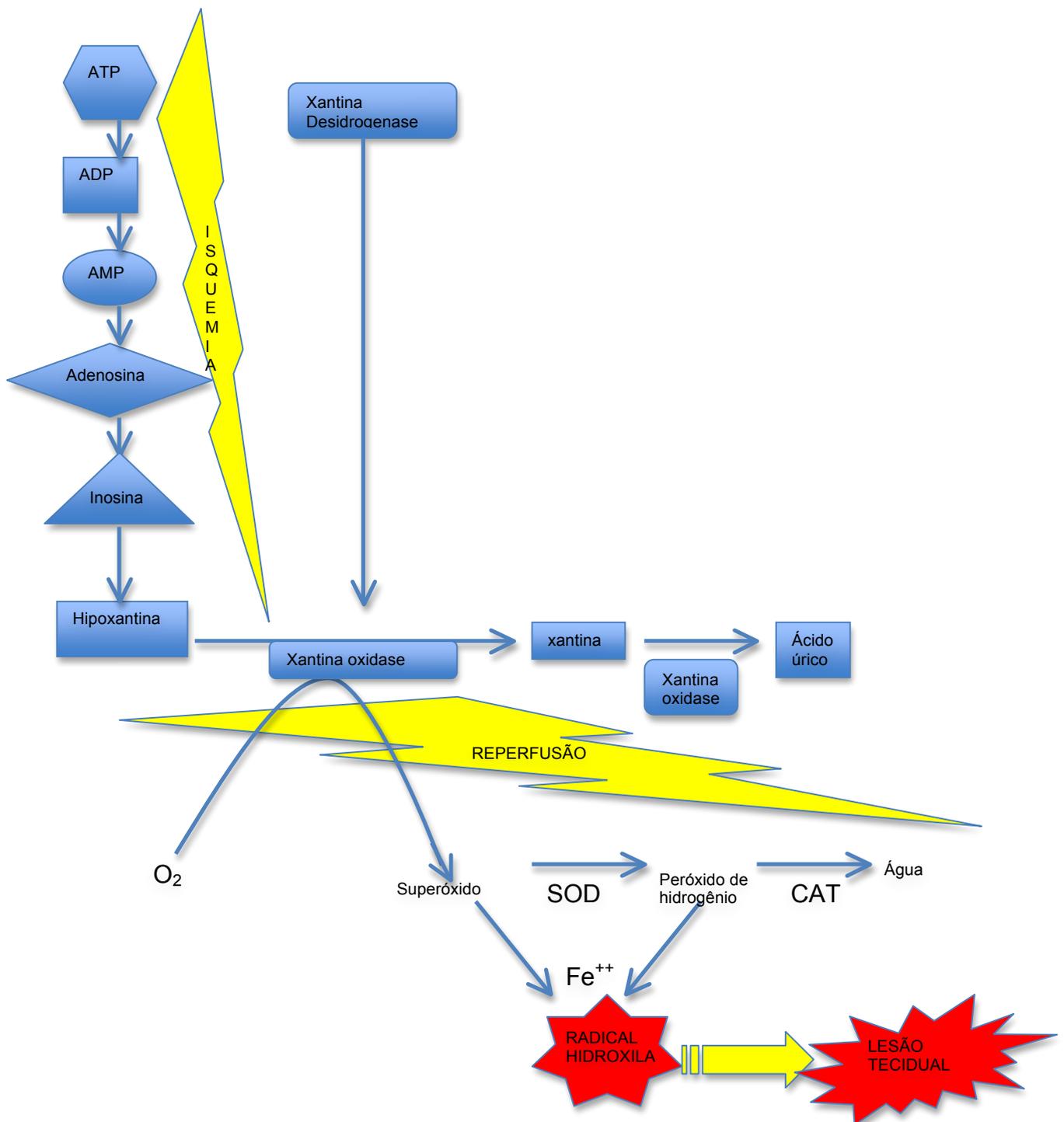


Figura 1: mecanismos de produção de radicais livres em tecidos submetidos à isquemia e reperfusão. A figura mostra os mecanismos que levam à lesão tecidual. Também mostra a ação de duas importantes enzimas antioxidantes: a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT). Figura modificada de Bulkley, G.B. (14).

Além da lesão endotelial primária, o aumento da permeabilidade vascular está associado à infiltração de leucócitos e amplificação da lesão. Nos rins os tipos mais abundantes de leucócitos são as células dendríticas e os macrófagos (24). Essas células promovem resposta inflamatória não-séptica seguindo a reperfusão, diretamente através da produção de citocinas pró-inflamatórias, ou indiretamente através da ativação de linfócitos T e de células NK (*Natural Killer cells*).

A isquemia leva, portanto, à falência da fosforilação oxidativa e consequente morte celular devido à depleção de trifosfato de adenosina. O ATP é necessário para manter o funcionamento da bomba de sódio-potássio (Na^+/K^+ -ATPase), que por sua vez é fundamental para manter a alta concentração intracelular de potássio e baixa concentração de sódio. Quando a bomba de sódio-potássio está prejudicada, cloreto de sódio (NaCl) e água (H_2O) difundem-se passivamente para o interior da célula, resultando edema celular e o fenômeno conhecido como “*no-reflow*” (25). *No-reflow phenomenon* (fenômeno de não-refluxo) é um conceito que surgiu com o estudo de isquemia cerebral em coelhos (26). Verificou-se que após períodos prolongados de isquemia o fluxo sanguíneo cerebral normal não era restabelecido, apesar da desobstrução vascular. Isquemia prolongada resulta em significativas mudanças na microvasculatura que interfere com o fluxo sanguíneo mesmo depois de restabelecida as condições para reperfusão. Quanto mais tempo de isquemia, mais provável é a ocorrência de não-refluxo. Fisiopatologicamente há vários contribuintes para a ocorrência do fenômeno, desde o dano endotelial, edema tecidual, ativação plaquetária, liberação de radicais livres, infiltração leucocitária e contratura tecidual. O edema tecidual comprime os vasos na microcirculação. A contratura celular na zona isquêmica

também contribui para a compressão microvascular. Também a formação de tampões (*plugs*) de leucócitos contribui com o não-refluxo (obstrução mecânica), além dos leucócitos contribuírem para a liberação de radicais livres (26). Dando sequência à falência da bomba de sódio-potássio, com o conseqüente deslocamento de NaCl e H₂O do meio extra para o intracelular (edema celular), ocorre a perda de potássio e de magnésio do meio intracelular para o interstício. O cálcio então entra na célula, a glicólise anaeróbia (para produção de energia) tem início, levando à acidose e ainda à ativação de enzimas lisosomais (25). O resultado é sofrimento e, finalmente, morte celular. Como vimos antes, durante a reperfusão a hipoxantina (produto da degradação do ATP no início do processo de isquemia) é oxidada a xantina com a produção de radicais livres. As soluções de preservação hiperosmolares ajudam a prevenir edema celular e fenômeno de não-refluxo. Além do mais, uma solução com composição semelhante ao meio intracelular ajuda a manter o equilíbrio entre o meio intra e extracelular. O resfriamento da solução contribui para a diminuição das necessidades energéticas da célula, com menos glicólise anaeróbica e menos acidose. O papel da hipotermia será abordado com maior detalhamento a seguir, em uma parte do texto dedicada ao aprofundamento do estudo da influência da temperatura na minimização de danos por isquemia e reperfusão. Além das medidas acima, soluções de preservação podem conter ATP-MgCl₂ como fonte adicional de energia. Bloqueadores de canais de cálcio diminuem a difusão do cálcio para o interior da célula, inibidores da xantina oxidase são usados para diminuir a formação de superóxido. As soluções de preservação também incluem varredores de radicais livres (glutathiona), agentes vasoprotetores, e ainda corticosteróides (para estabilização de lisosomas), diminuindo assim a ocorrência de citólise (25).

O túbulo contorcido proximal é o principal local de dano na isquemia renal, com lesões bem definidas a partir de 30 minutos de isquemia, sendo que há relativa preservação glomerular. A intensidade da necrose está relacionada ao tempo de isquemia, com início da recuperação da necrose tubular em dois dias (7,27). Em um estudo para avaliação de efeitos morfológicos e fisiológicos agudos e crônicos (15 dias) em rins de ratos submetidos à isquemia quente e nefrectomia contralateral, foi determinado que recuperação completa e espontânea ocorreu após 30 minutos de isquemia quente (10% de mortalidade). Por outro lado, 90 minutos de isquemia quente esteve associada a alta mortalidade (83% de óbitos). Sessenta minutos de isquemia renal quente produziu importante necrose tubular, mas com uma mortalidade aceitável para um experimento (25% de mortes). Os óbitos ocorreram entre o segundo e o sexto dia após a isquemia, e todos foram ocasionados por uremia (rim único submetido à isquemia e reperfusão). Com esse tempo de isquemia houve dano morfológico residual, bem como prejuízo nos parâmetros perfusionais do rim remanescente. As mudanças morfológicas encontradas, após um período maior ou igual a 30 minutos, foram principalmente necrose do túbulo contorcido proximal. Os glomérulos pareceram normais. Necrose pôde ser vista em um dia, mas foi mais evidente em dois dias, quando foi graduada segundo os seguintes critérios histológicos:

1. Mitose e necrose de células individuais;
2. Necrose de todas as células adjacentes ao túbulo contorcido proximal;
3. Necrose confinada ao terço distal do túbulo contorcido proximal com uma banda de necrose se estendendo no interior do córtex renal;
4. Necrose afetando os três segmentos do túbulo contorcido proximal.

A gravidade da necrose estava associada ao período de isquemia quente. Grau 4 não foi encontrado em nenhum caso de 30 minutos de isquemia, mas ocorreu em 70% dos casos

submetidos a isquemia por mais de 60 minutos. Regeneração do epitélio tubular estava presente em dois dias, e os túbulos estavam completamente realinhados ao cabo de quatro dias, embora células necróticas ainda estivessem presentes nos lumens dos túbulos. Acompanhando necrose grave (grau 4) havia disseminada deposição de cálcio nos túbulos lesados (aos quatro dias de evolução), e nesse período apareceram os primeiros indícios de aumento do tecido intersticial. Dano cortical residual estava sempre presente. As lesões corticais foram graduadas como mínima (0-10%), leve (10-20%), moderada (20-30%), e grave (> 30%). A gravidade e o efeito em longo prazo estavam relacionados à duração da isquemia. A partir desse estudo se pode concluir que o tempo de isquemia é crítico não apenas na ocorrência de danos histológicos, mas também na gravidade e na extensão. Também se conclui que o dano inicial se dá sobre o túbulo contorcido proximal (necrose tubular), mas que o prolongamento da isquemia quente pode se espalhar para os glomérulos (27). Confirmando os achados em rim de ratos, estudos com biópsias renais humanas mostraram resultados semelhantes, com acometimento predominante da medular renal (túbulos) e relativa preservação da cortical (glomérulos) (7).

IV – HIPOTERMIA NA DIMINUIÇÃO DOS DANOS POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO

Em transplante de órgãos, hipotermia tem sido amplamente aceita como protetora quanto a danos provocados por isquemia e reperfusão (2). Embora a temperatura de preservação adotada tenha sido de 4°C, as comparações foram apenas realizadas com normotermia (37°C), exceto quando Biberthaler e colaboradores (4) decidiram investigar outros grupos de temperatura. O citado grupo comparou quatro níveis de temperatura hepática e avaliou dano por isquemia e reperfusão. Os grupos foram: normotérmico (37°C), hipotermia leve (26°C), hipotermia moderada (15°C), e hipotermia intensa (4°C). O objetivo era saber se existia uma faixa de resfriamento em que se obtivesse uma relação favorável entre os efeitos protetores da hipotermia versus o potencial deletério do emprego do resfriamento. Para determinar a temperatura ideal, o grupo supracitado conduziu a primeira investigação *in vivo* da influência da temperatura no tecido hepático. Estudos prévios já haviam demonstrado que hipotermia era capaz de proteger a microcirculação hepática contra os danos causados por isquemia e reperfusão. A temperatura intraparenquimatosa era avaliada por um termômetro com sonda (*probe*) implantado no fígado de camundongos. A solução de resfriamento era salina. Os desfechos levaram em consideração parâmetros hemodinâmicos, interação leucocitário-endotelial, enzimas hepáticas (aspartato aminotransferase, AST, e alanino aminotransferase, ALT), e ainda microscopia eletrônica. Não houve alteração significativa na temperatura sistêmica, mas foi possível manter o fígado nas temperaturas programadas durante 90 minutos de isquemia, seguido de reperfusão normotérmica por 30 minutos, 120 minutos e 240 minutos. A conclusão dos autores foi de que hipotermia leve (26°C) foi o bastante para proteger o fígado contra os danos por isquemia e

reperusão em relação aos controles normotérmicos (37°C), e sem diferença protetora em relação aos demais grupos de temperatura (15°C e 4°C). Não houve benefício em temperaturas mais baixas (4). Outros estudos confirmaram os achados de Biberthaler indicando que hipotermia leve é o bastante para proteger o fígado contra os efeitos deletérios de isquemia e reperusão. Behrends (28) e colaboradores mostraram que mesmo uma temperatura de 34°C era o suficiente para atingir o efeito desejado, não ocorrendo vantagem nem mesmo para o grupo de 31°C (em ratos Wistar). Esses autores avaliaram provas de função hepática e marcadores de peroxidação lipídica (28).

O efeito da temperatura corporal em dano por isquemia e reperusão renal em modelo animal (rato) já foi avaliado (29), mas até o momento não foi realizada comparação entre grupos de resfriamento para avaliar os efeitos da hipotermia em relação ao estresse oxidativo. Em um estudo em ratos foi realizada nefrectomia direita seguida de isquemia renal esquerda por 45 minutos. Três grupos de animais, com seis ratos em cada, foram estudados: 39,67°C (grupo 1), 32,6°C (grupo 2), e 36,5-37°C (grupo 3). Os autores avaliaram a creatinina e achados histopatológicos, e encontraram um aumento significativo na creatinina no grupo hipertérmico, além de uma melhor preservação da histoarquitetura renal no grupo de temperatura mais baixa (29).

Como visto acima, há um estudo que comparou diferentes grupos de hipotermia em relação à isquemia e reperusão hepática (4) e um estudo que comparou hipertermia com normotermia e com hipotermia renal discreta em relação a função renal e dano histopatológico associado à isquemia e reperusão (29). Entretanto, até o momento não fora realizado nenhum estudo experimental comparando os grupos de hipotermia, aos moldes do estudo de Biberthaler para fígado, contudo em isquemia e reperusão renal.

Como já foi visto, há vários estudos que apontam para um efeito protetor da hipotermia. Inclusive há ensaios clínicos nesse sentido. Em uma metanálise sobre hipotermia terapêutica na prevenção de insuficiência renal aguda, de um total de 792 artigos, 19 apresentaram os critérios de elegibilidade para o estudo. Embora os 19 trabalhos fossem ensaios clínicos randomizados, a qualidade dos estudos foi considerada pobre. A conclusão dos autores foi que, apesar da hipotermia ter redução na mortalidade cardiovascular e cerebral, não houve diferença significativa em relação à insuficiência renal aguda ou à necessidade de diálise (30).

