

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas

Avaliação dos efeitos do pré-condicionamento isquêmico local associado a hipotermia tópica na lesão por isquemia e reperfusão renal em ratos

Autor: Guilherme Behrend Silva Ribeiro

Orientador: Carlos Otávio Corso

Coorientador: Emanuel Burck dos Santos

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre

2016

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas

Avaliação dos efeitos do pré-condicionamento isquêmico local associado a hipotermia tópica na lesão por isquemia e reperfusão renal em ratos

Autor: Guilherme Behrend Silva Ribeiro

Orientador: Carlos Otávio Corso

Coorientador: Emanuel Burck dos Santos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Ribeiro, Guilherme Behrend Silva

Avaliação dos efeitos do pré-condicionamento
isquêmico local associado a hipotermia tópica na
lesão por isquemia e reperfusão renal em ratos /
Guilherme Behrend Silva Ribeiro. -- 2016.
60 f.

Orientador: Carlos Otávio Corso.

Coorientador: Emanuel Burck dos Santos.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas,
Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Pré-condicionamento isquêmico. 2. Hipotermia.
3. Lesão por isquemia-reperfusão. 4. Rim. 5.
Alterações histológicas. I. Corso, Carlos Otávio,
orient. II. dos Santos, Emanuel Burck, coorient.
III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pela educação oportunizada.

À minha esposa Laura, pelo apoio e incentivo para a realização desse trabalho.

À Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Departamento de Cirurgia e ao Departamento de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, devido à excelente formação acadêmica propiciadas e ao estímulo à produção científica.

Ao meu coorientador, Doutor Emanuel Burck dos Santos, pelo grande auxílio na elaboração e condução do projeto.

Ao meu orientador, Doutor Carlos Otávio Corso, pela admirável e criteriosa orientação durante todo o curso.

Ao Doutor Pedro Guilherme Schaefer, à Doutora Francine Hehn de Oliveira, à Doutora Silvia Bona e à Professora Doutora Norma Anair Possa Marroni, pelo impecável auxílio e disponibilidade à execução do estudo.

Aos integrantes da Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial à veterinária Fabíola Schons Meyer e à enfermeira Marta Justina Giotti Cioato, pelo suporte e oferecimento de condições ideais para realização de estudo experimental.

Aos acadêmicos de medicina Eduardo Rabolini e Guilherme Smaniotto, pela colaboração indispensável na realização dos experimentos, com seriedade e leveza

DEDICATÓRIA

À minha esposa Laura
À minha mãe Jaqueline
Ao meu pai César (in memoriam)

RESUMO

Introdução: A hipotermia tópica e o pré-condicionamento isquêmico local isoladamente reduzem a lesão renal por isquemia-reperfusão (I/R). Possivelmente, a associação de ambas estratégias tem efeitos protetores sinérgicos.

Objetivos: Estudar os efeitos do pré-condicionamento local associado a hipotermia tópica na lesão renal por I/R, principalmente quanto às alterações histológicas, dano por estresse oxidativo, atividade antioxidante tecidual e parâmetros bioquímicos funcionais.

Métodos: Quarenta ratos Wistar foram aleatoriamente alocados para cinco protocolos experimentais realizados no rim esquerdo: hipotermia tópica por 40 min sem isquemia (HT), isquemia quente por 40 min (IR), pré-condicionamento isquêmico (15 min de isquemia + 10 min de reperfusão) seguido de isquemia quente por 40 min (PCI+IR), isquemia fria por 40 min (HT+IR) e pré-condicionamento isquêmico seguido de isquemia fria por 40 min (PCI+HT+IR). Nefrectomia direita foi realizada em todos os ratos antes de qualquer procedimento. Oito rins direitos aleatoriamente designados constituíram o grupo controle. Após 240 min de reperfusão, o rim esquerdo foi retirado para avaliar as alterações histológicas, a peroxidação lipídica (níveis de F2-isoprostanos [F2IP]) e a atividade enzimática antioxidante (catalase [CAT] e superóxido dismutase [SOD]). A função renal foi avaliada através da creatinina e uréia séricas.

Resultados: O grupo PCI+HT+IR não foi diferente dos outros grupos submetidos a isquemia quanto às alterações histológicas, peroxidação lipídica e atividade enzimática antioxidante. A creatinina no grupo PCI+HT+IR foi mais baixa comparado ao grupo PCI+IR, mas semelhante ao grupo HT+IR.

Conclusões: A combinação de pré-condicionamento local e hipotermia tópica não resultou em proteção à lesão por I/R. Além disso, o PCI local isolado seguido de isquemia quente prejudicou a função renal mais que a isquemia quente isolada.

Palavras-chave: Pré-condicionamento isquêmico. Hipotermia. Lesão por isquemia-reperfusão. Rim. Alterações histológicas. Estresse oxidativo. Atividade antioxidante. Ratos.

ABSTRACT

Purpose: Topical hypothermia and local ischemic preconditioning have been shown to reduce renal ischemia-reperfusion (I/R) injury individually. We examined whether combination of both strategies lessens renal I/R injury.

Methods: Post right nephrectomy, 40 male Wistar rats were randomly assigned to five experimental protocols performed in the left kidney: topical hypothermia without ischemia (TH), warm ischemia (IR), ischemic preconditioning followed by warm ischemia (IPC+IR), cold ischemia (TH+IR), and ischemic preconditioning followed by cold ischemia (IPC+TH+IR). Eight randomly assigned right kidneys constituted the control group. After 240 min of reperfusion, the left kidney was retrieved to evaluate histological changes, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity. Serum was collected to evaluate urea and creatinine.

Results: IPC+TH+IR group revealed no difference to any other group subjected to ischemia in relation to histological changes, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity. Creatinine was lower in IPC+TH+IR group compared with IPC+IR, but showed no difference compared to TH+IR group.

Conclusions: Combination of local ischemic preconditioning (IPC) and topical hypothermia conferred no protection in renal I/R injury. Moreover, local IPC solely followed by warm ischemia impaired renal function more than warm ischemia alone.

Key words: Ischemic Preconditioning. Hypothermia. Reperfusion Injury. Oxidative Stress. Kidney. Rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Protocolos experimentais.....	38
Figura 2. Grau das alterações histológicas.....	39
Figura 3. Análise dos F2-isoprostanos.....	40
Figure 1. Experimental protocols.....	49
Figure 2. Manufactured device.....	51
Figure 3. Photomicrograph - Grade 1 acute tubular necrosis.....	54
Figure 4. Photomicrograph - Grade 2 acute tubular necrosis.....	55
Figure 5. Photomicrograph - Grade 3 acute tubular necrosis.....	55
Figure 6. Grades of histological changes.....	56
Figure 7. F2-isoprostananes tissue assay.....	57
Figure 8. Serum urea levels.....	59
Figure 9. Serum creatinine levels.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade das enzimas antioxidantes.....37

Table 1. Antioxidant enzymes assay.....58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP: trifosfato de adenosina

CAT: catalase

DMSA: ácido dimercaptossuccínico

F2IP: f2-isoprostanos

HT: hipotermia tópica

IL-1: interleucina-1

I/R: isquemia-reperfusão

PCI: pré-condicionamento isquêmico

PCIL: pré-condicionamento isquêmico local

PCIR: pré-condicionamento isquêmico remoto

SOD: superóxido dismutase

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF: fator de nefrose tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	Error! Bookmark not defined.
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	Error! Bookmark not defined.
2.1 Lesão renal por isquemia e reperfusão	Error! Bookmark not defined.
2.2 Mecanismos de lesão por isquemia e reperfusão	Error! Bookmark not defined.
2.2 Estratégias para limitar a lesão por I/R.....	Error! Bookmark not defined.
2.3 Pré-condicionamento isquêmico	Error! Bookmark not defined.
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
4 OBJETIVOS	25
4.1 Objetivo geral	25
4.2 Objetivos específicos	25
5 ARTIGO ORIGINAL REDIGIDO EM LÍNGUA PORTUGUESA	26
6 ARTIGO ORIGINAL REDIGIDO EM LÍNGUA INGLESA	45

1 INTRODUÇÃO

A lesão associada a isquemia-reperfusão (I/R) dos tecidos é problema comum em cirurgias que necessitam de clameamento temporário do órgão e em transplantes. No caso do rim, nefrectomia parcial e transplante renal são os exemplos cirúrgicos mais comuns. Reduzir a lesão por IR pode significar em melhor função renal imediata dos rins transplantados ou submetidos a nefrectomia parcial com clameamento, assim como maior sobrevida dos rins a longo prazo {Land:1996kx, Moreso:1995wg}.

Uma forma de tentar diminuir a lesão por I/R é a utilização do pré-condicionamento isquêmico (PCI). O PCI causa uma isquemia subletal (estímulo pré-condicionante) para induzir um estado de proteção contra isquemia subsequente (3,4). Em modelos animais, o PCI local (isquemia aplicada diretamente no órgão que se pretende causar isquemia prolongada posteriormente) diminui o estresse oxidativo e a lesão histológica e promove proteção funcional (5-8).

Outra estratégia bem conhecida e clinicamente aplicada para diminuição da lesão por I/R é a aplicação da hipotermia tópica, tanto in vivo, durante nefrectomias parciais, quanto ex vivo, para preservação do rim para transplante (9-11). As bases para a prática da hipotermia tópica renal foram estabelecidas em estudos experimentais e clínicos das décadas de 60 e 70 (12-15).

Entretanto, até este momento não foi testado se o PCI local associado hipotermia tópica diminui ainda mais a lesão por I/R. A comprovação experimental de um benefício adicional dessa combinação poderia determinar a necessidade de estudos clínicos utilizando essa estratégia em cirurgias como nefrectomia parcial e transplante renal.

Portanto, o objetivo do presente estudo é testar se o PCI local associado a hipotermia tópica tem efeito aditivo na diminuição da lesão renal por I/R em um modelo animal agudo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Lesão renal por isquemia e reperfusão

Isquemia e reperfusão é uma condição patológica caracterizada pela restrição temporária do suprimento sanguíneo de um órgão seguida do reestabelecimento da perfusão e concomitantemente reoxigenação. A isquemia causa lesão tecidual e morte celular, cuja extensão pode ser limitada pela reperfusão. Surpreendentemente, o reestabelecimento do aporte sanguíneo e reoxigenação é associado a agravamento da lesão tecidual e acentuada resposta inflamatória (chamado de lesão de reperfusão) (16). O somatório dessas lesões é denominado de lesão por I/R.

O infarto agudo do miocárdio e o acidente vascular cerebral são as situações clínicas mais comuns em que ocorre a lesão por I/R, mas ela também contribui para o dano de qualquer órgão que é submetido a isquemia temporária. Em transplante renal de doador falecido, o rim é submetido a isquemia quente antes da retirada do órgão, isquemia fria durante o transporte e espera para o transplante e mais um período de isquemia quente durante a cirurgia do transplante (3). Para que o órgão sobreviva, é mandatória a adequada reperfusão do mesmo. Paradoxalmente, apesar de ser parte integral do processo de recuperação, a reperfusão também contribui para incremento da lesão tecidual (17). A extensão da lesão por I/R é um dos determinantes da recuperação da função renal no curto prazo (18). Além disso, ela pode modular a rejeição do órgão a longo prazo pela ativação da resposta imune logo após o transplante (19-22). A redução da lesão por I/R tem o potencial de melhorar os resultados do transplante renal tanto no curto quanto no longo prazo (23,24).

2.2 Mecanismos de lesão por isquemia e reperfusão

A isquemia dos rins (como em outros órgãos) depriva as células de trifosfato de adenosina (ATP), impedindo que as células mantenham processos homeostáticos essenciais, como a função das bombas de Na^+/K^+ e $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. A inibição dessas trifosfatases de adenosina

(ATPases) causa influxo de Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} com subsequente influxo osmótico e edema celular (25). A isquemia também implica em acidose celular e acúmulo de produtos tóxicos da respiração anaeróbia, como o lactato e a hipoxantina, que contribuem para o estresse oxidativo durante a reperfusão (26,27). Caso não ocorra reperfusão em tempo hábil, inevitavelmente ocorrerá morte celular por apoptose e necrose. A lesão por reperfusão é multifatorial e parcialmente atribuível a reoxigenação rápida dos tecidos hipóxicos, resultando em estresse oxidativo, e a sobrecarga de cálcio decorrente da perda da homeostase das bombas carreadoras de íons supracitadas (28).

A lesão renal por I/R compartilha várias particularidades da ativação da resposta imune direcionada para microorganismos invasores. Assim como a inflamação induzida por microorganismo, a “inflamação estéril” induz recrutamento de neutrófilos e macrófagos e a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1)(29). Apesar da isquemia isolada produzir depleção energética e até citólise, é durante a reperfusão que ocorre a maior parte da lesão tecidual. Isso é resultado da infiltração neutrofílica, do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (causadoras de estresse oxidativo nos ácidos nucleicos, proteínas e lipídios) e da resposta inflamatória às células necróticas (29). Essa fase, que envolve tanto processos de reparo e regeneração quanto de apoptose, autofagia e necrose, desenvolve-se por horas a dias após o insulto inicial (17). Apesar de qualquer segmento do néfron poder ser afetado, as células mais vulneráveis a lesão por IR são as do túbulo contorcido proximal e do ramo ascendente espesso da alça de Henle. Isso se deve a alta demanda metabólica dessas células para transporte de íons e também devido a limitada capacidade de metabolismo anaeróbico. Ademais, nessa região ocorre congestão microvascular e hipoperfusão após o reestabelecimento do aporte sanguíneo, fatores que contribuem para o prolongamento da lesão isquêmica. A lesão e consequente disfunção das células endoteliais são os principais responsáveis por esse fenômeno, conhecido como fase de extensão da lesão renal isquêmica (30).