Em estudos envolvendo o uso de pré-condicionamento isquêmico renal, hipotermia é frequentemente levada em consideração na avaliação dos desfechos (31), embora nem sempre (32). A ideia inicial do nosso grupo era avaliar a associação de pré-condicionamento isquêmico renal com hipotermia, mas nos deparamos com a falta de um estudo que demonstrasse, experimentalmente, a partir de que temperatura haveria proteção. O objetivo planejado era comparar estratégias de pré-condicionamento isquêmico por interrupção reversível do fluxo renal associada à hipotermia. Encontramos na literatura estudos que avaliaram pré-condicionamento isquêmico renal em ratos, mostrando efeito protetor em quatro ciclos de 4 minutos de isquemia alternados com 11 minutos de reperfusão, com intervalo crítico de 5 minutos entre a última reperfusão do pré-condicionamento e a isquemia sustentada por 30 minutos (33). Nesse estudo foi avaliado apenas o pré-condicionamento, sem variação na temperatura renal ou sistêmica. Em um estudo de pré-condicionamento isquêmico renal, os autores descobriram que um único ciclo, ao invés dos quatro aplicados no estudo acima, era capaz de oferecer proteção. Para isso desenvolveram um modelo que avaliou sequencialmente três aspectos: a) comparação de tempos de ciclos de isquemia e

reperfusão quente (sem resfriamento) para determinar melhor procedimento de pré-condicionamento; b) uso de doadores e bloqueadores de óxido nítrico sintetase para determinar se o óxido nítrico (NO) mediava o pré-condicionamento isquêmico renal em ratos; c) a comparação entre o melhor esquema de pré-condicionamento encontrado com o não-pré-condicionamento em rins transplantados (após 5 horas de isquemia fria em solução de Euro-Collins resfriado a 4°C - *cold storage*). Aqui novamente não houve diferentes grupos de hipotermia. Os resultados da primeira parte do estudo mostraram que 15 minutos de isquemia quente e 10 minutos de reperfusão eram capazes de oferecer proteção contra isquemia sustentada por 40 minutos, com função renal avaliada a partir da creatinina sérica. A conclusão da segunda parte do estudo foi que o óxido nítrico (NO) está relacionado ao efeito protetor do pré-condicionamento isquêmico, sendo que a avaliação foi feita a partir da oxidação de ácido desoxirribonucléico (*DNA oxidation*). A terceira parte mostrou que o pré-condicionamento proposto na primeira parte do estudo em isquemia quente (15min de isquemia e 10min de reperfusão, a 37°C) era também capaz de oferecer proteção em rins estocados por 5 horas em solução de Euro-Collins resfriada a 4°C antes do transplante (34). Existem outros estudos de pré-condicionamento isquêmico renal no desenvolvimento de tolerância aos efeitos da isquemia e reperfusão. Em um estudo do departamento de nefrologia da Universidade de Barcelona, ratos submetidos a isquemia e reperfusão foram submetidos a pré-condicionamento isquêmico em cinco grupos: a) controle (sem pré-condicionamento, mas com isquemia quente de 40 minutos; b) 5 minutos de isquemia e 10 minutos de reperfusão (pré-condicionamento) seguido de isquemia sustentada por 40 minutos; c) 10 minutos de isquemia e 10 minutos de reperfusão (pré-condicionamento) seguido de isquemia sustentada por 40 minutos; d) 15 minutos de isquemia e 10 minutos de reperfusão (pré-condicionamento) seguido de isquemia sustentada por 40 minutos; e) 20

minutos de isquemia e 10 minutos de reperfusão (pré-condicionamento) seguido de isquemia sustentada por 40 minutos. Os autores avaliaram dois desfechos: creatinina sérica e microscopia óptica. Não foram avaliados marcadores de estresse oxidativo. O melhor esquema de pré-condicionamento encontrado foi de um ciclo de 15 minutos de isquemia e 10 de reperfusão. Além de não terem avaliado marcadores de peroxidação lipídica, não avaliaram o efeito da temperatura (35). Em uma revisão sistemática com uma meta-análise publicada em 2012 sobre pré-condicionamento isquêmico renal em modelo animal, os autores concluíram que as estratégias analisadas em geral são protetoras para o rim, pois há redução da creatinina e da ureia, e ainda menor dano tecidual no exame histopatológico (36).

Pela falta de estudos correlacionando hipotermia e pré-condicionamento isquêmico, a ideia inicial do nosso grupo era de avaliar essa questão. Entretanto descobrimos não haver nenhum estudo sobre qual seria a temperatura ideal para se obter proteção contra a ação de radicais livres a fim de associar a esquemas de pré-condicionamento isquêmico. Com base nessa lacuna na literatura decidimos investigar, em rim de ratos, quanto de hipotermia seria necessária para proteção sem que houvesse lesão induzida pela hipotermia. Estudo semelhante ao realizado para fígado por Biberthaler (4). Na literatura há estudos que demonstram o papel do resfriamento como protetor, mas também há os que demonstram que a hipotermia pode ser tão danosa quanto à isquemia em si, mesmo que haja manutenção do fluxo sanguíneo durante o resfriamento (37). Portanto, o frio por si só pode ser deletério aos tecidos, causando mudanças semelhantes às observadas quando há isquemia quente, havendo edema mitocondrial com arredondamento do formato da organela, edema intra e extracelular, e ainda alteração na cromatina nas células dos túbulos contorcidos proximais de rins

submetidos à hipotermia. Isso reflete a inabilidade de manter a fosforilação oxidativa e o transporte transmembrana em temperaturas não fisiológicas por um período prolongado. Os estoques de energia (ATP) são lentamente perdidos com o frio (lei de van Hoff). Um decréscimo de 50% da relação ATP/ADP pode ser encontrado em isquemia fria (38). Órgãos podem suportar isquemia fria prolongada ou alguma isquemia quente (curto período) sem que haja deterioração da função, porém quando ambos os fatores atuam sobre o mesmo tecido, facilmente pode ocorrer dano profundo, com marcada morte celular (39).

O aumento do tempo de preservação renal hipotérmica fora do corpo (*cold storage*) com solução UW (Universidade de Wisconsin) causa alterações na proteína sódio-potássio trifosfato de adenosina e na proteína ezrin do citoesqueleto. Isso leva a uma cascata, tempo-dependente, de deterioração na função tubular da membrana, fenômeno que é observado durante a preservação a frio. Esse armazenamento hipotérmico causa, portanto, ruptura de importantes elementos do citoesqueleto nos túbulos renais, que contribuem com o dano provocado pelo reaquecimento (40). A preservação hipotérmica resulta em morte celular através da formação de espécies reativas de oxigênio ferro-dependente, levando a apoptose durante o reaquecimento. A lesão induzida por hipotermia sem isquemia em células do túbulo contorcido proximal de ratos está associada à perda do potencial de membrana mitocondrial, independentemente da solução de preservação utilizada ser UW (Universidade de Wisconsin), Euro-Collins, ou Custodiol HTK (Histidina-Triptofano-Cetogluturato) (41). Hipotermia é o principal recurso usado para prolongar a viabilidade do órgão *ex vivo*, mas por outro lado também induz edema celular através da inibição da trifosfatase de adenosina dependente de energia (Na^+/K^+ -ATPase). Isso, por sua vez, leva a um

desequilíbrio eletrolítico com entrada de água na célula seguido de edema celular (42). Portanto, embora a hipotermia possa ser deletéria, paradoxalmente também está definitivamente associada à proteção. A questão central é conhecer que temperatura está relacionada a menor dano (ou melhor proteção). Pelas razões acima expostas, um estudo com a avaliação de graus de hipotermia deveria anteceder um estudo de pré-condicionamento isquêmico hipotérmico. Essa é a base que sustenta a presente tese.

V – MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

Devido à instabilidade dos radicais livres *in vivo*, a detecção direta dessas espécies é cercada de dificuldades técnicas. Em virtude dessa característica, alternativamente são avaliadas enzimas envolvidas na formação ou eliminação de radicais livres, bem como espécies não-radicaais relacionadas à formação ou à eliminação de espécies reativas radicais (1). Embora existam métodos para detecção direta de radicais livres, a medida indireta de derivados da peroxidação lipídica, como os F2-isoprostanos, o malondialdeído (MDA), e as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), é geralmente empregada nos ensaios que avaliam estresse oxidativo (1,11,43–45). Podem ser também avaliados certos derivados da oxidação proteica (carbonilos e 3-nitrotirosina), ou ainda derivados da oxidação de DNA (8-hidroxila-2'-desoxiguanosina, 5-hidroximetila-2'-desoxiuridina), ou mesmo medidas de capacidade antioxidante (43–45). Além dos marcadores acima, ensaios envolvendo enzimas como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), bem como dos metabólitos do óxido nítrico (nitritos e nitratos) são muito úteis na avaliação de estresse oxidativo (46).

Para a presente tese usamos os seguintes marcadores de desfecho (avaliação de estresse oxidativo):

1. Superóxido dismutase (SOD) tecidual como avaliação de atividade enzimática antioxidante.
2. Catalase (CAT) tecidual como avaliação de atividade enzimática antioxidante.
3. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) tecidual como avaliação da peroxidação lipídica.
4. F2-Isoprostanos (F2IP) sérico como avaliação da peroxidação lipídica.
5. Nitritos (NO_2) teciduais para avaliação do metabolismo do óxido nítrico (NO).
6. Nitratos (NO_3) teciduais para avaliação do metabolismo do óxido nítrico (NO).
7. Exame histopatológico em hematoxilina e eosina (HE) para avaliação do dano tecidual decorrente de isquemia e reperfusão.

SOD: foi utilizado um método baseado na inibição da formação de adrenocromo na auto-oxidação da adrenalina pela SOD (47). Quanto maior é a concentração de SOD na amostra, menor é a auto-oxidação da adrenalina. Por isso se pode medir a SOD através da mudança espectrofotométrica da absorvância da adrenalina. Os resultados são expressos em U/g de tecido. Uma unidade (U) de atividade enzimática é a quantidade de SOD capaz de inibir 50% da auto-oxidação da adrenalina em adrenocromo (46).

CAT: atividade determinada pelo método de Chance (1954). A velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio pela ação da catalase foi medida espectrofotometricamente pela absorvância do peróxido de hidrogênio. Os resultados são expressos em pmol/mg de tecido (46).

TBARS: foi medido espectrofotometricamente o malondialdeído (MDA) na presença de ácido tiobarbitúrico. A concentração tecidual de TBARS foi expressa em nmol/mg de proteína. Para a quantificação de proteínas foi usado o método de LOWRY (1951) (46).

F2IP: ensaio imuno-enzimático para detecção plasmática de F2-isoprostanos utilizando o kit ALX-850-205-KI01 8-iso Prostaglandin F2-alpha EIA kit (F2-isoprostanos; Enzo Life Sciences International, Inc., Estados Unidos).

NO₂: para a medida dos nitritos foi usada a enzima nitrato redutase associada a cofator NADPH e o tampão TrisBuffer com glicose-6-fosfato e glicose-6-fosfato-desidrogenase. Os valores foram expressos em µmol/L.

NO₃: para a medida dos nitratos foi usada a enzima nitrato redutase associada a cofator NADPH e o tampão TrisBuffer com glicose-6-fosfato e glicose-6-fosfato-desidrogenase. Os valores foram expressos em µmol/L.

Exame histopatológico em hematoxilina e eosina: os rins colocados em formalina foram transferidos para blocos de parafina e seccionados em micrótomo. As lâminas geradas por esse processo foram submetidas à coloração por hematoxilina e eosina (HE). Os critérios para avaliação histopatológica utilizados foram os publicados por Jablonski (27). Esses critérios foram desenvolvidos a partir de um estudo quanto aos efeitos agudos e crônicos de isquemia quente em rins de ratos. Os autores da graduação do referido artigo elaboraram uma classificação morfológica que graduavam as lesões de 1 a 4, seguindo os seguintes critérios:

1. Mitoses e necrose celular individual.
2. Necrose de todas as células nas adjacências do túbulo contorcido proximal, com sobrevivência dos túbulos circunjacentes.
3. Necrose confinada ao terço distal do túbulo contorcido proximal com uma banda de necrose se estendendo no interior do córtex renal.
4. Necrose afetando todos os três segmentos do túbulo contorcido proximal.

Essa graduação (27) foi adaptada ao nosso estudo, sendo criado por nós o grau zero (0) quando não havia danos.

VI – TÉCNICA CIRÚRGICA: DESENVOLVIMENTO DO MODELO EXPERIMENTAL

Na construção do modelo experimental levamos em consideração os seguintes aspectos:

- Necessidade de duas cirurgias: a primeira para isquemia renal sob controle local e sistêmico de temperatura. A segunda, após a reperfusão, para coleta das amostras finais.
- Escolha da unidade renal controle: cada animal forneceu um controle para todo o experimento. Esse controle foi o rim direito. A escolha do lado direito foi para a preservação do lado esquerdo para indução de isquemia com interrupção temporária do fluxo sanguíneo renal.

- Escolha da unidade renal experimental: o rim esquerdo foi escolhido por apresentar um pedículo mais longo, facilitando a dissecação para interrupção temporária do fluxo sanguíneo com clipe não-traumático e removível.
- 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*” intraparenquimatoso IT-18 para o termômetro BAT-12 (IITC *Life Science*, Woodland Hills, Califórnia, EUA) ligada ao termômetro intraparenquimatoso 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 resfriar e manter o rim resfriado até a 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 o período: 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).
- Técnica para coleta de sangue antes da laparotomia: já sob anestesia geral, mas antes da laparotomia, coletamos cerca de 1,5mL de sangue através de canulação retrorbital. Esse sangue era imediatamente centrifugado (5000 RPM por 10 minutos) em um Eppendorf heparinizado. O sobrenadante era imediatamente

transferido para outro Eppendorf identificado, que era mergulhado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C .

- Coleta de sangue após a reperusão: durante a relaparotomia, sob nova anestesia geral, o rim esquerdo era rapidamente removido. Puncionava-se então o coração e se coletava 2mL de sangue. Esse sangue era imediatamente centrifugado (5000 RPM por 10 minutos) em um Eppendorf heparinizado. O sobrenadante era imediatamente transferido para outro Eppendorf identificado, que era mergulhado em nitrogênio líquido e então transferido para um freezer -80°C .

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 consistiu na injeção intraperitoneal de Ketamina (75 mg/Kg) e de Xilazina (10 mg/Kg). Era realizada tricotomia abdominal e canulação retrorbital para coleta de amostra de sangue. O animal era então transferido para a mesa cirúrgica aquecida. Oxigênio 1L/min era administrado por campânula. Realizamos infiltração da parede abdominal de Bupivacaína 0,5% para assegurar anestesia no pós-operatório (após o animal despertar da anestesia geral). 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 dissecado. O pedículo renal era ligado com fio multifilamentar inabsorvível e o rim removido e seccionado em duas partes iguais: uma parte era colocada em um Eppendorf e mergulhada em nitrogênio líquido (para posterior transferência para o freezer -80°C) e a outra parte colocada em um frasco com formol para fixação antes da inclusão em bloco de parafina. 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 mantínhamos 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 (reperfusão) os animais eram submetidos à nova anestesia com injeção intramuscular de Ketamina (75 mg/Kg) e de Xilazina (10 mg/Kg), e ainda Bupivacaina 0,5% na incisão. Eram colocados na mesa cirúrgica aquecida e oxigênio (1L/min) era administrado por campânula. A incisão era reaberta e o rim esquerdo rapidamente coletado. Assim como se deu com o rim direito, metade do esquerdo foi colocada em um Eppendorf em nitrogênio líquido (depois em freezer -80°C), e a outra metade em formol para posterior inclusão em bloco de parafina. O coração era puncionado para coleta de amostra de sangue para centrifugação (5000 RPM por 10 minutos em Eppendorf heparinizado). O sobrenadante foi transferido para outro Eppendorf identificado e mergulhado em nitrogênio líquido antes da transferência para o freezer -80°C. Para garantir o adequado sacrifício do animal, toda volemia foi coletada e ainda realizada cardiectomia. Amostras dos pulmões foram coletadas e armazenadas tal qual se fez com os rins, para futuros projetos. 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 096-10 pelo Comitê de Ética em Pesquisas do Grupo de Pesquisas e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP-GPPG-HCPA). O número de animais destinados a esse estudo foi calculado em 35, mas conseguimos reduzir para 28 em virtude da modificação do protocolo inicial com a exclusão do grupo *sham*. Não havia necessidade do grupo *sham* em função do rim direito servir de controle para o experimento. 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. Além do registro completo no caderno de laboratório, onde detalhes de todos os procedimentos realizados foram devidamente registrados, gravamos em vídeo um experimento-padrão completo. A base para a construção do modelo experimental aqui construído foi o descrito por Grezzana-Filho e colaboradores, originalmente desenvolvido para fígado, porém modificado e adaptado por nós para o rim, com a criação de um grupo controle no próprio animal, e com a inclusão de tecnologia que permitiu a medição precisa da temperatura cortical renal em quatro grupos com faixas distintas de temperatura-alvo (4,48–50).

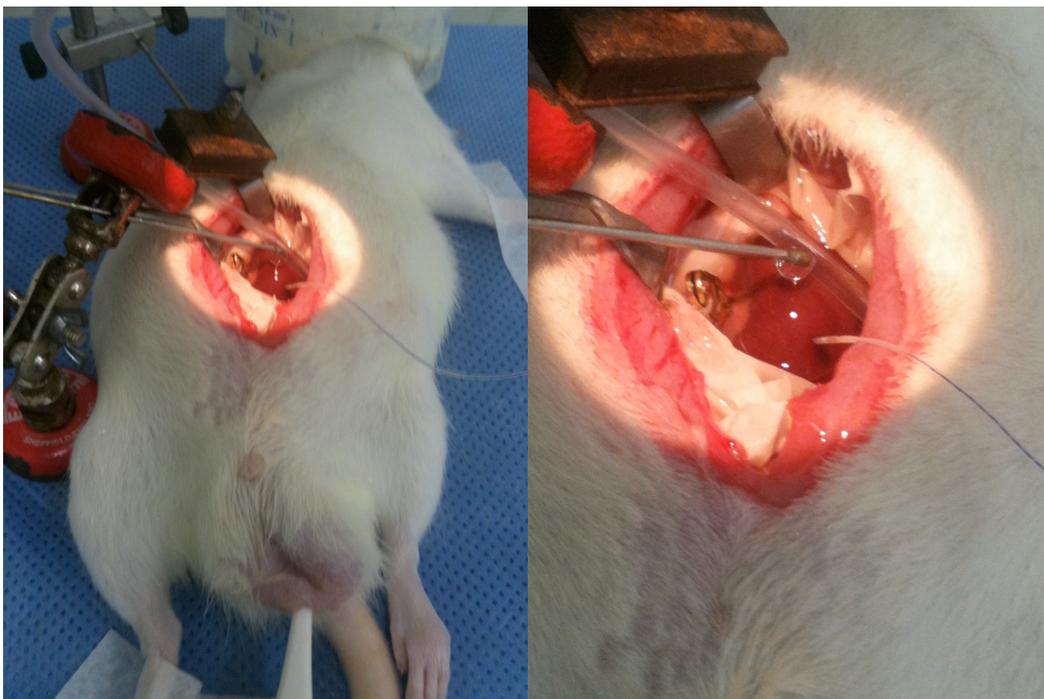


Figura 2: rato submetido à laparotomia. Isolamento do rim do restante da cavidade abdominal. Microsonda (*probe* parenquimatosa) inserido na córtex renal. Sistema de resfriamento com solução fisiológica e aspiração contínua. Afastadores cirúrgicos imantados fixos à mesa aquecida. Clipe metálico no pedículo vascular do rim esquerdo (isquemia fria). Termômetro retal (temperatura sistêmica).