Uma característica morfológica da lesão isquêmica é perda da borda apical em escova das

células tubulares proximais. As microvilosidades rompidas se destacam da borda apical e são liberadas na luz tubular. Células tubulares que se destacam da membrana basal também são liberadas na luz tubular. A aglomeração das células tubulares descamadas e “debris” celulares resulta na formação de cilindros que potencialmente obstruem a luz tubular, acarretando ausência de filtração glomerular na unidade funcional afetada (28).

2.2 Estratégias para limitar a lesão por I/R

As estratégias terapêuticas para limitar a lesão por I/R tem focado principalmente na reperfusão precoce e hipotermia do órgão. No caso do transplante renal, além de otimização da técnica de anastomose vascular, também tenta-se otimizar a logística da captação e transporte do órgão (31). No caso da nefrectomia parcial, especialmente após a ampliação do uso da laparoscopia e cirurgia robótica, foram desenvolvidas técnicas de renorrafia mais rápidas (sutura contínua e sem nós), técnicas de clampeamento arterial seletivo e desclampeamento precoce como formas de limitar a lesão por I/R (32,33).

Quanto a hipotermia renal, o objetivo é diminuir a demanda metabólica celular. O resfriamento do rim com gelo, inicialmente utilizado para transplante renal, passou a ser amplamente utilizado em nefrectomias parciais, principalmente quando se espera que o tempo de isquemia seja prolongado (13,34). Entretanto, para a preservação do rim por várias horas, como é o caso dos transplantes, é necessário perfundí-lo com uma solução de preservação, além de mantê-lo gelado. Há décadas foi demonstrado que tanto a perfusão pulsátil hipotérmica quanto a perfusão inicial com solução gelada seguida de resfriamento simples (perfusão estática hipotérmica) são eficientes em preservar os rins por 24 a 72 horas (14,15). Devido a simplicidade da preservação estática hipotérmica e demonstração de resultados equivalentes à perfusão pulsátil em estudos experimentais com preservação do rim até 48 horas, a preservação estática se tornou o método mais utilizado em humanos (35). Apenas mais recentemente, em virtude do aumento do uso de rins de doadores com critérios expandidos ou de doadores sem batimentos cardíacos, ressurgiu o interesse na perfusão pulsátil. Para esses casos a perfusão pulsátil

parece proporcionar proteção adicional contra a lesão por I/R, além de permitir avaliação da viabilidade do órgão pelos parâmetros perfusionais (36-38). As soluções utilizadas para perfusão tem principalmente solutos impermeabilizantes para evitar a entrada de líquido nas células, tampões para manter o pH e íons. Outros componentes que podem ter benefício adicional, mas não são essenciais para a preservação do órgão, são os removedores de radicais livres, antagonistas do cálcio, colóides, reguladores do complemento e antiplaquetários (25). A solução de perfusão mais utilizada é a da Universidade de Wisconsin (UW), que tem melhores resultados (queda da creatinina e sobrevida do enxerto) que a solução Euro-Collins (39). Essa solução tem os solutos impermeabilizantes lactobionato, rafinose e hidroxietilamido, adenosina para a síntese de ATP durante a reperfusão, glutathione para remoção de radicais livres, alopurinol para inibir a xantina-oxidase (reduzindo a produção de radicais livres), e magnésio e dexametasona para estabilização da membrana (40).

Embora as estratégias comentadas acima tenham diminuído consideravelmente a lesão por I/R, outras estratégias capazes de tornar os órgãos mais resistentes a lesão por I/R são desejadas. Indicativos disso são o número de enxertos que anualmente falham, atualmente muito próximo ao número de novos transplantes, e as crescentes listas de espera em todo o mundo (17,41). Por essa razão os rins de doadores com critérios expandidos ou de doadores sem batimentos cardíacos estão sendo cada vez mais utilizados (11). Uma dessas estratégias é o PCI.

2.3 Pré-condicionamento isquêmico

O PCI é uma estratégia em que a aplicação de um breve período de isquemia e reperfusão (estímulo condicionante) resulta em um estado de proteção contra isquemia prolongada e reperfusão subsequente (42). Foi demonstrado que o estímulo condicionante é efetivo quando aplicado diretamente no órgão que será submetido a IR (PCI local; PCIL) ou quando aplicado em órgão ou tecido distante (PCI remoto; PCIR). Tanto o PCIL quanto o PCIR foram originalmente descritos em miocárdio de cachorros (43,44). Posteriormente, foram reproduzidos em várias

espécies animais (ratos, camundongos, porcos), preponderantemente testando o PCIL, e em vários órgãos, entre eles o rim (45,46).

Os estudos experimentais de PCIL descrevem vários protocolos diferentes. O estímulo pré-condicionante pode ser apenas 1 período de isquemia, ou 2 ou mais ciclos curtos de isquemia antes da isquemia sustentada. O intervalo entre o estímulo pré-condicionante e a isquemia sustentada (tempo de reperfusão) também foi descrito de várias formas, tanto para intervalos curtos (chamados de janela de proteção precoce), que variam de 5 min a horas, quanto para intervalos longos (chamados de janela de proteção tardia), que variam de dias a semanas (46).

A partir dos estudos pioneiros de Murry (43), o grupo de Mathie começou a desenvolver protocolos de PCIL renal em ratos. No primeiro trabalho, utilizaram quatro ciclos de isquemia (4 min) seguida de reperfusão (11 min), totalizando 1 h de PCIL, seguido de intervalo de 30 min até a isquemia renal sustentada, por 20 min ou 40 min. Os autores descobriram que o PCIL nesses moldes não promovia proteção renal. Concluíram também que 40 min de isquemia sustentada era superior a 20 min em promover danos significativos, conforme avaliação com cintilografia com DMSA (imediatamente [dia 0] e 2 e 9 dias após o experimento) e análise histológica com hematoxilina e eosina (rins coletados após última cintilografia) (47). Em seguida, Toosy demonstrou que a ausência de efeito protetor do PCIL deveu-se a um tempo crítico (intervalo) de 30 minutos entre o PCIL e a isquemia renal sustentada. No grupo submetido a tempo crítico de 5min, foi verificado efeito protetor do PCIL usando os mesmos métodos de aferição e desfechos (7). Apesar do sucesso deste estudo em demonstrar efeito protetor do PCIL renal, o protocolo ideal de PCIL renal não havia ainda sido determinado, já que o grupo em questão apenas transpôs o modelo de PCIL cardíaco sem qualquer adaptação para o rim. Estudo do nosso grupo de pesquisa já demonstrou, por exemplo, que o protocolo ideal de PCIL hepático é diferente do cardíaco (48). Então porque necessariamente o PCIL renal seria igual ao cardíaco e não ao hepático?

Pois em 2002 Torras publicou um elegante estudo desenhado para responder a essa e

outras questões relacionadas ao PCIL renal. Descobriram que o tempo ideal de PCIL seria de apenas um ciclo de 15min de isquemia seguido de 10min de reperfusão. Para chegar a essa conclusão os autores dividiram o estudo em etapas. Na primeira etapa o tempo de reperfusão era constante, sendo variável o tempo de isquemia. Uma vez definido o tempo de isquemia ideal, o tempo ótimo de reperfusão foi determinado a partir de um tempo de isquemia constante e um tempo de reperfusão variável, usando a concentração sérica de creatinina e alterações histológicas (utilizando hematoxilina e eosina e ácido periódico de Schiff) como desfechos (6). O tempo de isquemia sustentada pós-PCIL usado no estudo foi de 40 min, pois já havia sido demonstrado em estudo anterior como sendo adequado para causar dano renal (47).

A despeito da realização de milhares de estudos experimentais e da descoberta de complexos mecanismos de sinalização, ainda não há explicação clara sobre como os mecanismos envolvidos no PCI promovem proteção à lesão por I/R (45). Vários mecanismos foram sugeridos, incluindo a produção de adenosina, bradicinina, opióides, antioxidantes, proteínas de choque térmico, óxido nítrico, substâncias humorais e moléculas inflamatórias (42,49,50). Entre os mecanismos de lesão por I/R, o estresse oxidativo decorrente do excesso de produção de espécies reativas de oxigênio parece ter um papel crucial (51-55). A observação de que a deficiência de antioxidantes exacerba a lesão renal (56) e de que a suplementação com enzimas antioxidantes (como superóxido dismutase [SOD] e catalase [CAT]) protege contra a lesão por IR (57-61) fornecem evidências inequívocas de que as enzimas antioxidantes interferem no grau de lesão renal por estresse oxidativo (62). Embora existam métodos para detecção direta de radicais livres, a medida indireta de derivados da peroxidação lipídica, como os F2-isoprostanos (F2IP), o malondialdeído e as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são geralmente empregados para avaliar o estresse oxidativo (63-65). Entre esses, os F2IP são os marcadores mais apropriados, pois seus níveis são mais estáveis e específicos para peroxidação lipídica (64,66).

Pelo que investigamos na literatura até o momento, não há estudos avaliando a associação entre PCIL e hipotermia tópica transoperatória na prevenção de lesão renal por I/R.

Não obstante, estudos nesse sentido já foram conduzidos em fígado, inclusive pelo nosso grupo. A hipotermia tópica associada ao PCIL hepático parece conferir proteção maior que a hipotermia ou PCIL isolado (48). Considerando que no rim o PCIL isolado é protetor, elaboramos a hipótese de que a associação entre hipotermia tópica (definida como sendo 4°C, quando produz menos estresse oxidativo (67)) e PCIL poderia conferir proteção renal adicional à lesão por I/R, tal qual ocorre no fígado.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Land W, Messmer K, Events E. The Impact of Ischemia/Reperfusion Injury on Specific and Non-Specific, Early and Late Chronic Events After Organ Transplantation. *Transplantation Reviews*. 1996 Apr 1;10(2):108–27.
2. Moreso F, Gallén M, García-Osuna R, Torras J, Gil-Vernet S, Castela AM, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in renal transplantation. *Transplantation Proceedings*. 1995 Aug;27(4):2226–8.
3. MacAllister R, Clayton T, Knight R, Robertson S, Nicholas J, Motwani M, et al. REremote preconditioning for Protection Against Ischaemia–Reperfusion in renal transplantation (REPAIR): a multicentre, multinational, double-blind, factorial designed randomised controlled trial. *Efficacy Mech Eval*. 2015 May;2(3):1–60.
4. Pickard JMJ, Bøtker HE, Crimi G, Davidson B, Davidson SM, Dutka D, et al. Remote ischemic conditioning: from experimental observation to clinical application: report from the 8th Biennial Hatter Cardiovascular Institute Workshop. *Basic Res Cardiol*. 2014 Dec 2;110(1):453–13.
5. Riera M, Herrero I, Torras J, Cruzado JM, Fatjo M, Lloberas N, et al. Ischemic preconditioning improves postischemic acute renal failure. *Transplantation Proceedings*. 1999 Sep;31(6):2346–7.
6. 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.
7. Toosy N, McMorris EL, Grace PA, Mathie RT. Ischaemic preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury. *BJU International*. 1999 Sep;84(4):489–94.
8. Jefayri MK, Grace PA, Mathie RT. Attenuation of reperfusion injury by renal ischaemic preconditioning: the role of nitric oxide. *BJU International*. 2000 Jun;85(9):1007–13.
9. Yossepowitch O, Eggener SE, Serio A, Huang WC, Snyder ME, Vickers AJ, et al. Temporary Renal Ischemia During Nephron Sparing Surgery is Associated With Short-Term but Not Long-Term Impairment in Renal Function. *The Journal of Urology*. 2006 Oct;176(4):1339–43.
10. Pruthi R, Casula A, MacPhee I. UK Renal Registry 18th Annual Report: Chapter 3 Demographic and Biochemistry Profile of Kidney Transplant Recipients in the UK in 2014: National and Centre-specific Analyses. *Nephron*. 2016;132 Suppl 1:69–98.