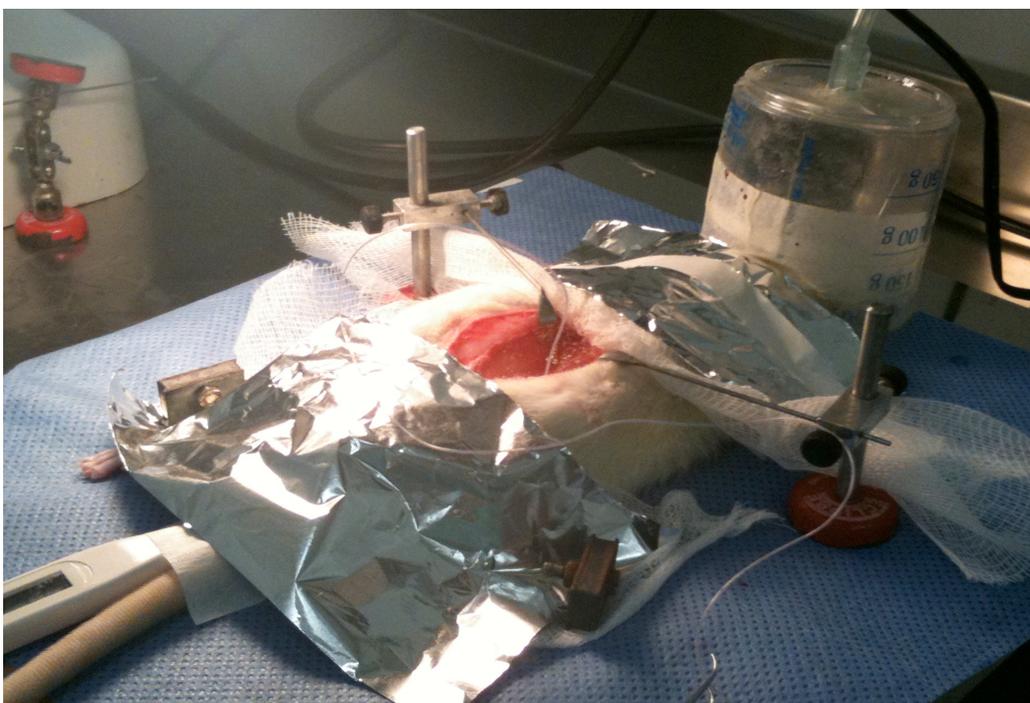


Figura 3: cobertores de papel alumínio e gaze. Campânula com oxigênio a 1L/min. Rim esquerdo em isquemia e hipotermia tópica. Termômetro parenquimatosa (temperatura cortical renal) e retal (temperatura sistêmica).



Figura 4: termômetro intraparenquimatoso BAT-12 registrando a temperatura cortical renal esquerda de animal do grupo 4 (4°C) durante isquemia sob hipotermia.



Figura 5: bancada de cirurgia. Animal anestesiado momentos antes do início da cirurgia.

REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Halliwell B, Gutteridge J. Free Radicals in Biology and Medicine. 4^o ed. Oxford University Press, USA; 2007.
2. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*. 1988 abr;45(4):673-6.
3. Lazaris AM, Maheras AN, Vasdekis SN, Karkaletsis KG, Charalambopoulos A, Kakisis JD, et al. Protective effect of remote ischemic preconditioning in renal ischemia/reperfusion injury, in a model of thoracoabdominal aorta approach. *J. Surg. Res.* 2009 jun 15;154(2):267-73.
4. Biberthaler P, Luchting B, Massberg S, Teupser D, Langer S, Leiderer R, et al. The influence of organ temperature on hepatic ischemia-reperfusion injury: a systematic analysis. *Transplantation*. 2001 nov 15;72(9):1486-90.
5. Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*. 2004 fev;53 Suppl 1:S110-118.
6. Ferreira AL, Matsubara LS. [Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress]. *Rev Assoc Med Bras*. 1997 mar;43(1):61-8.
7. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006 jun;17(6):1503-20.

8. Smerz RW. Incidence of oxygen toxicity during the treatment of dysbarism. *Undersea Hyperb Med.* 2004;31(2):199-202.
9. Deneke SM, Fanburg BL. Normobaric oxygen toxicity of the lung. *N. Engl. J. Med.* 1980 jul 10;303(2):76-86.
10. Speit G, Dennog C, Radermacher P, Rothfuss A. Genotoxicity of hyperbaric oxygen. *Mutat. Res.* 2002 dez;512(2-3):111-9.
11. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 2004 maio;142(2):231-55.
12. Berg JM, Shi Y. The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science.* 1996 fev 23;271(5252):1081-5.
13. Vincent JB. The biochemistry of chromium. *J. Nutr.* 2000 abr;130(4):715-8.
14. Bulkley GB. Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. *Br. J. Cancer Suppl.* 1987 jun;8:66-73.
15. Cobb JP. Use of nitric oxide synthase inhibitors to treat septic shock: the light has changed from yellow to red. *Crit. Care Med.* 1999 maio;27(5):855-6.
16. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987 jun 11;327(6122):524-6.

17. Rees DD, Palmer RM, Hodson HF, Moncada S. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol.* 1989 fev;96(2):418-24.
18. Welch KD, Davis TZ, Van Eden ME, Aust SD. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free Radic. Biol. Med.* 2002 abr 1;32(7):577-83.
19. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *The American Journal of Surgery.* 1991 abr;161(4):488-503.
20. Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am. J. Clin. Nutr.* 2000 ago;72(2 Suppl):637S-46S.
21. Nivière V, Fontecave M. Discovery of superoxide reductase: an historical perspective. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2004 mar;9(2):119-23.
22. Huang H-Y, Appel LJ, Croft KD, Miller ER 3rd, Mori TA, Puddey IB. Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 2002 set;76(3):549-55.
23. McCord JM. The superoxide free radical: its biochemistry and pathophysiology. *Surgery.* 1983 set;94(3):412-4.
24. Li L, Okusa MD. Macrophages, dendritic cells, and kidney ischemia-reperfusion injury. *Semin. Nephrol.* 2010 maio;30(3):268-77.
25. Barry JM, Graft MJ. Renal Transplantation. *Campbell-Walsh Urology.* 10^o ed 2012. p. 1226-53.

26. Rezkalla SH, Kloner RA. No-reflow phenomenon. *Circulation*. 2002 fev 5;105(5):656-62.
27. Jablonski P, Howden BO, Rae DA, Birrell CS, Marshall VC, Tange J. An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia. *Transplantation*. 1983 mar;35(3):198-204.
28. Behrends M, Hirose R, Serkova NJ, Coatney JL, Bedolli M, Yardi J, et al. Mild hypothermia reduces the inflammatory response and hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Liver Int*. 2006 ago;26(6):734-41.
29. Delbridge MS, Shrestha BM, Raftery AT, El Nahas AM, Haylor JL. The effect of body temperature in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant. Proc*. 2007 dez;39(10):2983-5.
30. Susantitaphong P, Alfayez M, Cohen-Bucay A, Balk EM, Jaber BL. Therapeutic hypothermia and prevention of acute kidney injury: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Resuscitation*. 2012 fev;83(2):159-67.
31. Islam CF, Mathie RT, Dinneen MD, Kiely EA, Peters AM, Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney: the effect of preconditioning. *Br J Urol*. 1997 jun;79(6):842-7.
32. Jefayri MK, Grace PA, Mathie RT. Attenuation of reperfusion injury by renal ischaemic preconditioning: the role of nitric oxide. *BJU Int*. 2000 jun;85(9):1007-13.

33. Toosy N, McMorris EL, Grace PA, Mathie RT. Ischaemic preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury. *BJU Int.* 1999 set;84(4):489-94.
34. Torras J, Herrero-Fresneda I, Lloberas N, Riera M, Ma Cruzado J, Ma Grinyó J. Promising effects of ischemic preconditioning in renal transplantation. *Kidney Int.* 2002 jun;61(6):2218-27.
35. Riera M, Herrero I, Torras J, Cruzado JM, Fatjo M, Lloberas N, et al. Ischemic preconditioning improves postischemic acute renal failure. *Transplant. Proc.* 1999 set;31(6):2346-7.
36. Wever KE, Menting TP, Rovers M, van der Vliet JA, Rongen GA, Masereeuw R, et al. Ischemic preconditioning in the animal kidney, a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE.* 2012;7(2):e32296.
37. Tveita T, Johansen K, Lien AH, Myklebust R, Lindal S. Morphologic changes in tubular cells from in situ kidneys following experimental hypothermia and rewarming. *APMIS.* 2005 jan;113(1):13-20.
38. Kosieradzki M, Rowiński W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplant. Proc.* 2008 dez;40(10):3279-88.
39. Hosgood SA, Bagul A, Yang B, Nicholson ML. The relative effects of warm and cold ischemic injury in an experimental model of nonheartbeating donor kidneys. *Transplantation.* 2008 jan 15;85(1):88-92.

40. Mangino MJ, Tian T, Ametani M, Lindell S, Southard JH. Cytoskeletal involvement in hypothermic renal preservation injury. *Transplantation*. 2008 fev 15;85(3):427-36.
41. Bartels-Stringer M, Kramers C, Wetzels JFM, Russel FGM, Groot H de, Rauen U. Hypothermia causes a marked injury to rat proximal tubular cells that is aggravated by all currently used preservation solutions. *Cryobiology*. 2003 ago;47(1):82-91.
42. Ahmad N, Hostert L, Pratt JR, Billar KJ, Potts DJ, Lodge JPA. A pathophysiologic study of the kidney tubule to optimize organ preservation solutions. *Kidney Int*. 2004 jul;66(1):77-90.
43. Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes Metab*. 2007 nov;9(6):813-39.
44. Mayne ST. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J. Nutr*. 2003 mar;133 Suppl 3:933S-940S.
45. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem*. 2005 mar 23;53(6):1841-56.
46. Moreira AJ, Fraga C, Alonso M, Collado PS, Zettler C, Marroni C, et al. Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem. Pharmacol*. 2004 nov 15;68(10):1939-46.

47. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 1972 maio 25;247(10):3170-5.
48. Grezzana Filho T de JM, Mendonça TB de, Gabiatti G, Rodrigues G, Marroni NAP, Treis L, et al. Topical hepatic hypothermia plus ischemic preconditioning: analysis of bile flow and ischemic injuries after initial reperfusion in rats. *Acta Cir Bras.* 2011 jun;26(3):194-201.
49. Grezzana Filho T de JM, Mendonça TB de, Gabiatti G, Krueel CDP, Corso CO. Topic liver hypothermia and ischemic preconditioning: a new model of ischemia and reperfusion in rats. *Acta Cir Bras.* 2009 ago;24(4):262-6.
50. Grezzana Filho T de JM, Corso CO, Zanotelli ML, Marroni CA, Brandão ABM, Schlindwein E, et al. Liver glutathione depletion after preservation and reperfusion in human liver transplantation. *Acta Cir Bras.* 2006 ago;21(4):223-9.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Desenvolvimento de um modelo animal de isquemia e reperfusão (I/R) que permitiu a indução de hipotermia renal tópica controlada, sem variações significativas na temperatura sistêmica.
2. Determinar, no modelo animal desenvolvido, qual é a temperatura tópica associada à menor ocorrência de lipoperoxidação, através da medida de marcadores metabólicos de estresse oxidativo e da avaliação de lesão tecidual (histopatológica). Avaliar experimentalmente se a hipotermia foi capaz de reduzir danos decorrentes dos processos de isquemia e reperfusão.

ARTIGO EM INGLÊS (*PAPER*)

Oxidative Stress Evaluation of Ischemia and Reperfusion in Kidneys under Various Degrees of Hypothermia in the Rat

Emanuel Burck dos Santos¹, Walter José Koff², Tomaz de Jesus Maria Grezzana Filho³, Samanta Daiana De Rossi⁴, Lisiane Treis⁵, Silvia Regina Bona⁶, Karla Laís Pêgas⁷, Betina Katz⁸, Fabíola Schons Meyer⁹, Norma Anair Possa Marroni¹⁰, Carlos Otávio Corso¹¹.

¹MD, MSc. PhD student of the Department of Surgery of the *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, Brazil. Physician of the Division of Urology of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, Brazil.

²MD, PhD. Professor of the Department of Surgery of the *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, School of Medicine, Brazil.

³MD, MSc, PhD. Physician of the Division of Surgery of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, Brazil.

^{4,5}Undergraduate student in medicine. *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, School of Medicine, Brazil.

⁶MSc. Biologist, PhD student of the Department of Physiology of *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, School of Medicine, Brazil.

⁷MD, MSc. Physician of the Department of Pathology of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, Brazil.

⁸MD. Resident of the Department of Pathology of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, Brazil.

⁹MSc. Veterinarian of the Division of Animal Research of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, Brazil.

¹⁰MSc, PhD. Professor of the Department of Physiology and chief of the Laboratory of Experimental Research in Hepatology, *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, Brazil.

¹¹MD, PhD. Professor of the Department of Surgery of the *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, School of Medicine, Brazil.

Abstract

Introduction: Hypothermia has been associated with prevention against ischemia-reperfusion (I/R) damage, but there is no experimental analysis, *in vivo*, regarding the role that hypothermia plays on renal injury induced by I/R. The aims of this study were to design an animal model and evaluate the impact of predetermined ranges of temperatures on markers of stress-oxydative as well as on histopathologic sections.

Material and Methods: 28 male rats Wistar, under general anesthesia, undergone laparotomy to collect the right kidney (control group in each animal). The vascular pedicle of the left kidney was clamped during 40 minutes (ischemia). Four temperatures groups were designed, with 7 animals randomized for each group: normothermic (without cooling, around 37°C), mild local hypothermia (26°C), moderate local hypothermia (15°C) and deep hypothermia (4°C). The systemic body temperature was kept during the operation through the warming of the surgical table. The cortical left kidney temperature was assessed with an intra parenchymal probe connected to a thermometer. After 40 minutes of ischemia, the vascular clamp was removed and the abdominal wall closed. The animals were kept alive in an incubator for 240 minutes, so they were re-laparotomized, under new anesthesia, and its left kidney was removed. Afterwards it was performed heart puncture in order to collect blood sample for plasmatic f2-isoprostanes. Half of each kidney (right and left) had been kept on formalin and sent to pathological evaluation; the remaining half was stored on the freezer and used to analyze oxidative stress markers: catalase, SOD, TBARS, NO₃, and NO₂.

Results: Core body temperature had not differed significantly between the groups. According to the pathological evaluation, all kidneys that suffered ischemia were

significantly more injured than the controls ($p < 0.001$). No injury was found in the control group (right kidney of each rat). TBARS showed quite similar findings, showing increased levels in all I/R groups compared with the control group ($P < 0.001$). Concerning the protective enzyme catalase, it was observed an increase of this enzyme in the ischemic normothermic kidney when compared to the control. As the temperature was decreasing, more the catalase was decreasing. The catalase had a significant statistical difference ($P < 0.03$) between the ischemic normothermic group (G1, 37°C) and the deepest hypothermic group (G4, 4°C). Finally, no difference was found on nitrites and nitrates, superoxide dismutase, or on the plasmatic isoprostanes.

Discussion: In an acute experimental model (I/R= 40/240min) we found that ischemia-reperfusion was able to induce well-defined histologic damages on the rat kidneys when compared to controls. When I/R were induced, an increase on the protective enzyme catalase was found. However, in the deep hypothermia (4°C) we found a significant decrease of this enzyme when compared with the normothermic group, signaling that deep hypothermia had offered protection, dispensing the increase of catalase when the temperature had stayed lower. Increased TBARS levels meant that had occurred production of free radicals due to lipid peroxidation. We found a statistically significant rising in TBARS on all I/R groups, regardless the kidney temperature, when compared with the control group ($p < 0.001$), showing that oxidative stress was achieved in our animal model.