11. Cecka JM. The UNOS Renal Transplant Registry. *Clin Transpl.* 2002;;1–20.
12. Ward JP. Determination of the Optimum temperature for regional renal hypothermia during temporary renal ischaemia. *Br J Urol.* 1975 Feb;47(1):17–24.
13. Novick AC. Renal hypothermia: in vivo and ex vivo. *Urol Clin North Am.* 1983 Nov;10(4):637–44.
14. Collins GM, Bravo-Shugarman M, Terasaki PI. Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours' ice storage. *Lancet.* 1969 Dec 6;2(7632):1219–22.
15. Belzer FO, Ashby BS, Dunphy JE. 24-hour and 72-hour preservation of canine kidneys. *The Lancet.* 1967;290(7515):536–9.
16. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nature Medicine.* 2011 Nov 1;17(11):1391–401.
17. Kosieradzki M, Rowiński W. Ischemia/Reperfusion Injury in Kidney Transplantation: Mechanisms and Prevention. *Transplantation Proceedings.* 2008 Dec 1;40(10):3279–88.
18. Tilney NL, Guttman RD. Effects of initial ischemia/reperfusion injury on the transplanted kidney. *Transplantation.* 1997 Oct 15;64(7):945–7.
19. Land WG. The role of postischemic reperfusion injury and other nonantigen-dependent inflammatory pathways in transplantation. *Transplantation.* 2005 Mar 15;79(5):505–14.
20. Shackleton CR, Ettinger SL, McLoughlin MG, Scudamore CH, Miller RR, Keown PA. Effect of recovery from ischemic injury on class I and class II MHC antigen expression. *Transplantation.* 1990 Mar;49(3):641–4.
21. Lu CY, Penfield JG, Kielar ML, Vazquez MA, Jeyarajah DR. Hypothesis: is renal allograft rejection initiated by the response to injury sustained during the transplant process? *Kidney Int.* 1999 Jun;55(6):2157–68.
22. Gueler F, Gwinner W, Schwarz A, Haller H. Long-term effects of acute ischemia and reperfusion injury. *Kidney Int.* 2004;66(2):523–7.
23. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schmodder RL. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation.* 1997 Apr 15;63(7):968–74.
24. Halloran PF, Aprile MA, Farewell V, Ludwin D, Smith EK, Tsai SY, et al. Early function as the principal correlate of graft survival. A multivariate analysis of 200 cadaveric renal transplants treated with a protocol incorporating antilymphocyte globulin and cyclosporine. *Transplantation.* 1988 Aug;46(2):223–8.
25. 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.
26. Nghiem DD, Elkadi H, Southard JH. Importance of pH in renal preservation. *Transplantation Proceedings.* 1988 Oct;20(5):872–4.
 27. Williamson JR, Schaffer SW, Ford C, Safer B. Contribution of tissue acidosis to ischemic injury in the perfused rat heart. *Circulation.* 1976 Mar;53(3 Suppl):13–14.
 28. Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nature Reviews Nephrology.* 2011 Apr 1;7(4):189–200.
 29. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology.* 2010 Dec 1;10(12):826–37.
 30. Molitoris BA, Sutton TA. Endothelial injury and dysfunction: role in the extension phase of acute renal failure. *Kidney Int.* 2004 Aug;66(2):496–9.
 31. Requião-Moura LR, Durão Junior M de S, Matos ACC de, Pacheco-Silva A. Ischemia and reperfusion injury in renal transplantation: hemodynamic and immunological paradigms. *Einstein (São Paulo).* 2015 Jan;13(1):129–35.
 32. Häcker A, Albadour A, Jauker W, Ziegerhofer J, Albquami N, Jeschke S, et al. Nephron-Sparing Surgery for Renal Tumours: Acceleration and Facilitation of the Laparoscopic Technique. *European Urology.* 2007 Feb;51(2):358–65.
 33. Smith ZL. Current Status of Minimally Invasive Surgery for Renal Cell Carcinoma. *Current Urology Reports.* 2016 Apr 19:1–7.
 34. Becker F, van Poppel H, Hakenberg OW, Stief C, Gill I, Guazzoni G, et al. Assessing the impact of ischaemia time during partial nephrectomy. *European Urology.* 2009 Oct;56(4):625–34.
 35. Halasz NA, Collins GM. Forty-eight-hour kidney preservation. A comparison of flushing and ice storage with perfusion. *Arch Surg.* 1976 Feb;111(2):175–7.
 36. Wight JP, Chilcott JB, Holmes MW, Brewer N. Pulsatile machine perfusion vs. cold storage of kidneys for transplantation: a rapid and systematic review. *Clinical Transplantation.* 2003 Aug;17(4):293–307.
 37. Light JA, Barhyte DY, Gage FA, Sasaki TM, Aquino AO. Long-term graft survival after transplantation with kidneys from uncontrolled nonheartbeating donors. *Transplantation.* 1999 Dec 27;68(12):1910–1.
 38. Matsuno N, Kozaki K, Degawa H, Narumi Y, Suzuki N, Kikuchi K, et al. A useful predictor

- in machine perfusion preservation for kidney transplantation from non-heart-beating donors. *Transplantation Proceedings*. 2000 Feb;32(1):173–4.
39. Ploeg RJ, van Bockel JH, Langendijk PT, Groenewegen M, van der Woude FJ, Persijn GG, et al. Effect of preservation solution on results of cadaveric kidney transplantation. The European Multicentre Study Group. *Lancet*. 1992 Jul 18;340(8812):129–37.
 40. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*. 1988 Apr;45(4):673–6.
 41. Opelz G. Newsletter 3. Collaborative Transplant Study. 2006. Aug;1-4.
 42. Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Atherosclerosis*. 2009 Jun;204(2):334–41.
 43. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986 Nov;74(5):1124–36.
 44. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic “preconditioning” protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*. 1993 Mar;87(3):893–9.
 45. Hausenloy DJ, Yellon DM. The therapeutic potential of ischemic conditioning: an update. *Nat Rev Cardiol*. 2011 Nov;8(11):619–29.
 46. 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 Feb 28;7(2):e32296.
 47. 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.
 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;26(3):194–201.
 49. Ishida T, Yarimizu K, Gute DC, Korthuis RJ. Mechanisms of ischemic preconditioning. *Shock*. 1997 Aug;8(2):86–94.
 50. Das M, Das DK. Molecular mechanism of preconditioning. *IUBMB Life*. 2008 Apr;60(4):199–203.
 51. Baker GL, Corry RJ, Autor AP. Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion. Protective effect of superoxide dismutase. *Annals of*

- Surgery. 1985 Nov;202(5):628–41.
52. Bonventre JV. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 1993 May;43(5):1160–78.
 53. Johnson KJ, Weinberg JM. Postischemic renal injury due to oxygen radicals. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1993 Jul;2(4):625–35.
 54. McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem.* 1993 Oct;26(5):351–7.
 55. Paller MS. The cell biology of reperfusion injury in the kidney. *J Investig Med.* 1994 Dec;42(4):632–9.
 56. Nath KA, Paller MS. Dietary deficiency of antioxidants exacerbates ischemic injury in the rat kidney. *Kidney Int.* 1990 Dec;38(6):1109–17.
 57. Bayati A, Källskog O, Wolgast M. The long-term outcome of post-ischaemic acute renal failure in the rat. I. A functional study after treatment with SOD and sucrose. *Acta Physiol Scand.* 1990 Jan;138(1):25–33.
 58. Castillo M, Toledo-Pereyra LH, Shapiro E, Guerra E, Prough D, Frantzis P. Protective effect of allopurinol, catalase, or superoxide dismutase in the ischemic rat liver. *Transplantation Proceedings.* 1990 Apr;22(2):490–1.
 59. Greenwald RA. Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases a critical review. *Free Radical Biology and Medicine.* 1990 Jan 1;8(2):201–9.
 60. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg.* 1991 Apr 1;161(4):488–503.
 61. Senga S, Onituka A, Hirose H, Yamamoto K, Niwa K. Protective effect of liposomal encapsulated superoxide dismutase on ischemically injured liver in the rat. *Transplantation Proceedings.* 1990 Aug;22(4):2025–6.
 62. Dobashi K, Ghosh B, Orak JK, Singh I, Singh AK. Kidney ischemia-reperfusion: modulation of antioxidant defenses. *Mol Cell Biochem.* 2000 Feb;205(1-2):1–11.
 63. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition.* 1993. May;57(5 Suppl):715S-724S.
 64. 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? *British Journal of Pharmacology.* 2004 May;142(2):231–55.

65. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem.* 2005 Mar 23;53(6):1841–56.
66. 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.
67. Santos EBD, Koff WJ, Grezzana Filho T de JM, De Rossi SD, Treis L, Bona SR, et al. Oxidative stress evaluation of ischemia and reperfusion in kidneys under various degrees of hypothermia in rats. *Acta Cir Bras.* 2013;28(8):568–73.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar se a associação entre PCIL e hipotermia tópica (HT) renal 4°C diminuem a lesão renal por I/R em um modelo animal com ratos.

4.2 Objetivos específicos

Avaliar se o rim submetido a PCIL e HT associados tem menor lesão tecidual por I/R. Para avaliação desse desfecho, será realizada análise histopatológica do rim.

Avaliar se o rim submetido a PCIL e HT associados tem menor dano por estresse oxidativo por I/R. Para avaliação do dano por estresse oxidativo será aferido no tecido renal o marcador metabólico de peroxidação lipídica F2IP.

Avaliar se o rim submetido a PCIL e HT associados altera a atividade enzimática antioxidante após I/R. Para avaliação da atividade enzimática antioxidante serão aferidos no tecido renal a atividade da SOD e da CAT.

Avaliar se o rim submetido a PCIL e HT associados diminui a perda de função renal após I/R. Para avaliação da perda de função renal, serão aferidos no sangue os seguintes parâmetros bioquímicos funcionais: creatinina e uréia.

5 ARTIGO ORIGINAL REDIGIDO EM LÍNGUA PORTUGUESA**Pré-condicionamento isquêmico local e hipotermia tópica não atenuam sinergisticamente a lesão renal por isquemia e reperfusão em ratos**

Guilherme Behrend Silva Ribeiro¹, Emanuel Burck dos Santos², Silvia Regina Bona³, Pedro Guilherme Schaefer⁴, Tuane Nerissa Alves Garcez⁵, Eduardo Brasil Rabolini⁶, Guilherme Pereira Smaniotto⁶, Norma Anair Possa Marroni³, Carlos Otávio Corso⁷.

¹ Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Departamento de Urologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁴ Departamento de Patologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁵ Unidade de Experimentação Animal, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁶ Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁷ Serviço de Cirurgia Digestiva, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil; e Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Autor para correspondência: Carlos Otávio Corso, MD, PhD. Serviço de Cirurgia Digestiva, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2350, sala 747, Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 90035-903. E-mail: corso@portoweb.com.br. Telefone: 55-51-3359.8232

RESUMO

Introdução: A hipotermia tópica e o pré-condicionamento isquêmico local reduzem a lesão renal por isquemia-reperfusão (I/R). Possivelmente, a associação de ambas estratégias tem efeitos protetores sinérgicos.

Objetivos: Estudar os efeitos do pré-condicionamento local associado a hipotermia tópica na lesão renal por I/R, principalmente quanto às alterações histológicas, dano por estresse oxidativo e atividade antioxidante tecidual.

Métodos: Quarenta ratos Wistar foram aleatoriamente alocados para cinco protocolos experimentais realizados no rim esquerdo: hipotermia tópica por 40 min sem isquemia (HT), isquemia quente por 40 min (IR), pré-condicionamento isquêmico (15 min de isquemia + 10 min de reperfusão) seguido de isquemia quente por 40 min (PCI+IR), isquemia fria por 40 min (HT+IR) e pré-condicionamento isquêmico seguido de isquemia fria por 40 min (PCI+HT+IR). Nefrectomia direita foi realizada em todos os ratos antes de qualquer procedimento. Oito rins direitos aleatoriamente designados constituíram o grupo controle. Após 240 min de reperfusão, o rim esquerdo foi retirado para avaliar as alterações histológicas, a peroxidação lipídica (níveis de F2-isoprostanos [F2IP]) e a atividade enzimática antioxidante (catalase [CAT] e superóxido dismutase [SOD]).

Resultados: A avaliação histológica revelou maior grau de lesão por I/R nos grupos submetidos a isquemia quente (IR e PCI+IR) que nos grupos controle, HT e HT+IR, mas ausência de diferença com o grupo PCI+HT+IR. F2IP, CAT e SOD do grupo PCI+HT+IR mostraram ausência de diferença com qualquer grupo submetido a isquemia.

Conclusões: PCI local não apenas mostrou ausência de efeito sinérgico com HT na proteção renal por lesão por I/R, mas também comprometeu os efeitos protetores da HT.

Palavras-chave: Pré-condicionamento isquêmico. Hipotermia. Lesão por isquemia-reperfusão. Rim. Alterações histológicas. Estresse oxidativo. Atividade antioxidante. Ratos.

INTRODUÇÃO

A lesão por isquemia-reperfusão (I/R) é responsável por grande parte do dano tecidual que ocorre no acidente vascular cerebral e no infarto do miocárdio, duas síndromes clínicas de isquemia e reperfusão muito comuns, assim como no dano de qualquer órgão que fique temporariamente isquêmico (1). Em nefrectomias parciais e transplantes renais, o rim é exposto a períodos variáveis de isquemia quente e fria (2,3). Lesão e morte celular ocorrem após a interrupção do aporte sanguíneo para o rim e a reperfusão é mandatória para a sobrevivência do tecido renal. Entretanto, apesar da reperfusão ser parte integral do processo de regeneração, ela também contribui para exacerbação da lesão tecidual e promove profunda resposta inflamatória (chamada de 'lesão de reperfusão') (1). O processo todo tem sido descrito como lesão por I/R (4).

O rim é composto de populações de células heterogêneas que funcionam em conjunto para realizar uma série de processos complexos e rigorosamente controlados. A isquemia provoca alterações moleculares na vascularização e interstício do rim e a reperfusão dá início a uma resposta inflamatória aguda. Conjuntamente, esses eventos induzem lesão renal, resultando em ruptura da função e decréscimo da taxa de filtração glomerular (5). No transplante renal, a extensão da lesão por I/R é um dos determinantes da recuperação da função renal no curto prazo (6) e pode modular a rejeição do órgão a longo prazo pela ativação da resposta imune logo após o transplante (7,8). A redução da lesão por I/R tem o potencial de melhorar os resultados do transplante renal tanto no curto quanto no longo prazo (9).