Conclusion: We concluded that our model of I/R was efficient to produce oxidative stress in the kidney. We also concluded that deep hypothermia has offered protection in this acute experiment (40 min of ischemia followed by 240 min of reperfusion).

Introduction

In transplants it is widely accepted that hypothermia is protective against injury caused by ischemia and reperfusion (I/R) (1). Even though the preconized temperature to obtain preservation has been 4°C, there are evidences that much higher temperatures, 26°C or even 34°C, are enough to get liver protection without necessity of deeper hypothermia (2,3). It is known that it is easier to achieve mild or moderate cooling, and that deep hypothermia is more associated with thermal injury of tissue, and that slight hypothermia has a lesser interference in the systemic temperature (4). Although the demonstration that mild hypothermia is sufficient to offer liver protection against the deleterious actions of I/R, there is not studies concerning the kidney (2,3).

The main target regarding the I/R renal damage is the proximal convoluted tubule, with relative glomerular preservation (5,6). The intensity of necrosis is related to the ischemic time. The recovery of acute tubular necrosis starts in two days from the I/R (5). The more time the cold storage is prolonged, more alteration on sodium-potassium adenosine triphosphate (Na/K-ATP) comes up. Along with it, changes in the proteins cytoskeleton, such as ezrin, also take place. All these events cause time-dependent lipid membranes injury, disorganizing the nephron tubular function during the cold storage, contributing with the damage that occurs during rewarming (7). Cold storage induces cell death due to the appearance of iron-dependent reactive oxygen species, with apoptosis in the rewarming period. Even without ischemia, the lesion induced by hypothermia occurs regardless the kind of preservation solution used (University of Wisconsin, Custodiol HTK (histidine-tryptophan-ketoglutarate), Euro-Collins) (8).

Lipid peroxidation is a consequence from the reaction between free radicals and lipid membranes of the cells and mitochondria (9). In order to evaluate the role played by free radicals, indirect markers are usually searched (10–13), because it is hard to perform straight assessment of such unstable reactive species (14). The antioxidant activity is measured through enzymes as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Ischemia produces hypoxanthine from the cascade of ATP degeneration. Hypoxanthine combines with oxygen from reperfusion resulting in superoxide. SOD catalyzes the peroxide of hydrogen formation from the superoxide. Peroxide of hydrogen is overactive oxygen specie, although is not a free radical. Peroxide of hydrogen is responsible for radical hydroxyl production, which is very toxic. In order to clean up the dangerous peroxide of hydrogen before its transformation in radical hydroxyl, catalase (CAT) turns down peroxide of hydrogen in water. Hence, CAT is considered a protective enzyme. Besides the enzymes, the lipid peroxidation may be evaluated through thiobarbituric acid reactive species (TBARS) determination. SOD, CAT and TBARS are evaluated from tissues samples. To systemic assessment, f₂-isoprostanes (F₂IP) from plasma can be useful to observe lipid peroxidation. Nitrites (NO₂) and nitrates (NO₃) from tissue are useful to evaluate nitric oxide (NO) metabolism (15). Qualitative analyze of renal tissue is obtained from histological examination (5).

It is known that hypothermia is associated to protection against I/R injury (1), however there is not any experimental systematic study *in vivo* that demonstrate what range of temperature protects kidney, although this information has already been available for the liver (2,3). That gap of information is important because is relevant

know how much cooling is necessary to achieve renal protection without causing hypothermic damage (8,16).

Materials and Methods

Animals, anesthesia, and surgical procedure: 28 males Wistar adult rats, weighting between 240g and 487g, were kept in cages with free access to water and feed. The cages were acclimatized, including light control and noise control. The cages with the animals were kept in the Animal Experimentation Center (*Hospital de Clínicas, Porto Alegre, Brazil*). All procedures had received approval from the Animal Research Ethical Committee (Research and Post-Graduation Group, *Hospital de Clínicas, Porto Alegre, Brazil*) according to the Good Animal Practice guidelines (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Institute of Health, Bethesda, US, 2011). The rats were weighted and underwent general anesthesia with intra-peritoneal administration of Ketamine (75mg/Kg) and Xylazine (10mg/Kg). Rear paw reflexes were tested to ensure that full general anesthesia was achieved. The animal was put in a warm surgical table (37°C) and oxygen (1 L/min) was administrated through campanula. Before abdominal incision, Bupivacaine 0.5% was injected in the abdominal wall (between skin and muscle) to ensure pain control during and after the procedure. A longitudinal median incision was made, and surgical retractors were applied. Right nephrectomy was performed. Half of the right kidney was sent in formalin to histological examination, and the other half in liquid nitrogen to -80°C freezer. Afterwards the left kidney had his vessels clamped for 40 minutes (ischemia). The left kidney was insulated from the rest of the abdominal cavity through the application of an isolation made of latex and polystyrene. The left kidney target-

temperature was achieved through the controlled dropping of cooled or even iced saline solution and kept during all the time of ischemia (40 minutes). After this time, the renal pedicle was unclamped (start of the warm reperfusion). The abdominal wall was closed with two layers of sutures. As the abdominal closure had been completed, the animal was moved to a warmed new cage, with water, but without feed. After 240 minutes of reperfusion, the rat was moved from the cage to the surgical table. New anesthesia was done with the same doses of Ketamine and Xylazine, but this time the way of administration adopted was intra-muscular instead of intra-peritoneal to avoid the previous violation of the peritoneal cavity. The abdominal wall sutures were removed and left nephrectomy was done. The same procedures applied to the right kidney were made for the left one. Blood sample was collected through heart puncture. Cardiectomy was performed to ensure the animal death still under anesthesia.

Adjustment of left kidney temperature: During the 40 minutes of ischemia, the cortical left kidney temperature was assessed with an intra-parenchymal probe connected to a specific thermometer (BAT 12, IITC Life Science, W.Hills, CA, US). The microprobe was inserted short before of the placement of the vascular clamp. To avoid systemic hypothermia (groups G2, G3 and G4) the left kidney was carefully placed on a specially designed concaved-shaped polystyrene well. This equipment had prevented the leaking of cooled solution from around the kidney to the rest of the abdominal cavity. A vacuum device was connected inside the well to aspirate the solution used to cool down the kidney. The local hypothermia was achieved through the dropping of iced normal saline solution on the outer kidney surface. To keep the normal systemic temperature, the animal was warmed with blankets made of surgical sponges (cotton) and aluminum foil. The surgical table was electrically warmed. For the

systemic temperature measurement we applied a common electronic rectal thermometer (Termomed 1.0, ref. 29832, Incoterm, Brazil) (2,17–19).

Experimental Protocol: The effects of I/R (40min/240min) on markers of lipid peroxidation were evaluated in four groups: Group 1, I/R without cooling (G1, 37°C); group 2, I/R with mild renal hypothermia (G2, 26°C); group 3, I/R with moderate renal hypothermia (G3, 15°C); group 4, deep renal hypothermia (G4, 4°C). For statistical purposes, the right kidney of all animals in all groups had been considered as the group 0 (G0, control group, without I/R). In each group there were 7 rats (total of 28 animal in the control group). A total of 30 animals underwent laparotomy, but two rats died due to hypovolemic shock (fatal vascular injury during dissection). These two deceased rats were not included in the sample.

Assessment of the lipid peroxidation markers: For SOD it was employed a method based on inhibition of the adrenochrome through the autoxidation of adrenaline by the SOD (20). The change on the absorbance spectrophotometric of the adrenaline has indicated SOD. The CAT activity was assessed by the velocity of peroxide decomposition in water and oxygen through the peroxide absorbance measured by spectrometry. For TBARS it was made a measure of the malondialdehyde (MDA) absorbance by spectrometer on the presence of thiobarbituric acid. The quantification of proteins was obtained by the Lowry method. For plasmatic F2-IP it was performed an evaluation through the ALX-850-205-KI01 8-iso Prostaglandin F2-alpha EIA kit (F2-isoprostanos; Enzo Life Sciences International, Inc., US). Nitrate reductase associated with NADPH cofactor, TrisBuffer, glucose-6-phosphate and also glucose-6-phosphate-dehydrogenase were used to measure NO₂ and NO₃.

Histology: Half of each kidney has been fixed in formalin, put in paraffin, cut in slides and colored with hematoxylin and eosin. The criteria employed to classify the findings were an adaptation of the work of Jablonski et al. (5). According to these authors, there are four grades of lesion: 1. Mitosis and necrosis of individual cells; 2. Necrosis of all cells in adjacent proximal convoluted tubules, with survival of surrounding tubules; 3. Necrosis confined to the distal third of the proximal convoluted tubule with a band of necrosis extending across the inner cortex; 4. Necrosis affecting all three segments of the proximal convoluted tubule. We created the grade zero to designate normal findings.

Statistics: Data are presented as means \pm standard deviation. For the variables with normal distribution it was used one-way ANOVA. Bonferroni post-test was employed to analyze the differences among the means. The non-parametric test Kruskal-Wallis was used to the histology findings. P value < 0.05 were considered significant.

Results

Histology: There was not evidence of any kind of lesion in control group (right kidney, G0, without I/R), but all remaining groups showed variable levels of damage, regardless if under hypothermia (G2, G3, G4) or not (G1). Examining the 3 hypothermic groups no difference was found among them, taken into account the grade of lesions (1 to 4). The average grade of injury on G0 was zero with a standard deviation of zero. On the remaining groups, the respective means and standard

deviations found were: G1 2.57 ± 1.13 ; G2 1.71 ± 1.25 ; G3 2 ± 1.15 ; G4 2.57 ± 1.13 . The difference between the G0 and all ischemic groups (G1 to G4) has had a P value = 0.005 (G0xG2) and $P < 0.001$ (G0xG1; G0xG3; G0xG4). (Figure 1)

TBARS: It was found a statistically significant difference between the control group (G0) and all the I/R groups (G1-G4), regardless the renal target-temperature. The respective means and standard deviation were: G0 1.31 ± 0.05 ; G1 1.67 ± 0.07 ; G2 1.85 ± 0.13 ; G3 2.05 ± 0.20 ; G4 1.95 ± 0.13 . The units of the above means were expressed in nmol/mg of protein. $P < 0.004$ G0 x I/R groups. (Figure 2)

CAT: It was found a statistically significant difference between the most hypothermic group (G4, 4°C) and the normothermic group (G1, 37°C). The mean found to catalase was expressed in pmol/mg of protein. Means and standard deviations observed were: (G1= 2.32 ± 0.30) x (G4= 1.03 ± 0.30), with a $P = 0.03$ (G1xG4); (G0= 1.95 ± 0.01), with a $P = 0.08$ (G0xG4). The remaining comparisons among the groups had no difference with statistic significance. (G0 = 1.954 → G1 = 2.323* → G2 = 1.282 → G3 = 1.179 → G4 = 1.038* pmol/mg of protein). * $P = 0.03$. (Figure 3)

SOD: No significant difference was found among the 5 groups. The respective means and standard deviations observed were: G0 15.6 ± 0.43 ; G1 17.4 ± 1.42 ; G2 18.3 ± 1.45 ; G3 16.9 ± 0.81 ; G4 15.7 ± 0.95 . The units of the above means were expressed in U SOD/mg of protein. (Figure 4)

NO₂ and NO₃: No significant difference was found among the 5 groups for NO₂ as well as NO₃. The means and standard deviations observed for NO₂ and NO₃

respectively were: G0 0.83 ± 0.00 and 2.07 ± 0.17 ; G1 0.07 ± 0.00 and 2.11 ± 0.28 ; G2 0.08 ± 0.00 and 2.89 ± 0.25 ; G3 0.79 ± 0.00 and 2.36 ± 0.32 ; G4 0.07 ± 0.01 and 2.054 ± 0.270 . The units of the above means were expressed in $\mu\text{mol/L}$.

Protein: No significant difference was found among the 5 groups. The respective means and standard deviations observed were: G0 6.65 ± 0.07 ; G1 6.07 ± 0.28 ; G2 6.09 ± 0.37 ; G3 6.84 ± 0.26 ; G4 6.99 ± 0.23 . The units of the above means were expressed in mg/mL .

F2IP: it was measured on plasma instead of the renal tissue. No significant difference was found among the 4 experimental groups. The respective means and standard deviation observed were: G1 205 ± 65.7 ; G2 195 ± 32.6 ; G3 203 ± 92.2 ; G4 189 ± 71.6 . The units of the above means were expressed in pg/mL .

Discussion

The results presented above show interesting aspects about what was going on the adult Wistar rats' kidneys during an acute experiment with 40 minutes of ischemia followed by 240 minutes of reperfusion. According to Jablonski et al., 30 minutes of warm ischemia are enough to induce alterations on the proximal convoluted tubules from rats' kidneys. After 60 minutes of warm ischemia there is severe tubular necrosis (5). Our histologic analyses demonstrate that the model designed was adequate to offer a good control group (right kidney). This conclusion is based on the normal findings in 100% of kidneys from a huge sample formed by 28 animals. Another important conclusion regarding the histology is that all the groups whose animals had undergone

ischemia, regardless the target-temperature, showed significant changes when compared to the controls. Although any statistical significance had not occurred between the I/R normothermic's group (G1) and the I/R hypothermic groups (G2-G4), it was observed a trend to worse lesions in the extremes temperature groups: G1 (37°C) and G4 (4°C). Nonetheless, those findings did not have achieved statistical significance, maybe due to the short time of reperfusion (acute experiment). Maybe a study designed to have a longer reperfusion time could show even better results for the intermediate ranges of temperature (G2 and G3), but that is just a matter of speculation (the present data are not enough to reach this conclusion). Moreover the outcomes derived from TBARS analyses had matched with the histologic results, since the TBARS had higher averages in all I/R groups compared to the control group. As well as the histology analyses, evaluation of TBARS revealed significant difference between the control group and the remaining groups. However the temperature did not interfered with the TBARS results. The significantly lesser value of TBARS when I/R was not present is an evidence that free radicals production happened on the presence of I/R, because TBARS is a very sensible marker of lipid peroxidation of the cell membrane (3). The most interesting outcome, however, came from the assessment of CAT, which is a quite important enzyme. It converts peroxide in water, leading to its inactivation (10–15). On the presence of warm ischemia followed by reperfusion, the CAT usually rises in order to protect against the lipid peroxidation. When a protection factor is present concomitantly with I/R, as hypothermia, for instance, CAT cannot undergo an increment even in the presence of I/R, because the addition of cooling might dispense the antioxidant effect of CAT. Our data demonstrate that CAT has risen in G1 (warm I/R) in relation to G0 (control without I/R), and then CAT began to progressively fall soon as the temperature has been becoming lower. Therefore, the control group showed the basal level of CAT

when I/R was not present. When warm ischemia was induced, CAT has increased. Nevertheless, on the presence of intense hypothermia (G4, 4°C) CAT has significantly decreased compared with the normothermic ischemic group (G1), with a *P* value < 0.03. These findings has taken place due to the protection against lipid peroxidation offered by deep hypothermia, suggesting that the need of antioxidant's CAT proprieties during the period of I/R were reduced. According to the results obtained for CAT, the target-temperature should be 4°C in order to obtain antioxidant effect. However, this statement had no correspondence on histological examination (in 4 hours of reperfusion). Besides, there were no differences among the hypothermic groups relative to the CAT activity. SOD had no statistically significant difference among the groups. Interestingly the SOD had the onset of its decreasing on G3 (15°C) and the value has kept going down until reach on G4 (4°C) with almost the same value found on G0 (control). For NO₂, NO₃ (renal tissue) and F2IP (plasma), no significant difference was detected among the groups. Concluding, the results obtained suggest that the experimental model here presented was adequate to show the occurrence of histological changes derived from I/R compared with controls. Moreover, this model was able to increase the release of TBARS when lipid peroxidation was present (under I/R). Another important conclusion is that the increased catalase during profound hypothermia (4°C) suggests that this level of temperature is associated with higher antioxidative effect.

Acknowledgements

The authors thank Marta Cioato, nurse from the Animal Experimentation Center*, as well as Vânia Naomi Hirakata, statistical counselor from the Group of Research and Post-Graduation*. We also thank the Department of Pathology* and the Laboratory of Physiology and Experimental Hepatology*.

* All facilities above localized on the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, Brazil.

Financial Support

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

References

1. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*. 1988 abr;45(4):673-6.
2. Biberthaler P, Luchting B, Massberg S, Teupser D, Langer S, Leiderer R, et al. The influence of organ temperature on hepatic ischemia-reperfusion injury: a systematic analysis. *Transplantation*. 2001 nov 15;72(9):1486-90.
3. Behrends M, Hirose R, Serkova NJ, Coatney JL, Bedolli M, Yardi J, et al. Mild hypothermia reduces the inflammatory response and hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Liver Int*. 2006 ago;26(6):734-41.

4. Tveita T, Johansen K, Lien AH, Myklebust R, Lindal S. Morphologic changes in tubular cells from in situ kidneys following experimental hypothermia and rewarming. *APMIS*. 2005 jan;113(1):13-20.
5. Jablonski P, Howden BO, Rae DA, Birrell CS, Marshall VC, Tange J. An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia. *Transplantation*. 1983 mar;35(3):198-204.
6. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006 jun;17(6):1503-20.
7. Mangino MJ, Tian T, Ametani M, Lindell S, Southard JH. Cytoskeletal involvement in hypothermic renal preservation injury. *Transplantation*. 2008 fev 15;85(3):427-36.
8. Bartels-Stringer M, Kramers C, Wetzels JFM, Russel FGM, Groot H de, Rauwen U. Hypothermia causes a marked injury to rat proximal tubular cells that is aggravated by all currently used preservation solutions. *Cryobiology*. 2003 ago;47(1):82-91.
9. McCord JM. The superoxide free radical: its biochemistry and pathophysiology. *Surgery*. 1983 set;94(3):412-4.
10. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 2004 maio;142(2):231-55.

11. Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes Metab.* 2007 nov;9(6):813-39.
12. Mayne ST. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J. Nutr.* 2003 mar;133 Suppl 3:933S-940S.
13. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 2005 mar 23;53(6):1841-56.
14. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 4^o ed. Oxford University Press, USA; 2007.
15. Bulkley GB. Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. *Br. J. Cancer Suppl.* 1987 jun;8:66-73.
16. Ahmad N, Hostert L, Pratt JR, Billar KJ, Potts DJ, Lodge JPA. A pathophysiologic study of the kidney tubule to optimize organ preservation solutions. *Kidney Int.* 2004 jul;66(1):77-90.
17. Grezzana Filho T de JM, Mendonça TB de, Gabiatti G, Rodrigues G, Marroni NAP, Treis L, et al. Topical hepatic hypothermia plus ischemic preconditioning: analysis of bile flow and ischemic injuries after initial reperfusion in rats. *Acta Cir Bras.* 2011 jun;26(3):194-201.
18. Grezzana Filho T de JM, Mendonça TB de, Gabiatti G, Krueel CDP, Corso CO. Topic liver hypothermia and ischemic preconditioning: a new model of ischemia and reperfusion in rats. *Acta Cir Bras.* 2009 ago;24(4):262-6.

19. Grezzana Filho T de JM, Corso CO, Zanotelli ML, Marroni CA, Brandão ABM, Schlindwein E, et al. Liver glutathione depletion after preservation and reperfusion in human liver transplantation. *Acta Cir Bras.* 2006 ago;21(4):223-9.
20. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 1972 maio 25;247(10):3170-5.

LIST OF FIGURES OF THE PAPER

Figure 1: Results of histological analysis. * $P < 0.001$ between G0 and all the other groups. No statistically significant difference was founded among the groups under I / R. (PAGE 93)

Figure 2: TBARS. G0 had significantly lower values than the other groups. No difference between groups subjected to ischemia. * $P < 0.001$. (PAGE 93)

Figure 3: CAT. G1 (37 ° C) had a value significantly greater than G4 (4 ° C). * $P = 0.03$. (PAGE 94)

Figure 4: SOD. No difference between groups.(PAGE 94)

FIGURES OF THE PAPER

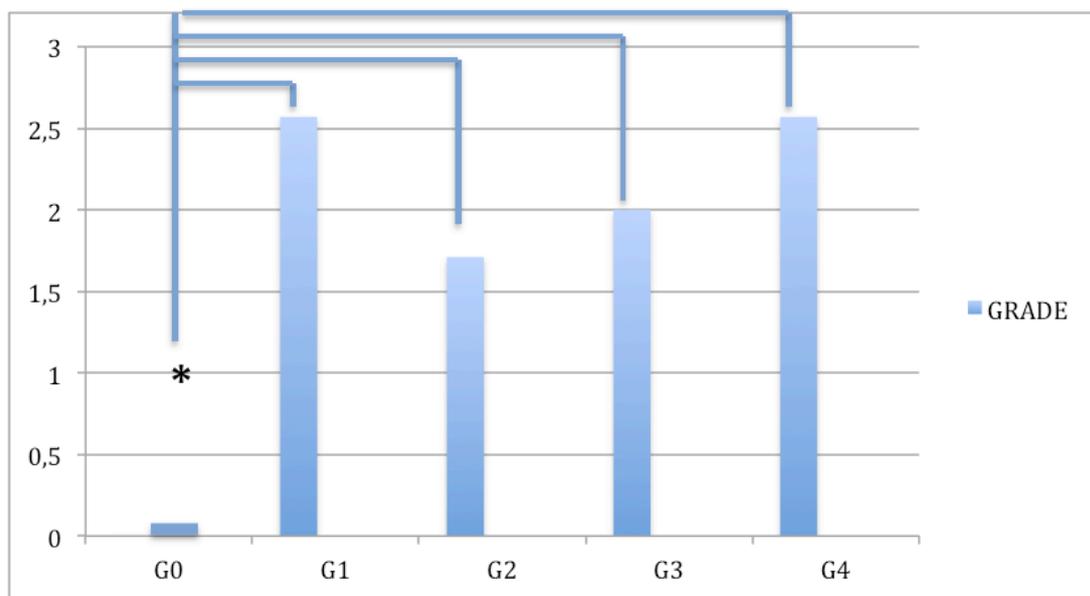


Figure 1: Results of histological analysis. * $P < 0.001$ between G0 and all the other groups. No statistically significant difference was founded among the groups under I / R.

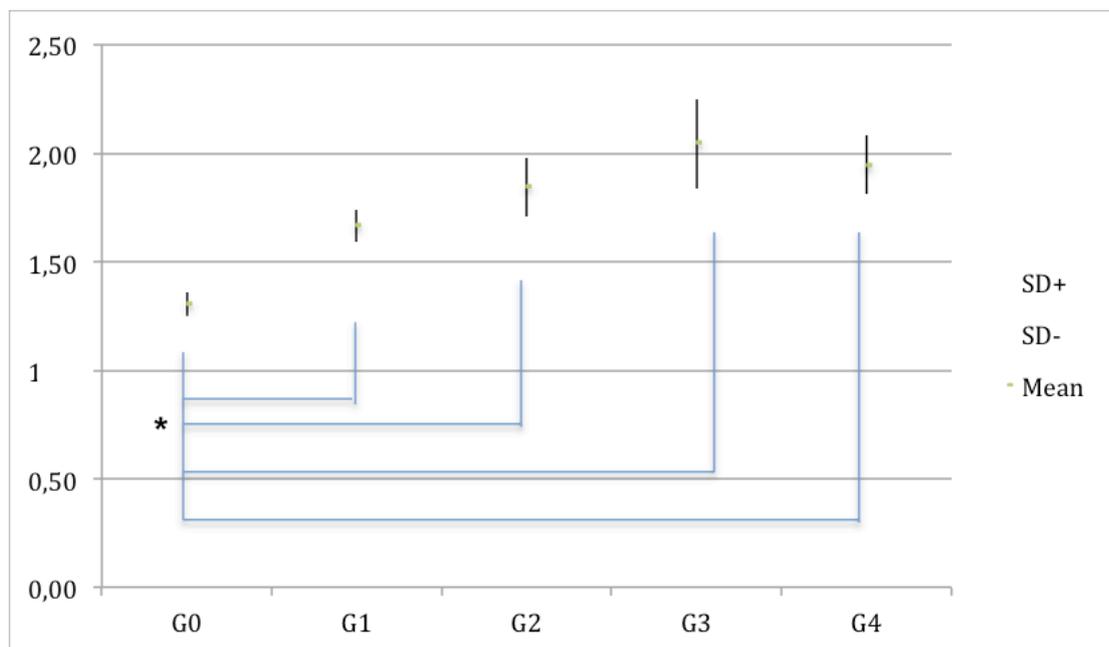


Figure 2: TBARS. G0 had significantly lower values than the other groups. No difference between groups subjected to ischemia. * $P < 0.001$

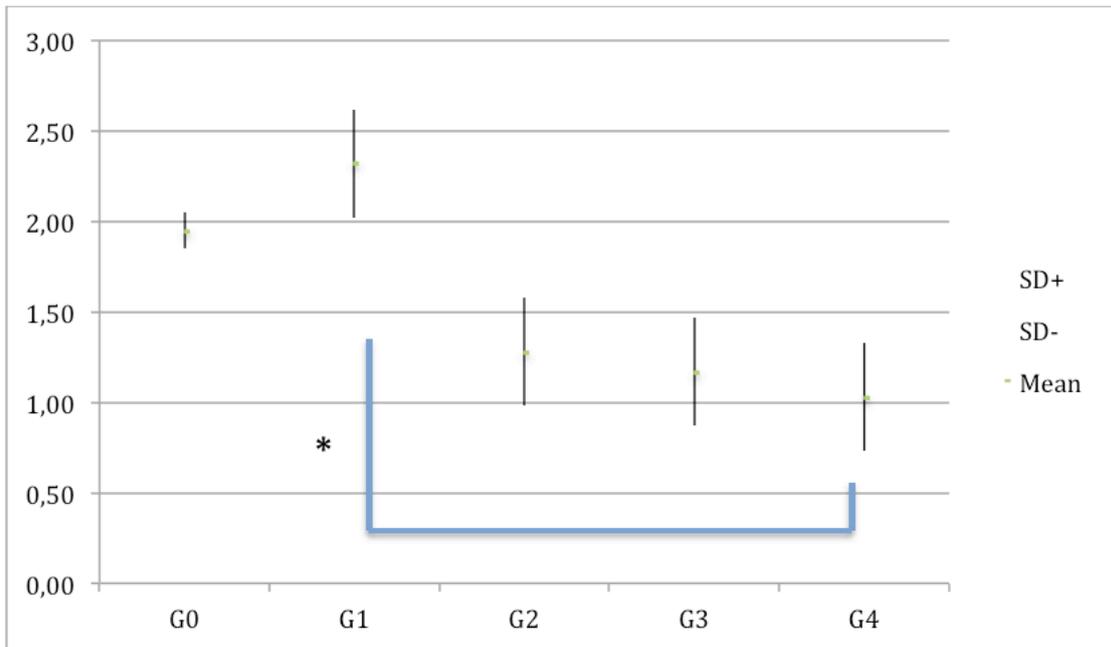


Figure 3: CAT. G1 (37 ° C) had a value significantly greater than G4 (4 ° C). * $P = 0.03$. SD= standard-deviation, M= mean, G= group.

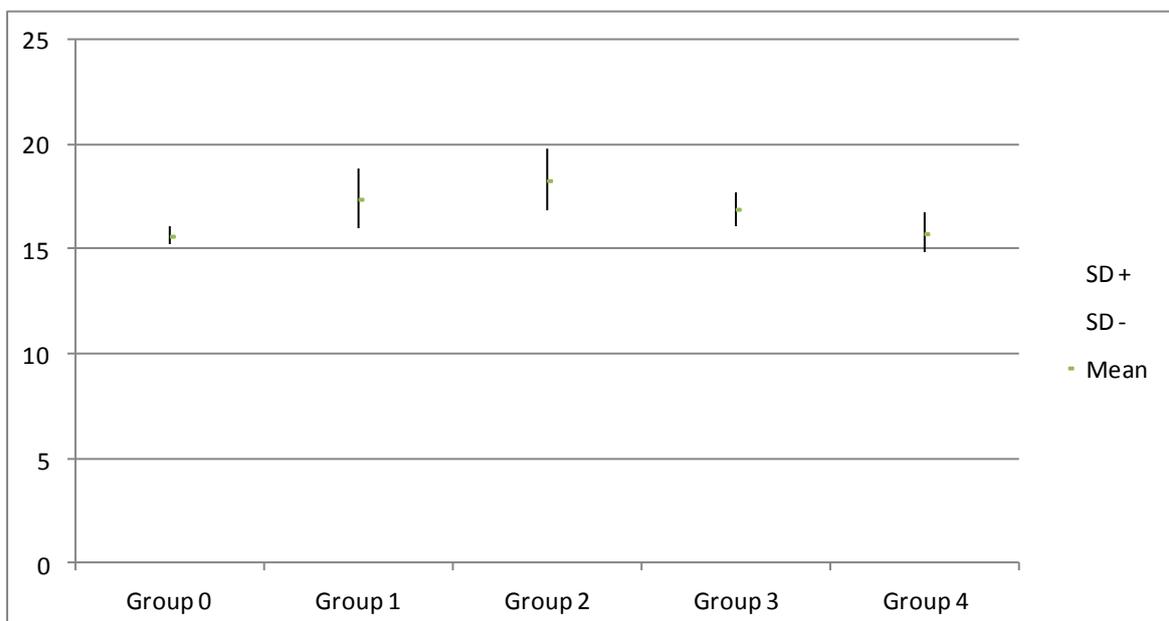


Figure 4: SOD. No difference between groups.

ARTIGO EM PORTUGUÊS

ARTIGO

**Avaliação de Estresse Oxidativo em Isquemia e Reperusão Renal sob
Vários Graus de Hipotermia em Ratos**

Emanuel Burck dos Santos¹, Walter José Koff², Tomaz de Jesus Maria Grezzana Filho³, Samanta Daiana De Rossi⁴, Lisiane Treis⁴, Silvia Regina Bona⁵, Karla Laís Pêgas⁶, Betina Katz⁷, Fabíola Schons Meyer⁸, Norma Anair Possa Marroni⁹, Carlos Otávio Corso¹⁰.

¹Médico do Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Mestre em Medicina: Ciências Cirúrgicas. Aluno do Curso de Doutorado em Medicina: Ciências Cirúrgicas da Faculdade de Medicina (FAMED) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

²Médico. Professor Titular do Departamento de Cirurgia da UFRGS. Livre-Docente.

³Médico do Serviço de Cirurgia do HCPA. Mestre e Doutor em Medicina: Ciências Cirúrgicas.

⁴Acadêmicas da FAMED (UFRGS).

⁵Bióloga. Mestre em Medicina: Ciências Médicas. Aluna do Curso de Doutorado em Medicina: Ciências Médicas da FAMED (UFRGS).

⁶Médica patologista do HCPA. Mestre em Patologia.

⁷Médica-Residente em Patologia do HCPA.

⁸Médica Veterinária. Mestre em Ciências Veterinárias. Coordenadora Veterinária do Centro de Experimentação Animal do HCPA.

⁹Bióloga. Professora do Programa de Pós-Graduação (PPG) em Fisiologia da UFRGS. Professora do PPG em Medicina: Ciências Médicas da UFRGS. Mestre, Doutora e Pós-Doutora em Fisiologia. Coordenadora do Laboratório de Hepatologia Experimental da UFRGS.

¹⁰Médico. Professor Associado do Departamento de Cirurgia da UFRGS. Doutor e Pós-Doutor em Medicina.

Resumo

Introdução: embora lesão por isquemia e reperfusão (IR) renal possa ser reduzida por resfriamento, nenhuma análise sistemática *in vivo* da influência da temperatura foi empregada até o momento para avaliar o efeito de diferentes temperaturas nos danos provocados IR renal.

Material e Métodos: ratos adultos foram randomizados para quatro grupos experimentais com 7 animais em cada grupo. No grupo 1 a temperatura renal tópica foi sem resfriamento (temperatura sistêmica); no grupo 2 foi induzida hipotermia local leve (26°C); no grupo 3 a hipotermia tópica foi moderada (15°C); no grupo 4 foi profunda (4°C). A temperatura sistêmica foi medida por termômetro retal. Já a temperatura cortical renal foi medida por termômetro com sonda intraparenquimatosa. Sob anestesia geral procedeu-se com nefrectomia direita (rim controle). O rim esquerdo teve interrupção do fluxo arterial ao longo de 40 minutos (isquemia). De acordo com o grupo, o rim era ou não resfriado ao longo do período isquêmico. O rim era então reperfundido e o abdome era suturado. Após 240 minutos de reperfusão os animais eram reoperados sob nova anestesia geral. O rim esquerdo e sangue foram coletados. Os desfechos foram avaliação histopatológica, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), ácido tiobarbúrico (TBARS), nitritos (NO₂), nitratos (NO₃) teciduais, e F2-isoprostanos (F2IP) séricos.

Resultados: o exame histopatológico revelou que I/R (40'/240') provocou lesão renal, independentemente da temperatura cortical renal, quando comparado com o grupo controle ($P < 0.001$). TBARS, um dos produtos da peroxidação lipídica, mostrou aumento em todos os grupos submetidos a IR, independentemente da temperatura, em relação ao grupo controle. Houve aumento da catalase no grupo I/R normotérmico (G1,

37°C) quando comparado ao grupo controle. À medida que a temperatura era diminuída no grupo I/R, ocorreu progressiva diminuição da catalase em relação ao controle, mas sobretudo em relação ao I/R normotérmico. Foi detectada uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo I/R normotérmico (G1, 37°C) e o grupo submetido à hipotermia profunda (G4, 4°C), com um $P < 0.03$. A avaliação dos demais marcadores de desfecho não mostrou diferenças estatisticamente significativas.