As estratégias terapêuticas para limitar a lesão por I/R tem focado principalmente na reperfusão precoce e hipotermia do órgão (10,11). A hipotermia tópica (HT) associada a perfusão pulsátil ou perfusão inicial com uma solução de preservação (perfusão estática hipotérmica) tem sido os pilares da preservação renal para transplante (12,13). Entretanto, o número de enxertos que anualmente falham e as crescentes lista de espera indicam que precisamos de novas estratégias para aumentar a tolerância do rim a lesão por I/R (14,15). Uma

dessas estratégias é o pré-condicionamento isquêmico (PCI).

O PCI é uma estratégia em que a aplicação de um breve período de isquemia e reperfusão (estímulo condicionante) resulta em um estado de proteção contra isquemia prolongada e reperfusão subsequente (16). Foi demonstrado que o estímulo condicionante é efetivo quando aplicado diretamente no órgão que será submetido a I/R (PCI local) ou quando aplicado em órgão ou tecido distante (PCI remoto) (17). Apesar da intensa investigação experimental e da descoberta de complexos mecanismos de sinalização, ainda não há explicação clara sobre como os mecanismos envolvidos no PCI promovem proteção à lesão por IR (18). Um dos mecanismos protetores parece ser a redução do estresse oxidativo através do aumento das enzimas antioxidantes (19-22).

Considerando o conhecimento experimental de que a HT e o PCI local são estratégias eficientes para reduzir a lesão por I/R, seria importante sabermos se a associação das duas estratégias poderia ter efeitos protetores sinérgicos. Então, conduzimos um estudo para avaliar os efeitos do PCI local associado a HT na lesão renal por I/R, particularmente quanto a extensão das alterações histológicas, dano por estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes.

MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), em conformidade com os Princípios Internacionais para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais, publicados pelo Conselho de Organizações Internacionais de Ciências Médicas (CIOMS), assim como com a lei brasileira de uso científico dos animais (Lei 11.794/2008).

Animais e desenho experimental

Ratos Wistar adultos foram alojados na Unidade de Experimentação Animal do Hospital

de Clínicas de Porto Alegre em grupos de 4 em gaiolas separadas em temperatura ambiente ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) com ciclo claro/escuro de 12h e livre acesso a água e ração padrão. De forma prospectiva, os ratos foram aleatoriamente alocados para 5 grupos experimentais (Figura 1). No grupo 1 (HT, n=8), o rim esquerdo foi submetido apenas a hipotermia tópica a 4°C por 40 min, sem isquemia. Esse grupo foi desenhado para avaliar se a hipotermia tópica intensa poderia por si só causar algum dano. No grupo 2 (IR, n=8), o rim esquerdo foi submetido a isquemia quente por 40 min e reperfusão por 4 h. No grupo 3 (PCI+IR, n=8), o rim esquerdo foi submetido ao PCI, que consistiu em 15 min de isquemia quente e 10 min de reperfusão, seguido de isquemia quente por 40 min e reperfusão por 4 h. No grupo 4 (HT+IR, n=8), o rim esquerdo foi submetido a isquemia fria por 40 min e reperfusão por 4 h. No grupo 5 (IPC+HT+IR, n=8), o rim esquerdo foi submetido a PCI seguido de isquemia fria por 40 min e reperfusão por 4 h. Nefrectomia direita foi realizada em todos os ratos antes de qualquer procedimento. Oito rins direitos aleatoriamente designados constituíram o grupo controle (n=8).

Após pesagem, os animais foram submetidos a indução inalatória da anestesia geral com vaporizador de isoflurano a 3-5%, administrado através de campânula. Após, os animais foram colocados em mesa cirúrgica aquecida em posição supina e os reflexos da pata traseira foram testados para garantir o plano anestésico estava adequado. Para manutenção da anestesia, foram utilizados fluxo de oxigênio a 1L/min e vaporizador de isoflurano a 2-3%. Um termômetro eletrônico retal comum (Termomed 1.0, Incoterm, Porto Alegre, Brasil) foi utilizado para aferição da temperatura sistêmica. Se necessário, uma lâmpada incandescente era utilizada para manter a temperatura sistêmica entre $35,5^{\circ}\text{C}$ - $37,5^{\circ}\text{C}$. Antes da incisão abdominal, foi injetado bupivacaína 0,5% na parede abdominal para garantir controle da dor durante e após o procedimento. Foi realizada uma incisão mediana longitudinal e em seguida a nefrectomia direita. Metade do rim direito foi colocado em formalina 10% e a outra metade congelada e armazenada a -80°C . Após, o rim esquerdo foi submetido a um dos cinco protocolos experimentais previamente descritos. Para induzir isquemia, o pedículo renal foi clampeado com um clipe microvascular atraumático (Medicon, Tuttlingen, Alemanha). A temperatura cortical do

rim esquerdo foi aferida com um probe intraparenquimatoso conectado a um termômetro específico (BAT 12, IITC Life Science, W. Hills, CA, EUA). Nos grupos expostos a HT (Grupos HT, HT+IT e PCI+HT+IR), a temperatura-alvo (4°C) do rim esquerdo foi obtida com gelo picado de solução salina. Para evitar hipotermia sistêmica, um sistema de sucção foi utilizada para remover a solução salina derretida e o rim esquerdo foi isolado do resto da cavidade abdominal através da aplicação de um dispositivo especialmente confeccionado. Após 40 min de HT com ou sem isquemia, o pedículo renal era desclampeado e a parede abdominal fechada. Os animais eram movidos para uma nova gaiola com água, mas sem comida. Após 4 h de reperfusão, eles eram novamente movidos da gaiola para a mesa cirúrgica. Novamente era realizada anestesia geral inalatória. As suturas da parede abdominal eram removidas e, subsequentemente, era realizada a nefrectomia esquerda. Os mesmos procedimentos empreendidos com o rim direito eram praticados no rim esquerdo. Amostra de sangue era coletada através de punção cardíaca. Cardiectomia foi feita para garantir a morte do animal durante a anestesia.

Alterações histológicas

Metade de cada rim foi fixado em formalina 10%, embebido em parafina, cortado em lâminas e corado pelo método de hematoxilina e eosina (H&E) e ácido periódico de Schiff (PAS). Os critérios empregados para graduar a gravidade da necrose tubular aguda foram a escala de 5 pontos descrita por Jablonski *et al* (23): 0, nenhuma anormalidade; 1, mitose e necrose de células individuais; 2, necrose de todas as células adjacentes aos túbulos contorcidos proximais, mas com sobrevivência dos túbulos vizinhos; 3, necrose confinada ao terço distal dos túbulos contorcidos proximais com uma banda de necrose estendendo-se através do córtex interno; 4, necrose afetando todos os três segmentos dos túbulos contorcidos proximais. Todas as lâminas foram examinadas por um patologista experiente em patologia renal, que estava cegado para os grupos controle e experimentais.

Preparação do homogeneizado de rim

Os rins foram pesados e homogeneizados por 40 seg em uma homogeneizadora Ultra-

Turrax (IKA Works Inc., Wilmington, DE, EUA) a 4°C na presença de 1,15% KCL (9ml por g de tecido) e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) a uma concentração de 100 mM em isopropanol (10 µl por ml of KCl). O homogeneizado foi então centrifugado por 10 min a 3.000 rpm in uma centrífuga refrigerada (SORVALL Super T21; Kendro Laboratory Products, Weaverville, NC, EUA). O precipitado foi descartado e o sobrenadante retirado e congelado a -80°C para análises bioquímicas subsequentes

Proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford utilizando albumina bovina como padrão, seguido de espectrofotometria a 595 nm. A concentração de proteínas foi utilizada para determinar os níveis das enzimas antioxidantes.

Dano por estresse oxidativo

A extensão do estresse oxidativo foi avaliada pela determinação dos níveis teciduais de F2-isoprostanos (F2IP), um marcador confiável da peroxidação lipídica (24), usando o kit 8-iso-PGF2α ELISA (ADI-900-010, Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, EUA) após a homogeneização do rim.

Atividade das enzimas antioxidantes

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela inibição da reação do radical superóxido com adrenalina em um espectrofotômetro a 480 nm. Os resultados são expressão como USOD/min/mg proteína. A atividade da catalase (CAT) foi calculada baseado na decomposição do peróxido de hidrogênio em um espectrofotômetro a 240 nm. Os resultados desse procedimento são expressos como pmol/mg proteína.

Análise estatística

Os dados foram analisados para significância estatística pela aplicação do modelo linear

generalizado usando o programa SPSS (SPSS Statistics for Windows, Version 21.0, IBM Corp., Armonk, NY, EUA). Foi utilizado o modelo normal para variáveis simétricas e o modelo gama para variáveis assimétricas. Como isso envolve múltiplos testes pareados, a correção de Bonferroni foi aplicada para o nível de significância de cada teste. Todos os valores *P* foram bicaudais, e um valor de *P* menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Os dados são expressos como média ± erro padrão (EP).

RESULTADOS

Os ratos pesaram entre 235 e 405g. A temperatura sistêmica mínima foi menor nos grupos submetidos a HT ($P < 0,001$), apesar de todos esforços para manter a temperatura sistêmica na faixa da normalidade. Contudo, esses três grupos atingiram temperaturas sistêmicas mínimas que foram discretamente abaixo da faixa da normalidade (HT = $36,1 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, HT+IR = $35,5 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ e PCI+HT+IR = $35,8 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$).

A avaliação histológica revelou maiores graus de necrose tubular aguda nos grupos que foram submetidos a isquemia quente (grupos IR e PCI+IR) comparado ao controle e grupos submetidos a hipotermia tópica (grupos HT e HT+IR). Exceção a isso foi o grupo PCI+HT+IR: quando o PCI foi associado a 40 min de isquemia fria, o PCI parece ter diminuído a proteção da HT aos alterações histológicas atribuíveis a lesão por I/R (Figura 2).

O dano por estresse oxidativo, medido pela análise dos F2IP, foi menor no grupo HT, comparado aos grupos HT+IR e PCI+HT+IR. Mais importante, todos os grupos submetidos a isquemia (IR, PCI+IR, HT+IR e PCI+HT+IR) foram estatisticamente iguais ao controle em relação aos níveis de F2IP (Figura 3).

O resultado da atividade das enzimas antioxidantes está mostrado na Tabela 1. A atividade da CAT foi maior nos grupos submetidos a isquemia quente (grupos IR e PCI+IR), comparado ao grupo HT+IR. Quando o PCI foi associado a 40 min de isquemia fria (grupo PCI+HT+IR), a atividade da CAT não foi diferente de nenhum grupo. Em relação a atividade da

SOD, não houve diferença estatística entre os grupos.

DISCUSSÃO

Apesar de vários estudos terem avaliado a os efeitos do pré-condicionamento isquêmico na lesão renal por I/R, nenhum deles avaliou se o pré-condicionamento isquêmico local tem efeito protetor sinérgico quando associado a hipotermia tópica durante isquemia prolongada (17). Em verdade, Toras *et al.* publicaram resultados funcionais e histológicos do pré-condicionamento isquêmico local em rins perfundidos com solução de Euro-Collins e preservados com hipotermia tópica por 5 horas antes do transplante. Eles mostraram que o pré-condicionamento isquêmico antes da preservação com hipotermia tópica resultou em menor creatinina sérica e necrose tubular aguda após o transplante (25). Considerando que a hipotermia tópica é uma ferramenta útil na prática cirúrgica não apenas para transplante, mas também para outras situações como nefrectomia parcial, o presente estudo foi desenhado para avaliar se o pré-condicionamento isquêmico local e a hipotermia tópica somam efeitos protetores na lesão por I/R após 40 min de isquemia em um experimento agudo (4 h de reperfusão) usando as alterações histológicas como desfecho principal. Além disso, avaliamos a peroxidação lipídica e atividade enzimática antioxidante no tecido renal devido a escassez de dados quanto aos efeitos do pré-condicionamento isquêmico nesses tópicos, a despeito da relevância do estresse oxidativo na lesão por I/R injury (26-28).

A nefrectomia direita foi realizada antes da realização de qualquer protocolo experimental no rim contra-lateral porque a recuperação de um rim danificado por isquemia é afetado pela presença de um rim saudável (29). Quanto à temperatura sistêmica mínima ter sido estatisticamente menor nos grupos submetidos a hipotermia tópica, não foi clinicamente relevante (30). Portanto, acreditamos que não interferiu nos resultados.

Primeiramente, nós mostramos que a hipotermia tópica por si só não causa nenhuma alteração histológica, dano por estresse oxidativo ou alterações na atividade das enzimas antioxidantes. Em relação às alterações histológicas nos grupos submetidos a isquemia,

aparentemente o pré-condicionamento isquêmico não apenas falhou em diminuir a necrose tubular aguda, mas também diminuiu o efeito protetor da hipotermia tópica. Alguns estudos previamente publicados avaliando o dano histológico com a utilização de uma escala comparável de 5 pontos mostraram necrose tubular aguda significativamente menor com o uso do pré-condicionamento isquêmico local antes de isquemia prolongada, mas nem todos estudos tiveram resultados positivos. Uma meta-análise recente que avalia coletivamente os efeitos do pré-condicionamento isquêmico local e remoto nas alterações histológicas indica que o pré-condicionamento isquêmico é benéfico (17).