Conclusões: isquemia renal de 40 minutos seguida de reperfusão por 240 minutos provocou lesão renal com alterações histopatológicas e também em um marcador de estresse oxidativo (TBARS). A avaliação da catalase, enzima protetora que reage com o radical peróxido de hidrogênio, demonstrou que hipotermia profunda (4°C) foi provavelmente protetora, embora não tenha havido tradução histopatológica dessa proteção, nesse experimento agudo (240 minutos de reperfusão pós-isquêmica).

Introdução

Em transplantes é amplamente aceito que hipotermia protege os órgãos contra os danos provocados por isquemia e reperfusão (1). Embora a temperatura preconizada para preservação seja de 4°C, já foi demonstrado que para o fígado uma temperatura de 26°C já seria adequada, sem necessidade de resfriamento profundo (2). A indução de hipotermia leve é metodologicamente mais simples e menos associada a dano pelo resfriamento em si, além de impactar menos sobre a temperatura sistêmica do que a hipotermia profunda (3). Apesar da demonstração de que a hipotermia leve (26°C), em camundongos, é suficiente para diminuir os danos por isquemia e reperfusão hepática, não há estudos em relação ao rim (2). Há inclusive um estudo em ratos em que

hipotermia hepática muito leve (34°C) foi o bastante para oferecer proteção, não havendo diferença nem mesmo com 31°C de resfriamento tóxico (4).

O alvo primário dos danos por isquemia e reperfusão renal, considerando um período de 30 minutos de isquemia, é o túbulo contorcido proximal, sendo que há relativa preservação glomerular (5,6). A intensidade da necrose está relacionada ao tempo de isquemia, com início da recuperação da necrose tubular em dois dias (5). O aumento do tempo de preservação renal hipotérmica fora do corpo (*cold storage*) com solução UW (Universidade de Wisconsin) causa alterações na proteína sódio-potássio trifosfato de adenosina e na proteína ezrin do citoesqueleto. Isso leva uma cascata, tempo-dependente, de deterioração na função tubular da membrana, fenômeno que é observado durante a preservação a frio. Esse armazenamento hipotérmico causa, portanto, ruptura de importantes elementos do citoesqueleto nos túbulos renais, que contribuem com o dano provocado pelo reaquecimento (7). A preservação hipotérmica resulta em morte celular através da formação de espécies reativas de oxigênio ferro-dependente, levando a apoptose durante o reaquecimento. A lesão induzida por hipotermia sem isquemia em células do túbulo contorcido proximal de ratos está associada à perda do potencial de membrana mitocondrial, independentemente da solução de preservação utilizada ser UW (Universidade de Wisconsin), Euro-Collins, ou Custodiol HTK (Histidina-Triptofano-Ketoglutarato) (8).

A formação de espécies reativas de oxigênio provoca peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica ocorre pela reação dos radicais livres (espécies reativas com elétron desemparelhado) com os lipídios que formam as membranas mitocondriais e celulares (9). Os radicais livres são espécies muito instáveis, sendo sua mensuração

tecnicamente muito difícil (10). Para se avaliar a produção de radicais livres, a peroxidação lipídica e a atividade protetora antioxidante, são utilizadas medidas de marcadores indiretos desses fenômenos (11–14). Para avaliação da atividade enzimática antioxidante podem ser avaliadas as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) teciduais. A SOD catalisa a formação do peróxido de hidrogênio a partir do superóxido formado a partir da oxidação da hipoxantina produzida durante a isquemia em combinação com o oxigênio fornecido pela reperfusão. Embora o peróxido de hidrogênio não seja um radical livre, ele é uma molécula relativamente estável e com grande capacidade de cruzar as membranas lipídicas, e forma facilmente o radical livre mais reativo e tóxico envolvido na peroxidação lipídica: o radical hidroxila. Já a CAT atua como protetora por catalisar a reação que elimina o peróxido de hidrogênio, evitando a formação do radical hidroxila. A reação da CAT com o peróxido de hidrogênio forma água. Além da avaliação enzimática antioxidante, o estresse oxidativo pode ser medido indiretamente através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), resultando em uma avaliação da peroxidação lipídica tecidual renal. Para a avaliação da repercussão sistêmica da peroxidação lipídica se pode medir o F2-Isoprostanos (F2IP). Os nitritos (NO_2) e nitratos (NO_3) teciduais são úteis para a mensuração do metabolismo do óxido nítrico (NO) (15). Para a análise qualitativa do dano tecidual renal o exame histopatológico é bastante útil, considerando que a isquemia e a reperfusão estão associadas a alterações histológicas, sobretudo em túbulos contorcidos proximais renais (5).

Embora se saiba que a hipotermia está associada à proteção contra os danos provocados por isquemia e reperfusão (1), não há nenhum estudo experimental renal, sistematizado *in vivo*, tal qual há para o fígado (2), com o intuito de avaliar que nível de

temperatura regional confere proteção, considerando que a hipotermia em si pode estar relacionada à ocorrência de danos teciduais (8,16). O objetivo deste estudo é comparar níveis de resfriamento em isquemia e reperfusão renal e determinar se há diferença em relação a dano tecidual qualitativo (histológico) nos diferentes grupos de temperatura, bem como os efeitos da temperatura tópica em marcadores de estresse oxidativo.

Material e Métodos

Animais, anestesia, procedimento cirúrgico: ratos Wistar, do sexo machucado, adultos, pesando entre 240g e 487g, mantidos em condições padrão de alojamento, com livre acesso a ração e a água. O ambiente das gaiolas era climatizado e silencioso, com iluminação controlada. Os animais ficaram alojados no Centro de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA, 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 animal designado para o experimento era pesado e então submetido à anestesia geral através da injeção intraperitoneal de Ketamina (75 mg/Kg) e de Xilazina (10 mg/Kg). Reflexos eram testados a fim de assegurar que anestesia foi obtida em nível adequado. Oxigênio a 1 L/min foi administrado por cânula ao longo da cirurgia. Antes da incisão procedeu-se com injeção do anestésico local Bupivacaína 0,5% ao longo da linha média do abdome, para garantir controle da dor no pós-operatório e pelo seu efeito adjuvante no controle da dor no transoperatório. A incisão foi mediana (longitudinal) se estendendo do epigástrico ao hipogástrico. Foi usado afastador cirúrgico autoestático preso à mesa cirúrgica aquecida à

37°C. Para exposição do campo operatório foram introduzidas gazes úmidas na cavidade abdominal. O rim direito foi então dissecado e o pedículo exposto. Sob magnificação de imagem com o auxílio de lupa cirúrgica foi ligado o pedículo e o rim removido. O rim direito foi seccionado transversalmente ao meio. Cada metade do órgão recebia um destino: formalina e nitrogênio líquido. Passava-se então para o lado esquerdo. O rim era dissecado e o pedículo exposto. O rim era isolado com protetor de látex e de poliestireno. O pedículo era clipado a fim de que se interrompesse a circulação para o rim esquerdo durante 40 minutos (tempo de isquemia). A temperatura era mantida no alvo até o fim da isquemia (início da reperfusão). Após o restabelecimento da circulação renal esquerda, o isolamento de látex e poliestireno era removido, bem como as gazes. A cavidade era aspirada para retirar o excesso de solução fisiológica. O abdome era suturado. Os animais eram transferidos para uma incubadora, com água a vontade, por 240 minutos (reperfusão). Após esse período, eram submetidos a nova anestesia com Ketamina (75 mg/Kg) e Xilazina (10 mg/Kg) intramuscular. A incisão abdominal era reaberta e o rim esquerdo era coletado (metade em formalina e metade em nitrogênio líquido). Procedia-se com punção cardíaca para coleta de 2mL de sangue após isquemia e reperfusão. Para encerrar o procedimento coletamos o coração e os pulmões.

Ajustes da temperatura tópica e da temperatura sistêmica: 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 para o termômetro BAT-12 (IITC *Life Science*, Woodland Hills, Califórnia, EUA) ligada ao termômetro intraparenquimatosa BAT-12 (IITC *Life Science*, Woodland Hills, Califórnia, EUA). O termômetro era inserido instantes após o

clipamento do pedículo. Para que o resfriamento do rim, nos grupos hipotérmicos, não provocasse resfriamento sistêmico, os rins eram isolados da cavidade com molde côncavo de poliestireno confeccionado artesanalmente para o experimento. Também se usava isolamento de látex com o propósito de tornar mais impermeável. O rim era resfriado através de gotejo controlado de solução fisiológica gelada até atingir a temperatura-alvo. Uma vez alcançada a temperatura ela era mantida constante até o final da isquemia. Para evitar o resfriamento sistêmico, além do isolamento renal, a mesa cirúrgica era aquecida e o animal era coberto com gaze e papel alumínio. A temperatura sistêmica era monitorada por termômetro retal (Termomed 1.0, ref. 29832, Incoterm, Brasil) (2,17–19).

Protocolo experimental: o estresse oxidativo causado por isquemia e reperfusão (respectivamente 40 e 240 minutos) foi pesquisado em quatro grupos, com sete animais em cada: grupo 1, eutérmico (cerca de 37°C); grupo 2, hipotermia leve (exatamente 26°C); grupo 3, hipotermia moderada (exatamente 15°C); grupo 4, hipotermia intensa (exatamente 4°C). Para fins de cálculos estatísticos, o rim direito de todos os grupos foi considerado o grupo 0 (grupo controle, com 28 animais). Foram operados 30 animais, mas apenas 28 foram incluídos. A não inclusão de dois ratos se deveu a morte transoperatória em virtude de choque hemorrágico fatal por lesão durante a dissecação vascular.

Análise dos marcadores de peroxidação lipídica: para a superóxido dismutase (SOD) foi utilizado um método baseado na inibição da formação de adrenocromo na auto-oxidação da adrenalina pela SOD (20). Quanto maior é a concentração de SOD na amostra, menor é a auto-oxidação da adrenalina. O SOD foi medido através da mudança

espectrofotométrica da absorbância da adrenalina. A atividade da catalase (CAT) era determinada pelo método de Chance (1954). A velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio pela ação da CAT foi medida espectrofotometricamente pela absorbância do peróxido de hidrogênio. Para a medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi medido, espectrofotometricamente, o malondialdeído (MDA) na presença de ácido tiobarbitúrico. A quantificação de proteínas foi usado o método de LOWRY (1951). Para os F2-isoprostanos (F2IP) foi realizado ensaio imuno-enzimático para detecção plasmática utilizando o kit ALX-850-205-KI01 8-iso Prostaglandin F2-alpha EIA (F2-isoprostanos; Enzo Life Sciences International, Inc.). Para a medida dos nitritos (NO_2) e dos nitratos (NO_3) foi usada a enzima nitrato redutase, associada a cofator NADPH, e o tampão TrisBuffer com glicose-6-fosfato e glicose-6-fosfato-desidrogenase.

Análise histopatológica: a metade de cada rim fixada em formalina era transferida para blocos de parafina. Os blocos eram seccionados em micrótomo e as lâminas eram coradas em hematoxilina e eosina (HE). Os critérios para avaliação histopatológica utilizados foram uma adaptação dos publicados por Jablonski (5), considerando quatro graus de lesão: 1.Mitoses e necrose celular individual; 2. Necrose de todas as células nas adjacências do túbulo contorcido proximal, com sobrevivência dos túbulos circunjacentes; 3.Necrose confinada ao terço distal do túbulo contorcido proximal com uma banda de necrose se estendendo no interior do córtex renal; 4.Necrose afetando todos os três segmentos do túbulo contorcido proximal. Nos criamos o grupo 0 para ausência de lesão.

Análise estatística: as análises estatísticas foram por análise de variância (*one-way ANOVA*) para as variáveis com distribuição normal. As diferenças entre as médias dos grupos, quando presentes na ANOVA, foram avaliadas por correção de Bonferroni. Para os dados da patologia foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Os dados foram apresentados em média \pm o desvio padrão. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. O programa estatístico empregado foi SPSS 18.

Resultados

Patologia: o grupo controle (rim direito, G0, sem isquemia) não mostrou nenhuma lesão histológica. Todos os grupos de isquemia e reperfusão, normotérmico (G1) ou hipotérmicos (G2, G3, G4), mostraram lesões em graus variados (classificados de 1 a 4) (5). Não houve diferença entre os grupos submetidos à hipotermia, em relação ao grau das lesões encontradas, quando comparada com os três grupos de hipotermia. No G0 a média de lesões foi 0 e o desvio-padrão também 0 (nenhuma lesão, nos 28 rins avaliados). Nos demais grupos, as respectivas médias e desvios-padrões foram: G1 (isquemia sem hipotermia, 37°C) com média = 2,57 e desvio-padrão = 1,13; G2 (isquemia com hipotermia leve, 26°C) com média = 1,71 e desvio-padrão = 1,25; G3 (isquemia com hipotermia moderada, 15°C) com média = 2 e desvio-padrão = 1,15; G4 (isquemia com hipotermia intensa, 4°C) com média = 2,57 e desvio-padrão = 1,13. A diferença entre o grupo 0 (sem isquemia) e os quatro grupos isquêmicos teve $P = 0,005$ (G0-G2) e $P < 0,001$ (G0-G1; G0-G3; G0-G4). (Figura 1)

TBARS: ocorreu diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle (rim direito, grupo 0, sem isquemia) e os rins esquerdos (isquemia sem resfriamento – G1;

isquemia com hipotermia - G2, G3, G4). Entre os rins isquêmicos não houve diferença entre as temperaturas (G1 sem diferença estatística com G2, G3, e G4). G0: média = 1,31 nmol/mg de proteína e desvio padrão = 0,05; G1: média = 1,67 nmol/mg de proteína e desvio-padrão = 0,07; G2: média = 1,85 nmol/mg de proteína e desvio-padrão = 0,13; G3: média = 2,05 nmol/mg de proteína e desvio-padrão = 0,20; G4: média = 1,95 nmol/mg de proteína e desvio-padrão = 0,13. $P < 0,004$ (G0 x grupos I/R). (Figura 2)

CAT: ocorreu diferença estatisticamente significativa entre o grupo de hipotermia profunda (G4, 4°C) e o grupo isquêmico sem hipotermia (G1). O valor médio de catalase no G1 foi 2,32 pmol/mg de proteína (desvio-padrão = 0,3) e no G4 foi 1,03 pmol/mg de proteína (desvio-padrão = 0,3), $P = 0,03$ entre G1 e G4. A diferença entre o grupo controle (G0) e o G4 não foi estatisticamente significativa ($P = 0,08$), com a média do G0 de 1,95 pmol/mg de proteína (desvio-padrão = 0,01). Outras comparações entre os grupos não mostraram diferença significativa. As médias da catalase subiram levemente de G0 para G1 (de 1,95 para 2,32 pmol/mg de proteína) e então caíram progressivamente até atingir significância estatística entre G1 e G4 (G1 = 2,32 → G2 = 1,28 → G3 = 1,17 → G4 = 1,03 pmol/mg de proteína). (Figura 3)

SOD: não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os 5 grupos. As médias e os respectivos erros-padrão foram: G0 (média = 15,6 U SOD/mg de proteína; desvio-padrão = 0,43); G1 (média = 17,4 U SOD/mg de proteína; desvio-padrão = 1,42); G2 (média = 18,3 U SOD/mg de proteína; desvio-padrão = 1,45); G3 (média = 16,9 U SOD/mg de proteína; desvio-padrão = 0,81); G4 (média = 15,7 U SOD/mg de proteína; desvio-padrão = 0,95). (Figura 4)

NO₂ e NO₃: não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os 5 grupos tanto para os nitritos quanto para os nitratos. As médias e os desvios-padrão para NO₂ e NO₃ foram, respectivamente: G0 (médias = 0,83 e 2,07 U $\mu\text{mol/L}$; desvio-padrão = 0 e 0,17); G1 (médias = 0,07 e 2,11 U $\mu\text{mol/L}$; desvio-padrão = 0 e 0,28); G2 (médias = 0,08 e 2,89 $\mu\text{mol/L}$; desvio-padrão = 0 e 0,25); G3 (médias = 0,79 e 2,36 $\mu\text{mol/L}$; desvio-padrão = 0 e 0,32); G4 (médias = 0,07 e 2,05 $\mu\text{mol/L}$; desvio-padrão = 0,01 e 0,27).

Proteína: não houve diferença estatisticamente significativa nas proteínas totais do homogeneizado entre os 5 grupos. As médias e os respectivos desvio-padrão foram: G0 (média = 6,65 mg/mL; desvio-padrão = 0,07); G1 (média = 6,07 mg/mL; desvio-padrão = 0,28); G2 (média = 6,09 mg/mL; desvio-padrão = 0,37); G3 (média = 6,84 mg/mL; desvio-padrão = 0,26); G4 (média = 6,99 mg/mL; desvio-padrão = 0,23).