A atividade do antioxidante CAT foi claramente maior nos grupos submetidos a isquemia quente (IR e PCI+IR), comparado ao grupo HT+IR. Quando o pré-condicionamento isquêmico foi realizado antes da isquemia fria (grupo PCI+HT+IR), ele prejudicou a redução da atividade da CAT induzida pela hipotermia tópica, impedindo que essa diferença fosse estatisticamente significativa. O aumento da atividade da CAT foi observada anteriormente em rins submetidos a condições similares de lesão por I/R (22). Outros estudos com diferentes períodos de isquemia quente e reperfusão antes da retirada do rim tiveram resultados conflitantes (31-35). Essencialmente, períodos maiores de isquemia consistentemente acarretaram diminuição da atividade da CAT (31-34). Talvez o aumento da atividade da CAT em nosso modelo possa ter ocorrido devido a períodos de isquemia e reperfusão curtos, induzindo um insulto por estresse oxidativo leve que causou um aumento da atividade da CAT nas primeiras horas antes de sua inativação.

Nossa avaliação dos níveis de F2IP não evidenciou diferença estatística entre os grupos em que os rins foram submetidos a qualquer protocolo de isquemia. Como esperado, a hipotermia tópica a 4°C sem isquemia não causou nenhum dano por estresse oxidativo. Usando outro marcador para peroxidação lipídica (TBARS), Dobashi *et al.* mostraram que 30 min de isquemia não foi capaz de aumentar seus níveis. Entretanto, 60 e 90 min de isquemia consistentemente apresentaram aumento da peroxidação lipídica (31). A atividade da SOD foi similar entre os grupos. Apesar de também ter alguns resultados conflitantes na literatura, os

padrões de variação da atividade da SOD são muito semelhantes aos da CAT (31-35).

Em suma, nosso estudo mostrou que a hipotermia tópica por si só não causa nenhum dano para o rim, nem histológico nem relacionado a estresse oxidativo. Quando a hipotermia tópica é sobreposta a isquemia, as alterações histológicas e o estresse oxidativo é diminuído. Em relação ao pré-condicionamento isquêmico, não encontramos efeito protetor na lesão por I/R, diferentemente de outros estudos previamente publicados (17). Uma possível explicação para essa dissonância é a natureza aguda do nosso experimento, com apenas 4 horas de reperfusão. Também existem estudos indicando que o isoflurano, agente anestésico utilizado, tem características preconditionantes próprias (36-38). Isso pode ter exercido um viés de confusão em nossos desfechos.

CONCLUSÃO

Não foi demonstrado efeito sinérgico do pré-condicionamento isquêmico associado a hipotermia tópica na proteção da lesão renal por I/R, pois as alterações histológicas, o dano por estresse oxidativo e a atividade das enzimas antioxidantes não foi diferente dos rins submetidos a isquemia fria (grupo HT+IR) ou isquemia quente, com ou sem pré-condicionamento isquêmico (grupos PCI+IR e IR). Em verdade, em nosso modelo o pré-condicionamento isquêmico além de não mostrar benefício, diminuiu os efeitos protetores da hipotermia tópica.

AGRADECIMENTOS

Esse estudo recebeu apoio financeiro do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA), Porto Alegre, Brasil. Os autores declaram ausência de conflitos de interesse.

Agradecemos a equipe da Unidade de Experimentação Animal, da Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas e da Unidade de Patologia Experimental do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil, pelo seu suporte técnico e auxílio.

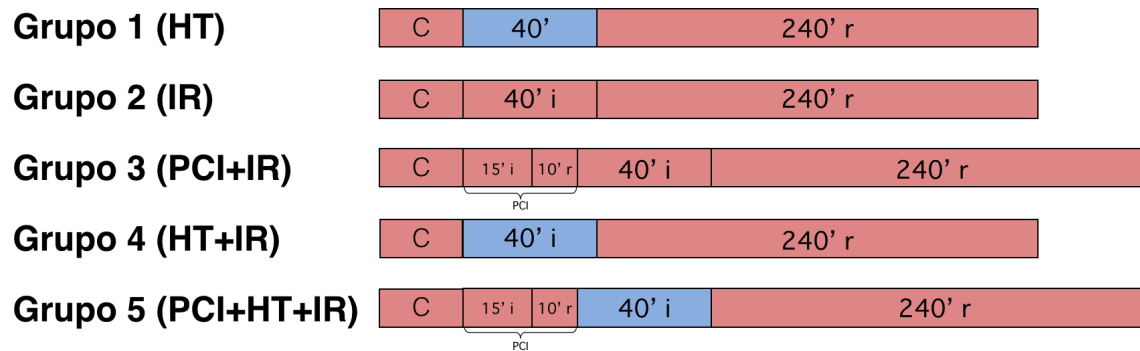
TABELA 1 - Atividade das enzimas antioxidantes¹

Variáveis	Contr	HT	IR	PCI+I	HT+IR	PCI+H
	ole			R		T+IR
CAT (pmol/mg prot)	64,4± 6,1	60,5± 5,5	81,8± 6,9*	74,1± 4,0*	47,5± 4,8	59,9±2, 3
SOD (USOD/min/mg prot)	9,4±1 ,2	7,1±0 ,6	8,6±1 ,4	7,0±0 ,5	8,7±2, 3	6,3±0,6

¹ Dados são expressos como média ± EP. Modelo linear generalizado ajustado para peso, idade e temperatura sistêmica mínima. A correção de Bonferroni foi aplicada ao nível de significância de cada teste.

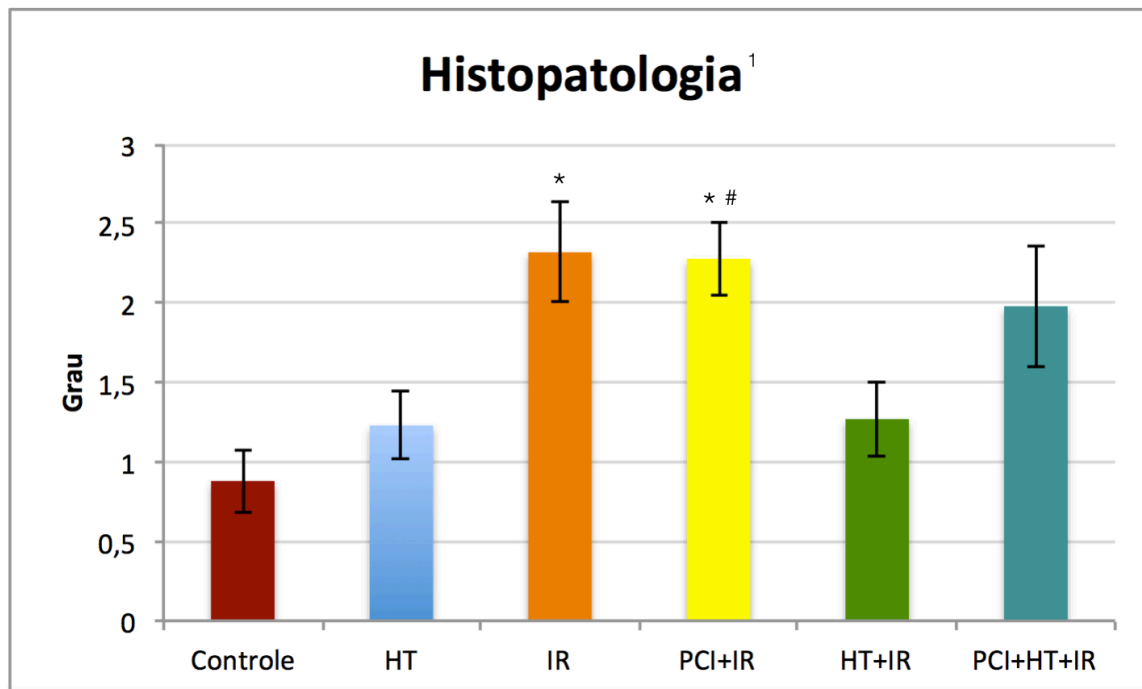
* Significativamente diferente de HT+IR (P < 0,05).

FIGURA 1 - Protocolos experimentais



“C” indica a retirada do rim direito. Oito rins direitos foram aleatoriamente escolhidos para representar o Grupo 0 (controle). “i” indica isquemia. “r” indica reperfusão. Fundo azul indica hipotermia tópica.

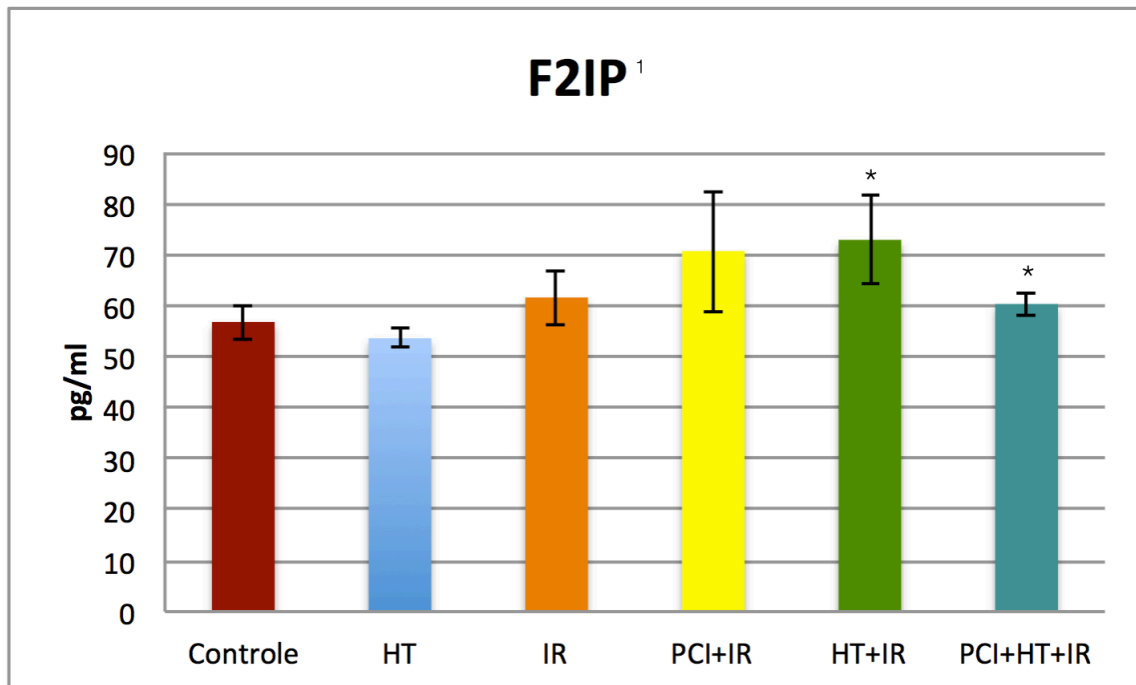
FIGURA 2 - Grau das alterações histológicas



¹ Dados são expressos como média ± EP. Modelo linear generalizado ajustado para peso, idade e temperatura sistêmica mínima. A correção de Bonferroni foi aplicada ao nível de significância de cada teste.

* Significativamente diferente do Controle e HT ($P < 0,05$).

Significativamente diferente do HT+IR ($P < 0,05$).

FIGURA 3 - Análise dos F2-isoprostanos

¹ Dados são expressos como média \pm EP. Modelo linear generalizado ajustado para peso, idade e temperatura sistêmica mínima. A correção de Bonferroni foi aplicada ao nível de significância de cada teste.

* Significativamente diferente do HT ($P < 0,05$).

REFERÊNCIAS

1. Eltzhig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nature Medicine*. 2011 Nov 1;17(11):1391–401.
2. Yossepowitch O, Eggener SE, Serio A, Huang WC, Snyder ME, Vickers AJ, et al. Temporary Renal Ischemia During Nephron Sparing Surgery is Associated With Short-Term but Not Long-Term Impairment in Renal Function. *The Journal of Urology*. 2006 Oct;176(4):1339–43.
3. Pruthi R, Casula A, MacPhee I. UK Renal Registry 18th Annual Report: Chapter 3 Demographic and Biochemistry Profile of Kidney Transplant Recipients in the UK in 2014: National and Centre-specific Analyses. *Nephron*. 2016;132 Suppl 1:69–98.
4. Kosieradzki M, Rowiński W. Ischemia/Reperfusion Injury in Kidney Transplantation: Mechanisms and Prevention. *Transplantation Proceedings*. 2008 Dec 1;40(10):3279–88.
5. Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nature Reviews Nephrology*. 2011 Apr 1;7(4):189–200.
6. Tilney NL, Guttman RD. Effects of initial ischemia/reperfusion injury on the transplanted kidney. *Transplantation*. 1997 Oct 15;64(7):945–7.
7. Land WG. The role of postischemic reperfusion injury and other nonantigen-dependent inflammatory pathways in transplantation. *Transplantation*. 2005 Mar 15;79(5):505–14.
8. Lu CY, Penfield JG, Kielar ML, Vazquez MA, Jeyarajah DR. Hypothesis: is renal allograft rejection initiated by the response to injury sustained during the transplant process? *Kidney Int*. 1999 Jun;55(6):2157–68.
9. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schmouder RL. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation*. 1997 Apr 15;63(7):968–74.
10. Novick AC. Renal hypothermia: in vivo and ex vivo. *Urol Clin North Am*. 1983 Nov;10(4):637–44.

11. Becker F, van Poppel H, Hakenberg OW, Stief C, Gill I, Guazzoni G, et al. Assessing the impact of ischaemia time during partial nephrectomy. *European Urology*. 2009 Oct;56(4):625–34.
12. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*. 1988 Apr;45(4):673–6.
13. Opelz G, Wujciak T. Comparative analysis of kidney preservation methods. Collaborative Transplant Study. *Transplantation Proceedings*. 1996 Feb;28(1):87–90.
14. Opelz G. Newsletter 3. Collaborative Transplant Study. 2006. Aug: 1-4.
15. Matas AJ, Smith JM, Skeans MA, Thompson B, Gustafson SK, Schnitzler MA, et al. OPTN/SRTR 2012 Annual Data Report: Kidney. *Am J Transplant*. 2014 Jan 1;14(S1):11–44.
16. Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Atherosclerosis*. 2009 Jun;204(2):334–41.
17. 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 Feb 28;7(2):e32296.
18. Hausenloy DJ, Yellon DM. The therapeutic potential of ischemic conditioning: an update. *Nat Rev Cardiol*. 2011 Nov;8(11):619–29.
19. Lee W-Y, Lee S-M. Ischemic preconditioning protects post-ischemic oxidative damage to mitochondria in rat liver. *Shock*. 2005 Oct;24(4):370–5.
20. Das M, Das DK. Molecular mechanism of preconditioning. *IUBMB Life*. 2008 Apr;60(4):199–203.
21. 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;26(3):194–201.
22. Santos EBD, Koff WJ, Grezzana Filho T de JM, De Rossi SD, Treis L, Bona SR, et al. Oxidative stress evaluation of ischemia and reperfusion in kidneys under various degrees of hypothermia in rats. *Acta Cir Bras*. 2013;28(8):568–73.

23. 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.
24. 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? *British Journal of Pharmacology*. 2004 May;142(2):231–55.
25. 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.
26. Baker GL, Corry RJ, Autor AP. Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion. Protective effect of superoxide dismutase. *Annals of Surgery*. 1985 Nov;202(5):628–41.
27. Johnson KJ, Weinberg JM. Postischemic renal injury due to oxygen radicals. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1993 Jul;2(4):625–35.
28. Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest*. 1984 Oct;74(4):1156–64.
29. Finn WF. Enhanced recovery from postischemic acute renal failure. Micropuncture studies in the rat. *Circ Res*. 1980 Mar 1;46(3):440–8.
30. Torossian A, Ruehlmann S, Middeke M, Sessler DI, Lorenz W, Wulf HF, et al. Mild pre-septic hypothermia is detrimental in rats. *Critical Care Medicine*. 2004 Sep;32(9):1899–903.
31. Dobashi K, Ghosh B, Orak JK, Singh I, Singh AK. Kidney ischemia-reperfusion: modulation of antioxidant defenses. *Mol Cell Biochem*. 2000 Feb;205(1-2):1–11.
32. Sela S, Shasha SM, Mashiach E, Haj M, Kristal B, Shkolnik T. Effect of oxygen tension on activity of antioxidant enzymes and on renal function of the postischemic reperfused rat kidney. *Nephron*. 1993;63(2):199–206.
33. Singh I, Gulati S, Orak JK, Singh AK. Expression of antioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury. *Mol Cell Biochem*. 1993 Aug 25;125(2):97–104.
34. Barnard ML, Snyder SJ, Engerson TD, Turrens JF. Antioxidant enzyme status of

- ischemic and postischemic liver and ischemic kidney in rats. *Free Radical Biology and Medicine*. 1993 Aug 1;15(2):227–32.
35. Yoshioka T, Bills T, Moore-Jarrett T, Greene HL, Burr IM, Ichikawa I. Role of intrinsic antioxidant enzymes in renal oxidant injury. *Kidney Int*. 1990 Aug 1;38(2):282–8.
 36. Cason BA, Gamperl AK, Slocum RE, Hickey RF. Anesthetic-induced Preconditioning Previous Administration of Isoflurane Decreases Myocardial Infarct Size in Rabbits. *Anesthesiology*. 1997 Nov 1;87(5):1182–90.
 37. Cope DK, Impastato WK, Cohen MV, Downey JM. Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. *Anesthesiology*. 1997 Mar;86(3):699–709.
 38. Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC. Isoflurane Mimics Ischemic Preconditioning via Activation of KATPChannels Reduction of Myocardial Infarct Size with An Acute Memory Phase. *Anesthesiology*. 1997 Aug 1;87(2):361–70.

6 ARTIGO ORIGINAL REDIGIDO EM LÍNGUA INGLESA**The effects of local ischemic preconditioning and topical hypothermia in renal ischemia/reperfusion injury in rats¹**

Guilherme Behrend Ribeiro^I, Emanuel Burck dos Santos^{II}, Silvia Regina Bona^{III}, Pedro Guilherme Schaefer^{IV}, Tuane Alves Garcez^V, Eduardo Brasil Rabolini^{VI}, Guilherme Pereira Smaniotto^{VI}, Norma Possa Marroni^{VII}, Carlos Otávio Corso^{VIII}

^IFellow Master degree, Postgraduate Program in Medicine: Surgical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS, Brazil. Conception and design of the study; technical procedures; acquisition, interpretation and analysis of data; manuscript writing.

^{II}MSc, PhD, Department of Urology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil. Conception and design of the study, critical revision.

^{III}PhD, Laboratory of Experimental Gastroenterology and Hepatology, HCPA, Brazil. Acquisition and interpretation of data, technical procedures.

^{IV}MD, Department of Pathology, HCPA, Porto Alegre-RS, Brazil. Histopathological examinations, acquisition of data.

^VMSc, Animal Experimentation Unit, HCPA, Porto Alegre-RS, Brazil. Technical procedures.

^{VI}Graduate student, School of Medicine, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brazil. Acquisition of data, technical procedures.

^{VII}MSc, Full Professor, Physiologist, Laboratory of Experimental Gastroenterology and Hepatology, UFRGS, Porto Alegre-RS, and Laboratory of Oxidative Stress and Antioxidants, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas-RS, Brazil. Acquisition and interpretation of data, technical procedures.

^{VIII}MSc, Associate Professor of Surgery, Digestive Surgery Unit, HCPA, and Department of Surgery, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brazil. Conception and design of the study, interpretation of data, manuscript writing, critical revision, final approval.

Abstract

Purpose: Topical hypothermia and local ischemic preconditioning have been shown to reduce renal ischemia-reperfusion (I/R) injury individually. We examined whether combination of both strategies lessens renal I/R injury.

Methods: Post right nephrectomy, 40 male Wistar rats were randomly assigned to five experimental protocols performed in the left kidney: topical hypothermia without ischemia (TH), warm ischemia (IR), ischemic preconditioning followed by warm ischemia (IPC+IR), cold ischemia (TH+IR), and ischemic preconditioning followed by cold ischemia (IPC+TH+IR). Eight randomly assigned right kidneys constituted the control group. After 240 min of reperfusion, the left kidney was retrieved to evaluate histological changes, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity. Serum was collected to evaluate urea and creatinine.

Results: IPC+TH+IR group revealed no difference to any other group subjected to ischemia in relation to histological changes, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity. Creatinine was lower in IPC+TH+IR group compared with IPC+IR, but showed no difference compared to TH+IR group.

Conclusions: Combination of local ischemic preconditioning (IPC) and topical hypothermia conferred no protection in renal I/R injury. Moreover, local IPC solely followed by warm ischemia impaired renal function more than warm ischemia alone.

Key words: Ischemic Preconditioning. Hypothermia. Reperfusion Injury. Oxidative Stress.

Introduction

Ischemia-reperfusion (I/R) injury underlies much of the tissue damage that occurs in stroke and myocardial infarction, two of the most common clinical I/R syndromes, and it also plays a part in damage to other organs following ischemia¹. In partial nephrectomies and renal transplants, the kidney is exposed to variable periods of warm and cold ischemia. Cell injury and death follow interruption of the blood supply to the kidney, and reperfusion is mandatory to salvage the tissue. However, despite reperfusion being an integral part of the healing process, it also contributes to the exacerbation of tissue injury and a profound inflammatory response, called 'reperfusion injury'¹. This entire pathophysiology has been described as the I/R injury².

The kidney is comprised of heterogeneous cell populations that function in concert to perform a number of tightly controlled and complex processes. Ischemia leads to molecular changes in the vasculature and interstitium of the kidney, and reperfusion gives rise to an acute inflammatory response. Together, these events induce acute kidney injury, resulting in the disruption of renal function and a reduction of glomerular filtration rate³. In kidney transplantation, the degree of I/R injury determines the speed of recovery of organ function in the short-term⁴ and may modulate organ rejection in the long-term by priming the immune system early after transplantation^{5,6}. Therefore, reduction in I/R injury has the potential to improve the outcome of kidney (and other organs) transplantation, in both the short and long term⁷.

Strategies to limit clinical I/R injury have mainly focused on timely reperfusion and hypothermia^{8,9}. Topical hypothermia (TH) with pulsatile perfusion or single flushing of a preservation solution has been the mainstay of kidney storage for transplantation¹⁰. However, the number of transplants that fail each year and increasing waiting lists highlight that new strategies are needed to enhance kidney tolerance to I/R injury¹¹. One such strategy is ischemic preconditioning (IPC).

IPC involves application of a brief episode of ischemia and reperfusion (conditioning stimulus), resulting in tissue tolerance to subsequent I/R injury¹². The conditioning stimulus has

been shown to be effective when applied either to the target organ itself (local IPC) or to a remote organ or tissue (remote IPC)¹³. Currently, many of the complex signal-transduction pathways underlying ischemic preconditioning have been clarified¹⁴. One of the mechanisms seems to be the reduction of oxidative stress through an increase in antioxidant enzymes¹⁵⁻¹⁷.

Given the experimental knowledge that TH and local IPC are efficient strategies to reduce renal I/R injury, it would be important to know if a combination of both strategies could have synergistic protective effects. We therefore sought to study the effects of local IPC combined with TH on renal I/R injury, particularly on the extent of histological changes, oxidative stress damage, antioxidant enzymes activity, and biochemical functional parameters.

Methods

The study was approved by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Animals Research Ethics Committee (case 14-0091) in accordance with the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, published by the Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS), as well as with the Brazilian law on scientific use of animals (Law 11794/2008).

Animals and experimental design

Adult male Wistar rats weighing between 235 and 405 g (7-11 weeks old) were housed in the Animal Experimentation Unit of Hospital de Clínicas de Porto Alegre in groups of four in separate cages at room temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) with a 12-hour light/dark cycle and free access to water and rat chow. In a prospective design, rats were randomly allocated to five experimental groups (Figure 1). Group 1 (TH, n=8) rats underwent left kidney TH at 4°C for 40 min without ischemia. This group was designed to appreciate if deep hypothermia could cause any damage. Group 2 (IR, n=8) rats underwent left kidney warm ischemia for 40 min and subsequent 4 h reperfusion. Group 3 (IPC+IR, n=8) rats underwent left kidney IPC, consisting of 15 min of warm ischemia and 10 min of reperfusion, followed by warm ischemia for 40 min and subsequent 4 h

reperfusion. Group 4 (TH+IR, n=8) rats underwent left kidney cold ischemia for 40 min and subsequent 4 h reperfusion. Group 5 (IPC+TH+IR, n=8) rats underwent left kidney IPC followed by cold ischemia for 40 min and subsequent 4 h reperfusion. Right nephrectomy was performed in all rats before any intervention. Eight randomly assigned right kidneys constituted the control group (n=8).

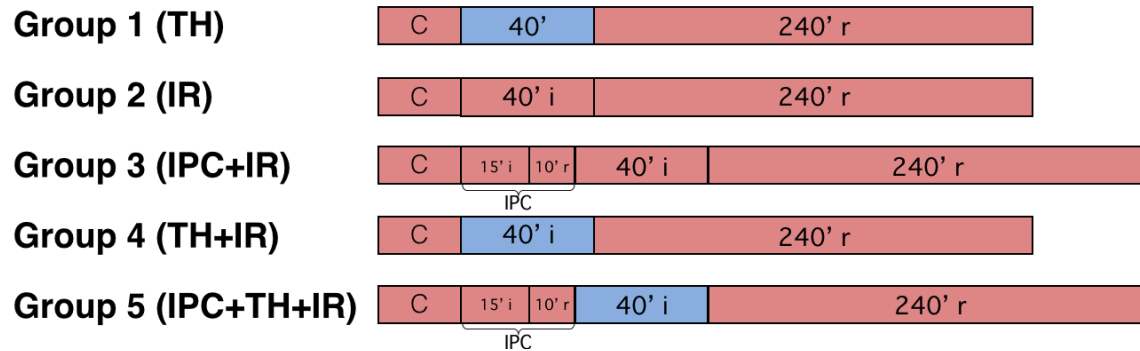


Figure 1 - Experimental protocols.

“C” indicates retrieval of right kidney for Group 0 (control). “i” indicates ischemia and “r” indicates reperfusion. Blue color indicates topical hypothermia. **TH**: topical hypothermia without ischemia; **IR**: ischemia and reperfusion; **IPC+IR**: ischemic preconditioning followed by ischemia and reperfusion; **TH+IR**: topical hypothermia with ischemia and reperfusion; **IPC+TH+IR**: ischemic preconditioning followed by topical hypothermia with ischemia and reperfusion.