F2IP: a medida dos F2-isoprostanos não foi tecidual, mas sérica. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo sem resfriamento (G1) e os grupos com resfriamento (G2, G3, G4), nem entre os grupos hipotérmicos. G1: média = 205 pg/mL (desvio-padrão = 65,7); G2: média = 195,2 pg/mL (desvio-padrão = 32,6); G3: média = 203,8 pg/mL (desvio-padrão = 92,2); G4: média = 189,9 pg/mL (desvio-padrão = 71,6).

Discussão

Os resultados aqui apresentados revelam aspectos interessantes do que ocorre em um experimento agudo (40 minutos de isquemia seguidos de 240 minutos de reperfusão) em rins de ratos Wistar adultos. A primeira análise pertinente se refere aos

achados histológicos. De acordo com Jablonski, 30 minutos de isquemia quente é o bastante para que ocorram alterações nos túbulos contorcidos proximais dos néfrons de ratos, sendo que em 60 minutos já há intensa necrose tubular (5). No presente estudo os dados histológicos mostram que o modelo experimental foi adequado para mostrar que o rim direito, coletado logo após a laparotomia, é um excelente controle. Essa conclusão se baseia na ausência de alterações histológicas em 100% dos rins, em uma amostra robusta composta por 28 unidades. Da análise histológica do estudo também se verifica que os diferentes grupos de isquemia e reperfusão mostraram lesões significativas quando comparados com os controles. Embora não tenha sido demonstrada diferença entre o grupo sem resfriamento (G1) e os grupos hipotérmicos (G2, G3 e G4), houve uma aparente tendência, sem significado estatístico, para piores danos no grupo de isquemia sem resfriamento (G1, 37°C) e no grupo de hipotermia profunda (G4, 4°C). Não sabemos se em um estudo crônico (com maior tempo de reperfusão) poderia mostrar alguma diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos hipotérmicos intermediários (G2 e G3). O fato é que o modelo mostrou diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e os grupos isquêmicos, o que valida o modelo experimental juntamente com os achados de TBARS tecidual. Os dados decorrentes da análise do TBARS remetem aos encontrados no exame histológico. Houve diferença estatisticamente significativa entre o TBARS do controle em relação a todos os grupos isquêmicos, mas sem interferência da temperatura em relação a esse marcador. O TBARS significativamente menor no controle demonstra que a isquemia e reperfusão geraram radicais livres, contribuindo para a validação do modelo experimental, um dos objetivos do estudo. O TBARS é um marcador sensível da peroxidação lipídica das membranas celulares (4). Todavia, o resultado mais interessante do estudo é em relação ao que ocorreu com a catalase (CAT). A CAT é

uma importante enzima que catalisa a transformação de peróxido de hidrogênio em água, inativando o peróxido de hidrogênio (10–15). É esperado um aumento da CAT durante isquemia quente seguida de reperfusão. Em isquemia e reperfusão, o aumento da CAT tem por objetivo a remoção do peróxido de hidrogênio e a proteção das células contra danos da peroxidação lipídica, já que o peróxido de hidrogênio é transformado no radical hidroxila, altamente tóxico e reativo (10–14). Quando existe outro fator de proteção, contribuindo para a neutralização dos efeitos nocivos do estresse oxidativo, a CAT pode não sofrer um aumento. O presente estudo revelou que a CAT sofreu um aumento em relação ao controle e foi caindo progressivamente na medida em que a temperatura foi baixando. O grupo controle (sem isquemia) apresentou uma atividade basal da catalase. Quando se provocou isquemia quente, a catalase aumentou em relação ao basal. Na hipotermia profunda do grupo 4 (4°C) a CAT baixou significativamente em relação a da isquemia quente do grupo 1 ($P < 0,03$). A explicação para esse achado é que a hipotermia forneceu proteção contra a peroxidação lipídica, havendo necessidade de menos catalase que na isquemia quente. De acordo com esse resultado, 4°C é a temperatura que deve ser atingida para que ocorra efeito antioxidante, embora não tenha havido tradução histológica desta proteção. Não houve diferença entre os grupos hipotérmicos em relação à atividade da catalase, mas houve entre os extremos de temperatura como demonstrado acima. Embora as diferenças do SOD entre os diferentes grupos não tenha tido significado estatístico, se pôde observar que a SOD aumentou no grupo 1 (37°C) e no grupo 2 (26°C) em relação ao grupo 0 (controle, sem isquemia), mas começou a diminuir no grupo 3 (15°C) e continuou baixando no grupo 4 (4°C), sendo o valor encontrado no grupo 4 quase idêntico ao valor basal (do controle). Assim como para a SOD, não houve diferença estatisticamente significativa para os nitritos e nitratos teciduais. Da mesma forma, também não foi encontrada diferença dos

F2-isoprostanos séricos entre os diferentes grupos de temperatura. Novos estudos podem ser necessários para esclarecer que grupos de temperatura podem ter algum papel na recuperação renal em um período maior de observação. Também se deve lembrar que o estudo não foi desenhado para avaliar a função renal, mas para determinar a relação de grupos de temperatura com a ocorrência de peroxidação lipídica e de danos morfológicos decorrentes de isquemia e reperfusão. Estudos com acompanhamento crônico podem incluir avaliação da função renal.

Conclusões

A primeira conclusão que pode ser feita a partir dos achados do presente estudo é que um modelo experimental usando uma unidade renal para controle e outra para intervenção é factível e confiável na obtenção de danos histológicos induzidos por isquemia e reperfusão. A segunda conclusão é que esse modelo tem repercussão em marcadores de peroxidação lipídica, como se observou com o TBARS, e que é adequado para o teste de condições diferentes de temperatura. A terceira conclusão é que a hipotermia renal profunda (4°C) provocou diminuição da atividade da catalase, possivelmente por oferecer proteção contra a peroxidação lipídica, concorrendo com a catalase e diminuindo a necessidade de sua mobilização. Portanto, em um experimento agudo de isquemia renal de 40 minutos seguido por 4 horas de reperfusão em ratos, a temperatura com melhor evidência de proteção é a de 4°C.

Agradecimentos

Os autores agradecem a imprescindível colaboração de Marta Cioato, do Centro de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), e de Vânia Naomi Hirakata, estatística do Grupo de Pesquisa em Pós-Graduação do HCPA. Agradecimentos ao Serviço de Patologia do HCPA e ao Laboratório de Hepatologia e Fisiologia Experimental do HCPA.

Financiamento

Estudo financiado pelo FIPE (Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos) do HCPA.

Referências

1. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*. 1988 abr;45(4):673-6.
2. Biberthaler P, Luchting B, Massberg S, Teupser D, Langer S, Leiderer R, et al. The influence of organ temperature on hepatic ischemia-reperfusion injury: a systematic analysis. *Transplantation*. 2001 nov 15;72(9):1486-90.
3. Tveita T, Johansen K, Lien AH, Myklebust R, Lindal S. Morphologic changes in tubular cells from in situ kidneys following experimental hypothermia and rewarming. *APMIS*. 2005 jan;113(1):13-20.

4. Behrends M, Hirose R, Serkova NJ, Coatney JL, Bedolli M, Yardi J, et al. Mild hypothermia reduces the inflammatory response and hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Liver Int.* 2006 ago;26(6):734-41.
5. Jablonski P, Howden BO, Rae DA, Birrell CS, Marshall VC, Tange J. An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia. *Transplantation.* 1983 mar;35(3):198-204.
6. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006 jun;17(6):1503-20.
7. Mangino MJ, Tian T, Ametani M, Lindell S, Southard JH. Cytoskeletal involvement in hypothermic renal preservation injury. *Transplantation.* 2008 fev 15;85(3):427-36.
8. Bartels-Stringer M, Kramers C, Wetzels JFM, Russel FGM, Groot H de, Rauwen U. Hypothermia causes a marked injury to rat proximal tubular cells that is aggravated by all currently used preservation solutions. *Cryobiology.* 2003 ago;47(1):82-91.
9. McCord JM. The superoxide free radical: its biochemistry and pathophysiology. *Surgery.* 1983 set;94(3):412-4.
10. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 4^o ed. Oxford University Press, USA; 2007.
11. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 2004 maio;142(2):231-55.

12. Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes Metab.* 2007 nov;9(6):813-39.
13. Mayne ST. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J. Nutr.* 2003 mar;133 Suppl 3:933S-940S.
14. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 2005 mar 23;53(6):1841-56.
15. Bulkley GB. Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. *Br. J. Cancer Suppl.* 1987 jun;8:66-73.
16. Ahmad N, Hostert L, Pratt JR, Billar KJ, Potts DJ, Lodge JPA. A pathophysiologic study of the kidney tubule to optimize organ preservation solutions. *Kidney Int.* 2004 jul;66(1):77-90.
17. Grezzana Filho T de JM, Mendonça TB de, Gabiatti G, Rodrigues G, Marroni NAP, Treis L, et al. Topical hepatic hypothermia plus ischemic preconditioning: analysis of bile flow and ischemic injuries after initial reperfusion in rats. *Acta Cir Bras.* 2011 jun;26(3):194-201.
18. Grezzana Filho T de JM, Mendonça TB de, Gabiatti G, Krueel CDP, Corso CO. Topic liver hypothermia and ischemic preconditioning: a new model of ischemia and reperfusion in rats. *Acta Cir Bras.* 2009 ago;24(4):262-6.

19. Grezzana Filho T de JM, Corso CO, Zanotelli ML, Marroni CA, Brandão ABM, Schlindwein E, et al. Liver glutathione depletion after preservation and reperfusion in human liver transplantation. *Acta Cir Bras.* 2006 ago;21(4):223-9.
20. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 1972 maio 25;247(10):3170-5.

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figura 1: resultados da análise histológica. * $P < 0,001$ entre G0 e os demais grupos. O G0 não apresentou nenhuma lesão. Sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos I/R, independentemente da temperatura. (PÁGINA 116)

Figura 2: TBARS. G0 significativamente menor que os demais grupos. Sem diferença entre os grupos submetidos à isquemia. * $P < 0,001$. (PÁGINA 116)

Figura 3: CAT. G1 (37°C) significativamente maior que G4 (4°C). * $P = 0,03$. (PÁGINA 117)

Figura 4: SOD. Sem diferença entre os grupos. (PÁGINA 117)

FIGURAS DO ARTIGO

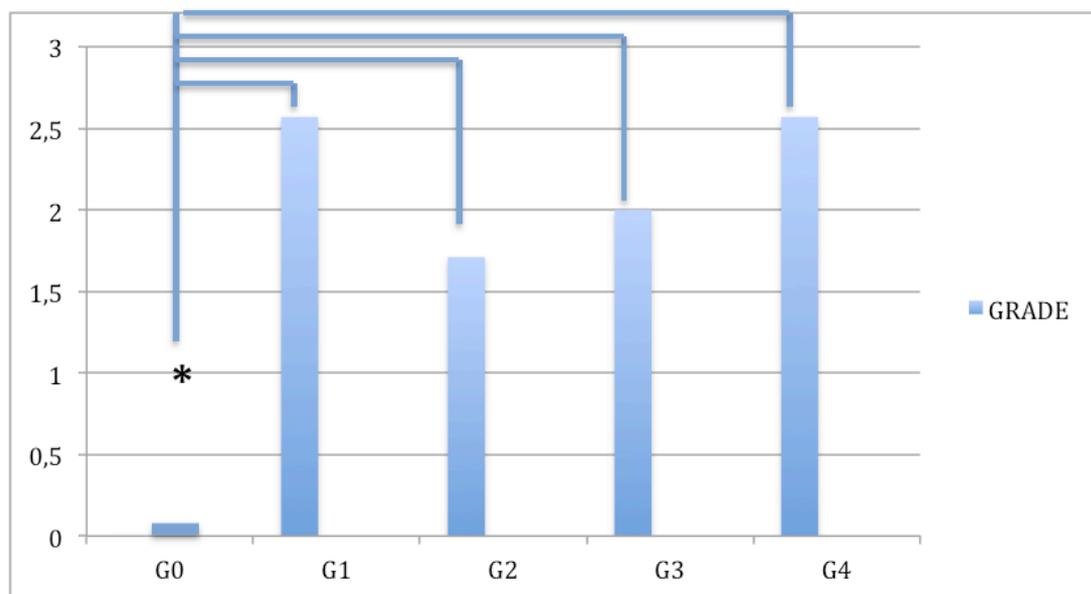


Figura 1: resultados da análise histológica. * $P < 0,00$ entre G0 e os demais grupos. O G0 não apresentou nenhuma lesão. Sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos I/R, independentemente da temperatura.

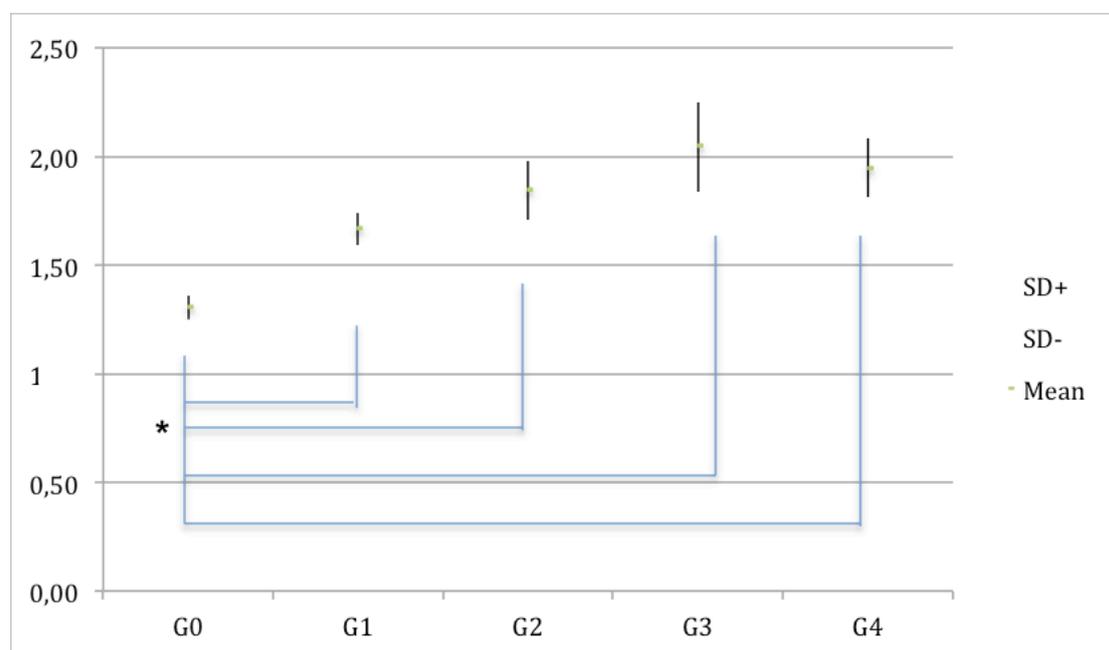


Figura 2: TBARS. G0 significativamente menor que os demais grupos. Sem diferença entre os grupos submetidos a isquemia. * $P < 0,00$.

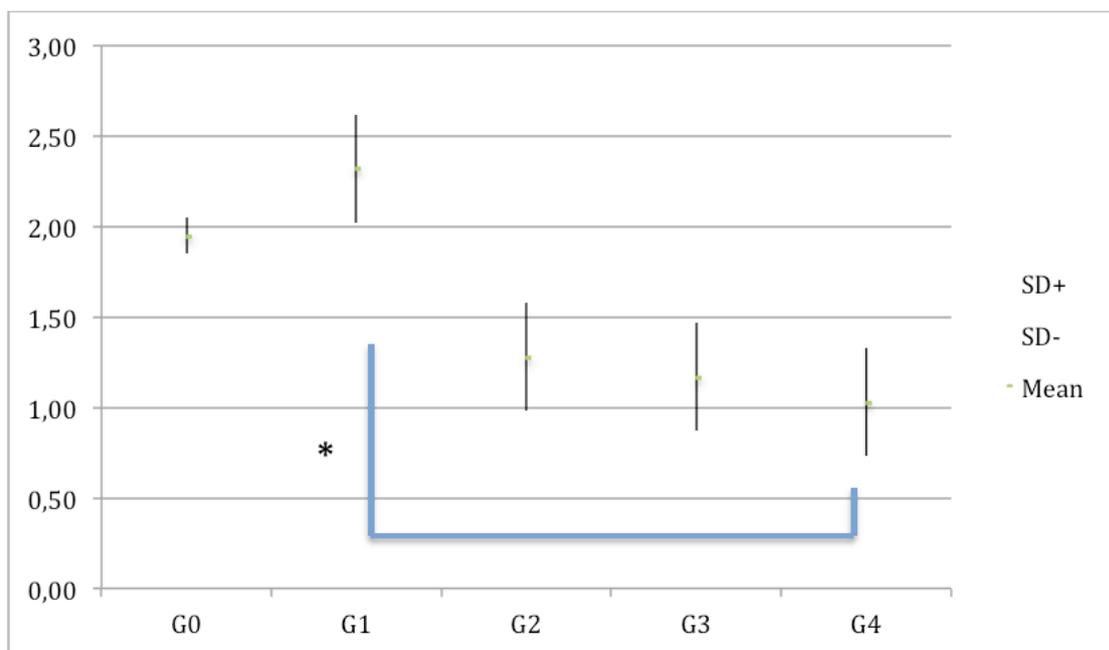


Figura 3: CAT. G1 (37°C) significativamente maior que G4 (4°C). * $P = 0,03$.