After weighing, the animals underwent inhalation general anesthesia induction with isoflurane vaporizer at 3-5%, administered through campanula. Blood from retro-ocular plexus was collected. Then, animals were placed on a warm surgical table in supine position and rear paw reflexes were tested to ensure that adequate anesthesia was achieved. Oxygen at 1 L/min and isoflurane at 2-3% were used for maintenance. A common electronic rectal thermometer (Termomed 1.0, Incoterm, Porto Alegre, Brazil) was used for assessing systemic temperature. If needed, a heating lamp was used to maintain the systemic temperature between 35.5°C and 37.5°C. Before the abdominal incision, bupivacaine 0.5% was injected in the abdominal wall to ensure pain control during and after the procedure. A longitudinal median incision was made on the abdomen and surgical retractors were applied. Right nephrectomy was performed. Half of the

right kidney was put in 10% formalin and the other half frozen and stored at -80°C . Then one of the five protocols described was applied to the left kidney. To induce ischemia, the renal pedicle was clamped with an atraumatic microvascular cranial surgery clip (Medicon, Tuttlingen, Germany). Cortical left kidney temperature was assessed with an intra-parenchymal probe connected to a specific thermometer (BAT 12, IITC Life Science, W. Hills, CA, USA). In groups exposed to TH (TH, TH+IR and IPC+TH+IR groups), the left kidney target-temperature (4°C) was achieved with ice slush of saline solution. To avoid systemic hypothermia, a suction system was installed to remove the cold saline solution and the left kidney was isolated from the rest of the abdominal cavity through the application of a specially designed device made of polystyrene and latex (Figure 2). After 40 min of TH and/or ischemia, renal pedicle was unclamped and abdominal wall was closed. Animals were moved to a new warm cage with water, but without food. After 4 h of reperfusion, they were moved again from the cage to the surgical table. Inhalation general anesthesia was used as before. The abdominal wall sutures were removed and left nephrectomy was accomplished. The same procedures performed on the right kidney were carried out for the left one. Blood sample was collected through heart puncture. Cardiectomy was performed to ensure animal death under anesthesia.

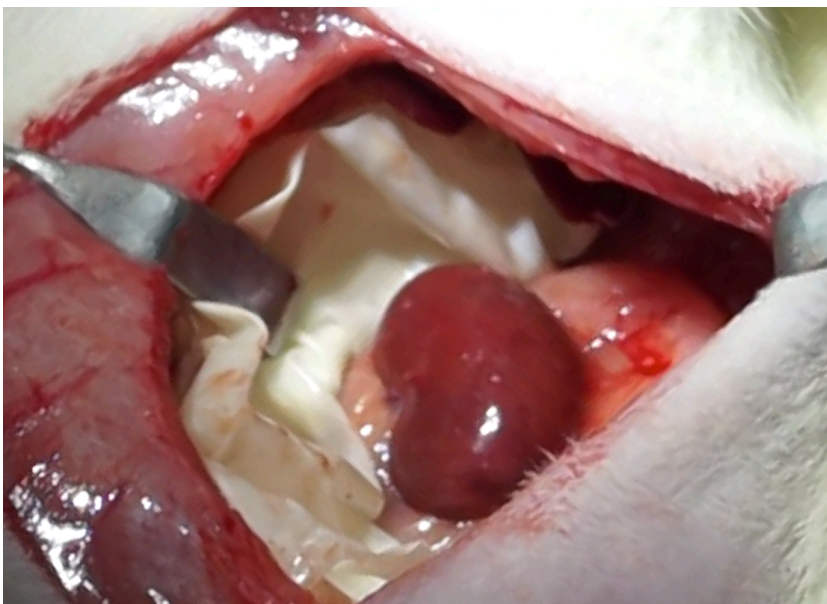


Figure 2 - The manufactured device made by sticking half of the bottom part of a polystyrene cup

inside a latex glove finger.

Histological changes

Half of each kidney was fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, sliced, and stained with hematoxylin and eosin (H&E) and periodic acid-Schiff (PAS) method. The PAS highlights the initial changes seen in acute tubular necrosis. Thus, it is straightforward to see the thinned or absent brush border of proximal tubules. The criteria employed to grade the severity of acute tubular necrosis were the 5-point scale described by Jablonski *et al.*¹⁸ with the following grades: 0, no abnormality; 1, mitoses 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 tubules. All slices were examined by an experienced renal pathologist, who was blinded to the control and treatment groups.

Kidney homogenate preparation

Kidneys were weighed and homogenized for 40 sec in an Ultra-Turrax homogenizer (IKA Works Inc., Wilmington, DE, USA) at 4°C in the presence of 1.15% KCl (9 ml per g of tissue) and phenyl-methyl-sulfonyl fluoride (PMSF) at a concentration of 100 mM in isopropanol (10 µl per ml of KCl). The homogenate was then centrifuged for 10 min at 3,000 rpm in a refrigerated centrifuge (SORVALL Super T21; Kendro Laboratory Products, Weaverville, NC, USA). The precipitate was discarded and the supernatant was recovered and frozen at -80°C for subsequent biochemical analysis.

Protein

Protein concentrations were determined using the Bradford method with bovine albumin

as a standard, followed by spectrophotometry at 595 nm. It was used to determine antioxidant enzyme levels.

Oxidative stress damage

The amount of oxidative stress damage was evaluated by measuring the levels of F2-isoprostanes (F2IP), a reliable biomarker of lipid peroxidation in the tissues, using 8-iso-PGF2 α ELISA kit (ADI-900-010, Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, USA) after kidney homogenization.

Antioxidant enzyme activity

Superoxide dismutase (SOD) activity was determined by the inhibition of the reaction of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation in a spectrophotometer at 480 nm. Results were expressed as USOD/min/mg protein. Catalase (CAT) activity was calculated based on the decomposition of hydrogen peroxide on a spectrophotometer at 240 nm. The results of this procedure were expressed as pmol/mg protein.

Biochemical functional parameter analysis

Levels of serum urea and creatinine (sCr) at baseline (from the blood collected from the retro-orbital plexus) and at the end of the experiment (from the blood collected from the heart) were estimated using a Roche Cobas 8000 c702 automatic biochemistry apparatus. Biochemical functional parameters were analyzed only with regard to experimental groups because urea and sCr were estimated from peripheral blood.

Statistics

Data were analyzed for statistical significance by the application of generalized linear models using SPSS software (SPSS Statistics for Windows, Version 21.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA). It used the normal model for symmetrical variables and gamma model for

asymmetrical variables. Because this involved multiple paired tests, the Bonferroni correction was applied to the significance level of each test. All *P* values were two-tailed, and a *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant. Data are shown as mean \pm standard error (SE).

Results

Weight was not different between groups. Minimum systemic temperature was lower in animals subjected to TH ($P < 0.001$), despite all efforts to maintain systemic temperature in the normal range. Nonetheless, the minimum systemic temperatures in these groups were slightly below normal ranges (TH: $36.1 \pm 0.1^\circ\text{C}$, TH+IR: $35.5 \pm 0.3^\circ\text{C}$, and IPC+TH+IR: $35.8 \pm 0.3^\circ\text{C}$). Urea and sCr were similar across all groups at baseline.

Histological evaluation revealed grades of acute tubular necrosis ranging from 1 to 3 (Figures 3 to 5). Because there was too much overlapping of histological changes between groups, it was not possible to assign a specific grade to any particular group (except for control group, which uniformly exhibited grade 0 pattern). There was no case of grade 4. Analysis of histological changes showed higher grades of tissue injury in kidneys of animals that underwent warm ischemia (IR and IPC+IR groups) compared with controls and kidneys of animals subjected to topical hypothermia (TH and TH+IR groups). An exception was the IPC+TH+IR group; when IPC was added to 40 min of cold ischemia, IPC seemed to decrease TH protection as seen by histological changes attributable to I/R injury (Figure 6).

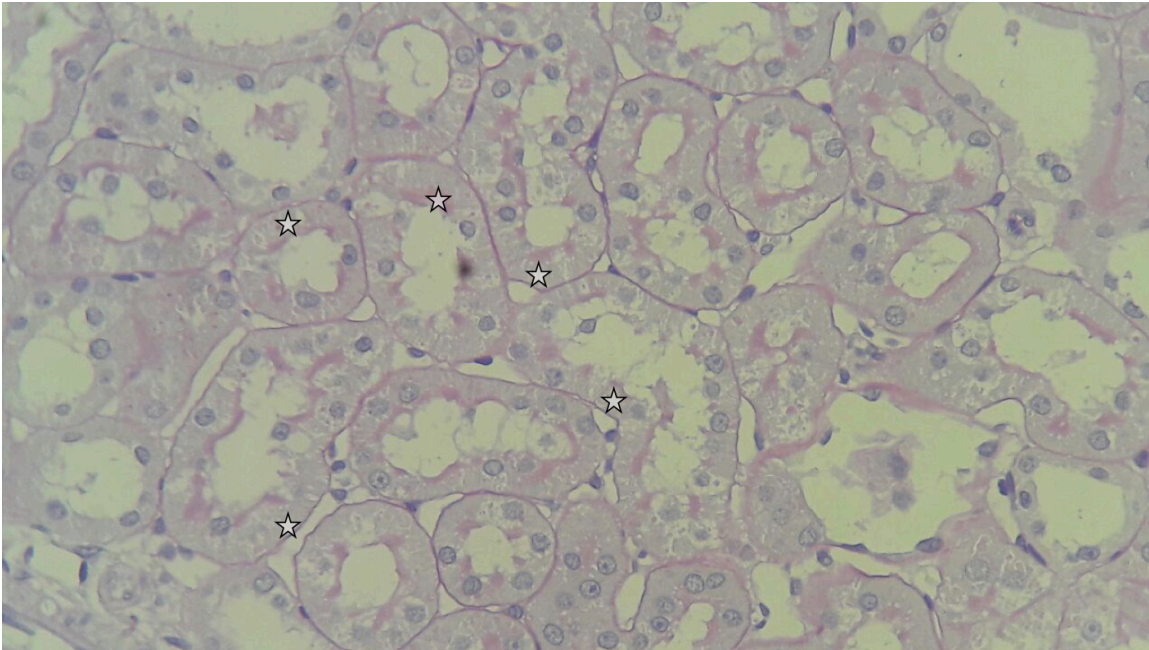


Figure 3 - Photomicrograph of renal cortex showing necrosis of individual cells and mitotic figures in Grade 1 acute tubular necrosis. (PAS x400)

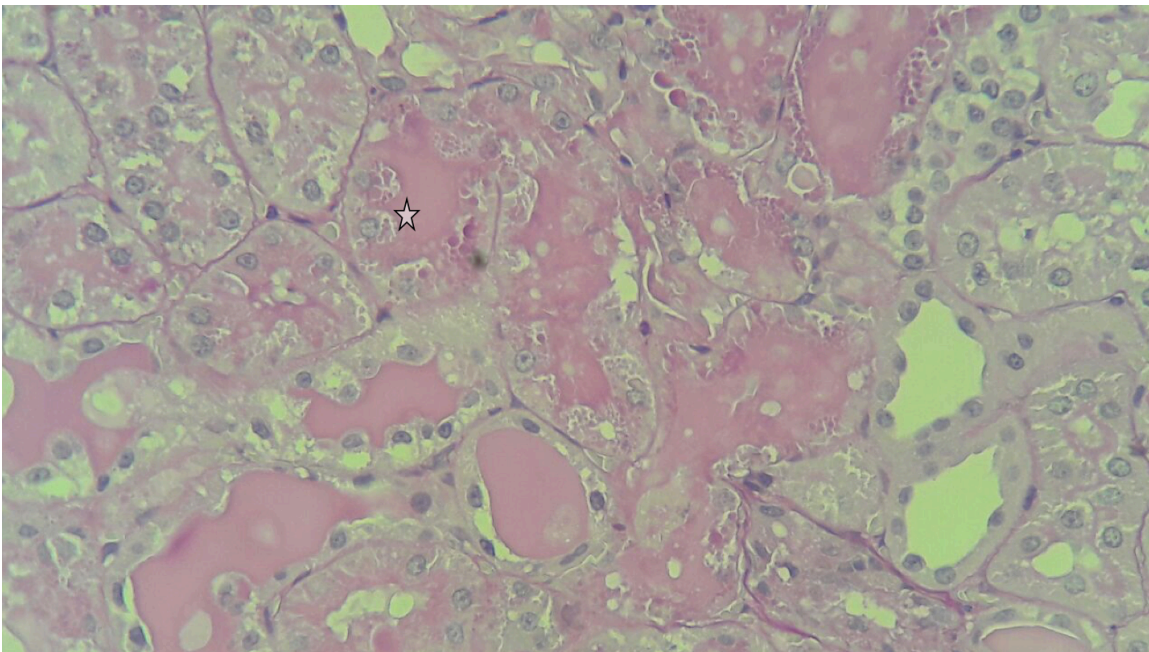


Figure 4 - Photomicrograph of renal cortex showing necrosis of a group of proximal convoluted tubules in Grade 2 acute tubular necrosis. (PAS x400)