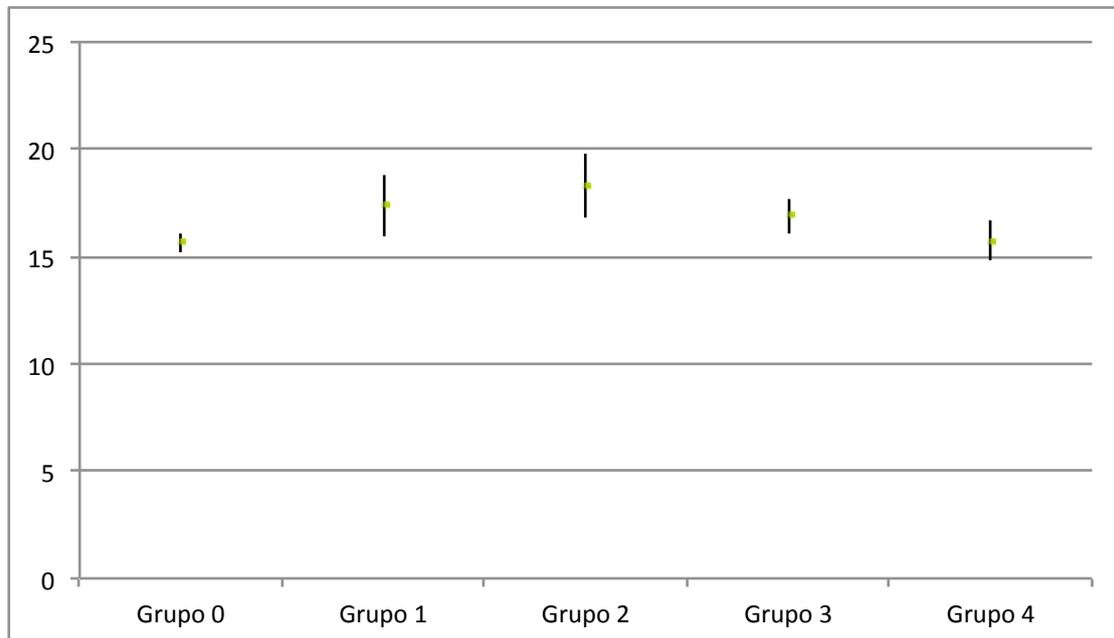


Figura 4: SOD. Sem diferença entre os grupos.

ANEXOS

TABELAS

Tabela 1: análise estatística da catalase (CAT).

CAT	95% Wald Confidence Interval			
	Mean	Std. Dev.	Lower	Upper
0	1,95469	,160552	1,64002	2,26937
1	2,32314	,309423	1,71668	2,92960
2	1,28286	,309423	,67640	1,88932
3	1,17900	,309423	,57254	1,78546
4	1,03829	,309423	,43183	1,64474

Pairwise Comparisons

(I) grupo1	(J) grupo1	Mean Difference (I- J)	Std. Dev.	df	Bonferroni Sig.	95% Wald Confidence Interval for Difference	
						Lower	Upper
0	1	-,36845	,348597	1	1,000	-1,34697	,61007
	2	,67184	,348597	1	,539	-,30669	1,65036
	3	,77569	,348597	1	,261	-,20283	1,75421
	4	,91641	,348597	1	,086	-,06212	1,89493
1	0	,36845	,348597	1	1,000	-,61007	1,34697
	2	1,04029	,437591	1	,174	-,18805	2,26862
	3	1,14414	,437591	1	,089	-,08419	2,37247
	4	1,28486 ^a	,437591	1	,033	,05653	2,51319
2	0	-,67184	,348597	1	,539	-1,65036	,30669
	1	-1,04029	,437591	1	,174	-2,26862	,18805
	3	,10386	,437591	1	1,000	-1,12447	1,33219
	4	,24457	,437591	1	1,000	-,98376	1,47290
3	0	-,77569	,348597	1	,261	-1,75421	,20283
	1	-1,14414	,437591	1	,089	-2,37247	,08419
	2	-,10386	,437591	1	1,000	-1,33219	1,12447
	4	,14071	,437591	1	1,000	-1,08762	1,36905
4	0	-,91641	,348597	1	,086	-1,89493	,06212
	1	-1,28486 ^a	,437591	1	,033	-2,51319	-,05653
	2	-,24457	,437591	1	1,000	-1,47290	,98376
	3	-,14071	,437591	1	1,000	-1,36905	1,08762

Pairwise comparisons of estimated marginal means based on the original scale of dependent variable CAT

a. The mean difference is significant at the 0,05 level.

Tabela 2: resultados da CAT de cada animal em cada grupo.

Amostra	Rim D				Rim E			
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
1	0,173	1,904	0,157	0,335	0,606	1,016	0,504	1,019
2	1,857	1,505	0,730	1,796	0,685	1,267	1,213	0,702
3	1,609	1,730	2,775	2,819	2,945	1,416	1,089	0,550
4	1,736	1,401	3,588	1,915	3,089	0,350	1,013	1,093
5	1,943	1,715	3,787	2,074	2,668	1,593	1,999	1,641
6	2,051	1,902	3,643	3,420	2,646	1,538	1,473	1,132
7	7,140	1,699	4,209	2,558	3,623	1,800	0,962	1,131

Tabela 3: SOD.

Amostra	Rim D				Rim E			
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
1	16,290	13,650	18,470	11,730	17,840	21,690	19,470	19,280
2	13,680	16,250	15,720	15,480	11,660	17,430	18,570	15,600
3	19,613	14,790	19,390	12,670	14,750	13,130	19,180	14,970
4	12,560	20,104	14,930	13,920	14,490	13,670	15,060	17,580
5	16,970	16,340	14,690	14,210	18,690	17,300	17,380	13,730
6	19,240	16,090	15,600	18,720	21,000	24,440	15,570	17,910
7	15,170	12,810	13,000	15,868	23,460	20,490	13,330	11,310

Tabela 4: NO₃-NO₂.

Amostra	Rim D				Rim E			
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
1	1,443	2,747	1,823	2,861	2,494	3,937	2,089	2,215
2	2,202	3,367	1,696	1,506	3,291	2,063	3,671	2,342
3	2,152	1,620	3,380	1,911	2,013	3,051	1,291	1,266
4	1,785	4,038	1,139	0,316	0,696	2,202	3,367	3,721
5	1,747	3,696	0,937	2,405	1,861	3,683	2,734	2,038
6	1,747	2,937	1,886	3,646	2,671	2,468	1,215	1,721
7	3,076	2,570	0,316	1,570	2,316	3,443	2,734	1,620

Tabela 5: NO₃.

Amostra	Rim D				Rim E			
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
1	1,373	2,670	1,734	2,786	2,406	3,825	1,996	2,127
2	2,094	3,225	1,619	1,357	3,210	1,980	3,564	2,218
3	2,080	1,574	3,257	1,838	1,905	2,939	1,245	1,234
4	1,699	3,936	1,083	0,286	0,632	2,150	3,274	3,625
5	1,646	3,590	0,880	2,309	1,776	3,581	2,670	1,941
6	1,664	2,872	1,825	3,529	2,610	2,419	1,155	1,659
7	2,949	2,488	0,303	1,512	2,246	3,362	2,641	1,575

Tabela 6: NO₂.

Amostra	Rim D				Rim E			
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
1	0,070	0,077	0,089	0,075	0,087	0,112	0,093	0,088
2	0,108	0,142	0,077	0,149	0,081	0,083	0,107	0,124
3	0,072	0,046	0,123	0,074	0,108	0,112	0,046	0,032
4	0,085	0,102	0,056	0,031	0,064	0,052	0,093	0,096
5	0,101	0,106	0,056	0,096	0,085	0,102	0,064	0,097
6	0,083	0,065	0,062	0,116	0,061	0,049	0,060	0,062
7	0,127	0,082	0,014	0,058	0,070	0,081	0,093	0,045

Tabela 7: Proteína.

Amostra	Rim D				Rim E			
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
1	6,401	6,233	6,454	7,254	6,927	4,795	7,482	6,490
2	6,590	6,466	6,587	5,823	7,003	5,920	5,894	7,127
3	6,153	6,702	6,534	6,714	4,925	5,542	6,227	7,886
4	6,823	7,145	6,977	6,112	6,620	7,618	7,334	5,994
5	6,425	7,021	7,127	6,968	5,947	6,325	6,174	7,632
6	6,142	7,071	7,316	7,027	5,138	5,167	6,915	6,637
7	6,531	6,640	6,655	6,534	5,947	7,320	7,904	7,219

Tabela 8: TBARS.

Amostra	Rim D				Rim E			
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
1	1,555	1,243	1,085	1,132	1,869	2,092	2,705	1,442
2	1,400	1,774	1,618	1,273	1,331	1,398	2,067	2,213
3	1,898	1,339	1,402	1,322	1,756	2,267	2,984	2,005
4	1,435	1,590	0,645	1,097	1,567	2,099	2,012	2,611
5	1,371	1,709	1,040	1,547	1,969	2,082	1,452	1,998
6	0,973	1,757	1,452	0,979	1,597	1,740	1,703	1,647
7	1,268	0,851	1,095	1,028	1,666	1,315	1,479	1,760

Tabela 9: Patologia. GR = Grupo + Rato; RD = rim direito; RE = rim esquerdo.

GR	RD	RE
11	0	3
12	0	4
13	0	3
14	0	1
15	0	1
16	0	3
17	0	3
21	0	2
22	0	1
23	0	4
24	0	1
25	0	2
26	0	0
27	0	2
31	0	4
32	0	1
33	0	3
34	0	2
35	0	1
36	0	1
37	0	2
41	0	3
42	0	4
43	0	2
44	0	1
45	0	4
46	0	2
47	0	2

0 = normal

1-4= grau das lesões

Tabela 10: Tabela com valores originais de cada animal para as amostras teciduais.

Amostras	mg/ml	nmol/mg protein	umol/L			U SOD/mg protein	
	Prot	TBARS	NO3/NO2	NO2	NO3	SOD	CAT
11D	6,401	1,555	1,443	0,070	1,373	16,290	0,173
21D	6,590	1,400	2,202	0,108	2,094	13,680	1,857
31D	6,153	1,898	2,152	0,072	2,080	19,613	1,609
41D	6,823	1,435	1,785	0,085	1,699	12,560	1,736
51D	6,425	1,371	1,747	0,101	1,646	16,970	1,943
61D	6,142	0,973	1,747	0,083	1,664	19,240	2,051
71D	6,531	1,268	3,076	0,127	2,949	15,170	7,140
Média	6,438	1,414	2,022	0,092	1,929	16,218	2,358
DP	0,242	0,280	0,533	0,021	0,517	2,650	2,203
12D	6,233	1,243	2,747	0,077	2,670	13,650	1,904
22D	6,466	1,774	3,367	0,142	3,225	16,250	1,505
32D	6,702	1,339	1,620	0,046	1,574	14,790	1,730
42D	7,145	1,590	4,038	0,102	3,936	20,104	1,401
52D	7,021	1,709	3,696	0,106	3,590	16,340	1,715
62D	7,071	1,757	2,937	0,065	2,872	16,090	1,902
72D	6,640	0,851	2,570	0,082	2,488	12,810	1,699
Média	6,754	1,466	2,996	0,089	2,908	15,719	1,694
DP	0,340	0,341	0,801	0,031	0,779	2,368	0,187
13D	6,454	1,085	1,823	0,089	1,734	18,470	0,157
23D	6,587	1,618	1,696	0,077	1,619	15,720	0,730
33D	6,534	1,402	3,380	0,123	3,257	19,390	2,775
43D	6,977	0,645	1,139	0,056	1,083	14,930	3,588
53D	7,127	1,040	0,937	0,056	0,880	14,690	3,787
63D	7,316	1,452	1,886	0,062	1,825	15,600	3,643
73D	6,655	1,095	0,316	0,014	0,303	13,000	4,209
Média	6,807	1,191	1,597	0,068	1,529	15,971	2,698
DP	0,332	0,326	0,967	0,034	0,935	2,224	1,607
14D	7,254	1,132	2,861	0,075	2,786	11,730	0,335
24D	5,823	1,273	1,506	0,149	1,357	15,480	1,796
34D	6,714	1,322	1,911	0,074	1,838	12,670	2,819
44D	6,112	1,097	0,316	0,031	0,286	13,920	1,915
54D	6,968	1,547	2,405	0,096	2,309	14,210	2,074
64D	7,027	0,979	3,646	0,116	3,529	18,720	3,420
74D	6,534	1,028	1,570	0,058	1,512	15,868	2,558
Média	6,633	1,197	2,031	0,086	1,945	14,657	2,131
DP	0,516	0,197	1,071	0,039	1,053	2,306	0,975

Amostras	mg/ml	nmol/mg protein	umol/L		U SOD/mg protein		
	Prot	TBARS	NO3/NO2	NO2	NO3	SOD	CAT
11E	6,927	1,869	2,494	0,087	2,406	17,840	0,606
21E	7,003	1,331	3,291	0,081	3,210	11,660	0,685
31E	4,925	1,756	2,013	0,108	1,905	14,750	2,945
41E	6,620	1,567	0,696	0,064	0,632	14,490	3,089
51E	5,947	1,969	1,861	0,085	1,776	18,690	2,668
61E	5,138	1,597	2,671	0,061	2,610	21,000	2,646
71E	5,947	1,666	2,316	0,070	2,246	23,460	3,623
Média	6,072	1,679	2,192	0,080	2,112	17,413	2,323
DP	0,828	0,211	0,809	0,016	0,806	4,082	1,192
12E	4,795	2,092	3,937	0,112	3,825	21,690	1,016
22E	5,920	1,398	2,063	0,083	1,980	17,430	1,267
32E	5,542	2,267	3,051	0,112	2,939	13,130	1,416
42E	7,618	2,099	2,202	0,052	2,150	13,670	0,350
52E	6,325	2,082	3,683	0,102	3,581	17,300	1,593
62E	5,167	1,740	2,468	0,049	2,419	24,440	1,538
72E	7,320	1,315	3,443	0,081	3,362	20,490	1,800
Média	6,098	1,856	2,978	0,085	2,894	18,307	1,283
DP	1,061	0,377	0,746	0,026	0,727	4,162	0,481
13E	7,482	2,705	2,089	0,093	1,996	19,470	0,504
23E	5,894	2,067	3,671	0,107	3,564	18,570	1,213
33E	6,227	2,984	1,291	0,046	1,245	19,180	1,089
43E	7,334	2,012	3,367	0,093	3,274	15,060	1,013
53E	6,174	1,452	2,734	0,064	2,670	17,380	1,999
63E	6,915	1,703	1,215	0,060	1,155	15,570	1,473
73E	7,904	1,479	2,734	0,093	2,641	13,330	0,962
Média	6,847	2,057	2,443	0,079	2,364	16,937	1,179
DP	0,765	0,593	0,957	0,023	0,939	2,335	0,465
14E	6,490	1,442	2,215	0,088	2,127	19,280	1,019
24E	7,127	2,213	2,342	0,124	2,218	15,600	0,702
34E	7,886	2,005	1,266	0,032	1,234	14,970	0,550
44E	5,994	2,611	3,721	0,096	3,625	17,580	1,093
54E	7,632	1,998	2,038	0,097	1,941	13,730	1,641
64E	6,637	1,647	1,721	0,062	1,659	17,910	1,132
74E	7,219	1,760	1,620	0,045	1,575	11,310	1,131
Média	6,998	1,954	2,132	0,078	2,054	15,769	1,038
DP	0,665	0,387	0,792	0,033	0,772	2,736	0,350

Tabela 11: f2-isoprostanos. Amostras: 11= animal 1 do grupo 1, e assim sucessivamente.

Grupo	Unidades pg/mL	
	Amostras	F2-ISP
1	11	270,65
1	21	195,37
1	31	242,36
1	41	274,95
1	51	105,61
1	61	213,63
1	71	132,40
2	12	223,99
2	22	151,80
2	32	172,21
2	42	238,57
2	52	201,63
2	62	165,12
2	72	213,63
3	13	355,74
3	23	276,40
3	33	214,76
3	43	225,17
3	53	124,96
3	63	122,36
3	73	107,29
4	14	151,80
4	24	323,62
4	34	81,20
4	44	164,25
4	54	93,59
4	64	214,76
4	74	300,66