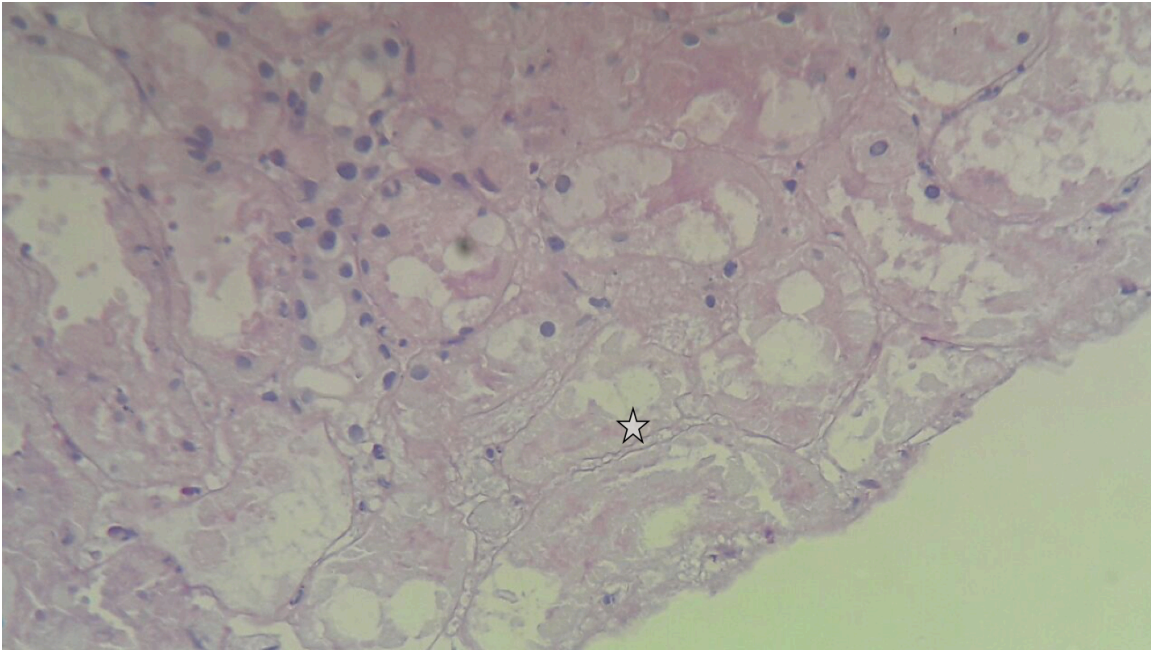


Figure 5 - Photomicrograph of renal cortex showing necrosis of distal third of the proximal convoluted tubules in Grade 3 acute tubular necrosis. (PAS x400)

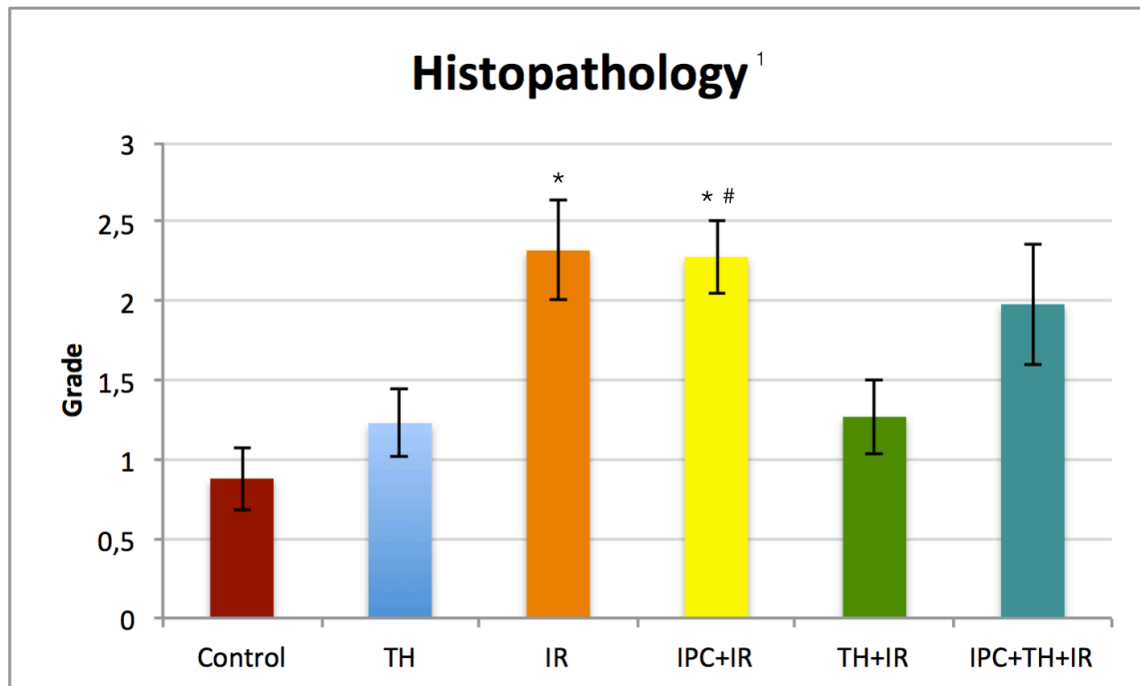


Figure 6 - Grades of histological changes.

¹Data are expressed as mean \pm SE. Generalized linear models were adjusted to weight, age, and minimum systemic temperature. The Bonferroni correction was applied to the significance level of each test; *Significantly different from Control and TH ($P < 0.05$); #Significantly different from TH+IR ($P < 0.05$); **TH**: topical hypothermia without ischemia; **IR**: ischemia and reperfusion; **IPC+IR**: ischemic preconditioning followed by ischemia and reperfusion; **TH+IR**: topical hypothermia with ischemia and reperfusion; **IPC+TH+IR**: ischemic preconditioning followed by topical hypothermia with ischemia and reperfusion.

Oxidative stress damage, as measured by F2IP tissue assay, was lower in TH group, compared with TH+IR and IPC+TH+IR groups. Most importantly, F2IP tissue levels in all the groups subjected to ischemia (IR, IPC+IR, TH+IR and IPC+TH+IR groups) were not statistically different from those in controls (Figure 7).

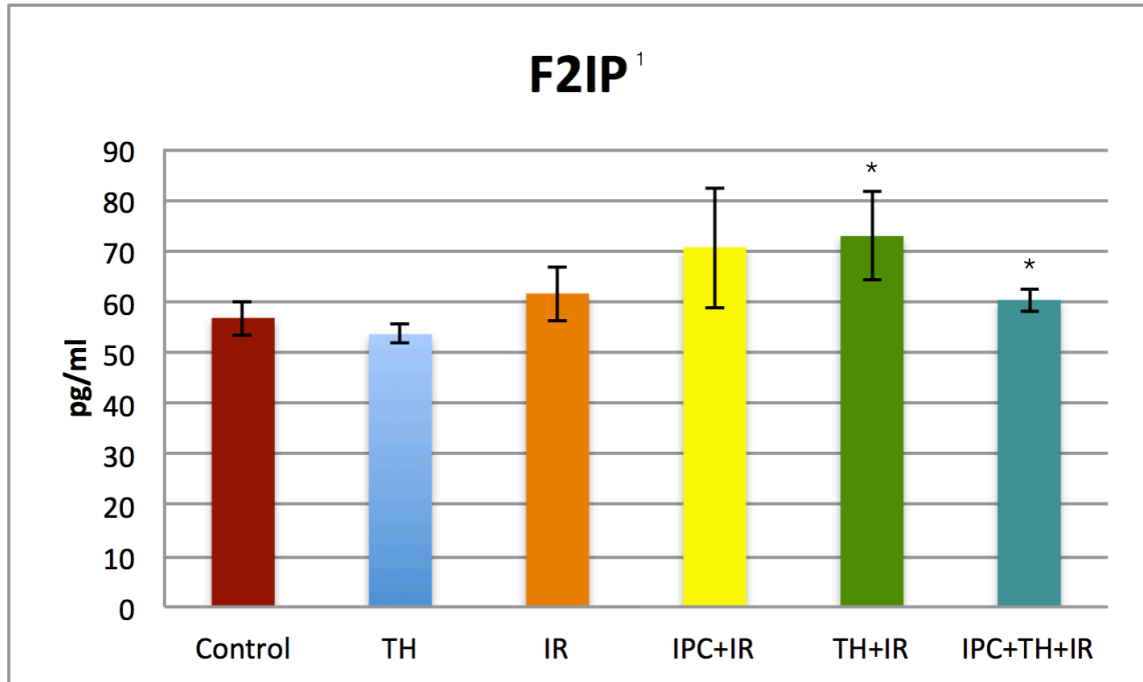


Figure 7 - F2-isoprostanes tissue assay.

¹Data are expressed as mean \pm SE. Generalized linear models were adjusted to weight, age, and minimum systemic temperature. The Bonferroni correction was applied to the significance level of each test; *Significantly different from TH ($P < 0.05$); **TH**: topical hypothermia without ischemia; **IR**: ischemia and reperfusion; **IPC+IR**: ischemic preconditioning followed by ischemia and reperfusion; **TH+IR**: topical hypothermia with ischemia and reperfusion; **IPC+TH+IR**: ischemic preconditioning followed by topical hypothermia with ischemia and reperfusion.

Antioxidant enzymes activity results are shown in Table 1. CAT activity was increased in groups subjected to warm ischemia (IR and IPC+IR groups), compared with TH+IR group. When IPC was added to 40 min of cold ischemia (IPC+TH+IR group), CAT activity showed no difference in any group. SOD activity was not statistically different among the groups.

Table 1 - Antioxidant enzymes activity¹.

Variables	Control	TH	IR	IPC+IR	TH+IR	IPC+TH+IR
CAT (pmol/mg prot)	64.4 ± 6.1	60.5 ± 5.5	81.8 ± 6.9*	74.1 ± 4.0*	47.5 ± 4.8	59.9 ± 2.3
SOD (USOD/min/mg prot)	9.4 ± 1.2	7.1 ± 0.6	8.6 ± 1.4	7.0 ± 0.5	8.7 ± 2.3	6.3 ± 0.6

¹Data are expressed as mean ± SE. Generalized linear models adjusted to weight, age, and minimum systemic temperature. The Bonferroni correction was applied to the significance level of each test; * Significantly different from TH+IR (P < 0.05); **TH**: topical hypothermia without ischemia; **IR**: ischemia and reperfusion; **IPC+IR**: ischemic preconditioning followed by ischemia and reperfusion; **TH+IR**: topical hypothermia with ischemia and reperfusion; **IPC+TH+IR**: ischemic preconditioning followed by topical hypothermia with ischemia and reperfusion.

Functional parameters at the end of the experiment revealed a higher urea in IPC+IR group, compared with IR group (Figure 8), and a higher sCr in IPC+IR group compared to all the other experimental groups (Figure 9).

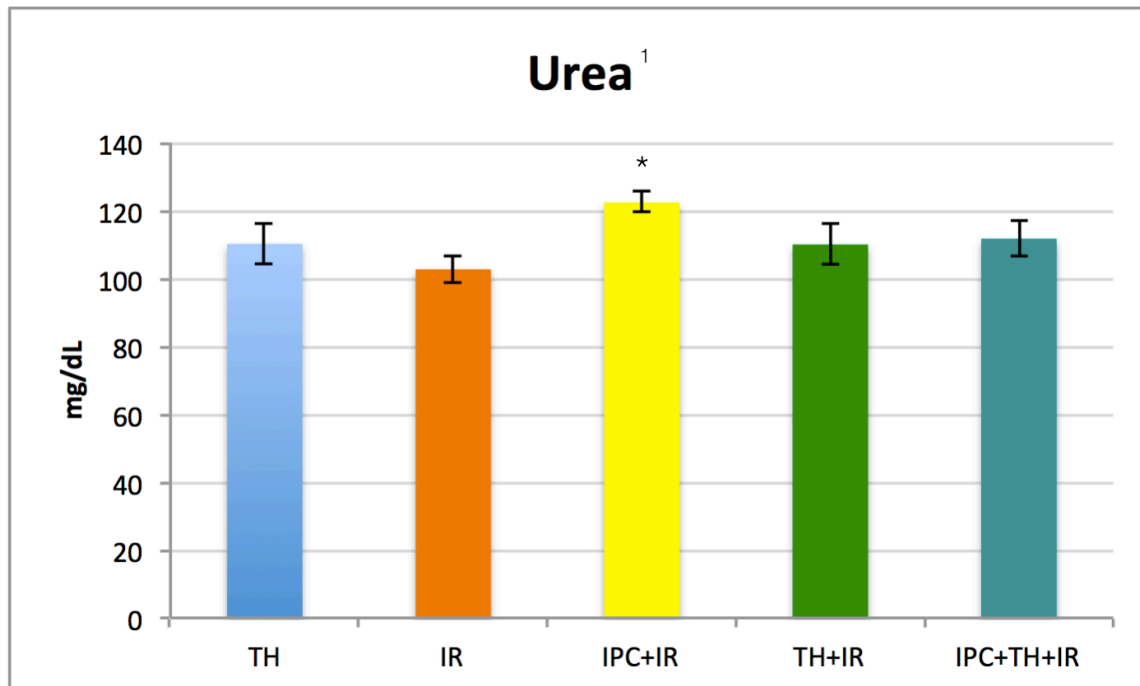


Figure 8 - Serum urea levels.

¹Data are expressed as mean \pm SE. Generalized linear models were adjusted to weight, age, and minimum systemic temperature. The Bonferroni correction was applied to the significance level of each test. Analysis included only experimental groups because urea was estimated from peripheral blood at the end of the experiment; *Significantly different from IR ($P < 0.05$); **TH**: topical hypothermia without ischemia; **IR**: ischemia and reperfusion; **IPC+IR**: ischemic preconditioning followed by ischemia and reperfusion; **TH+IR**: topical hypothermia with ischemia and reperfusion; **IPC+TH+IR**: ischemic preconditioning followed by topical hypothermia with ischemia and reperfusion.

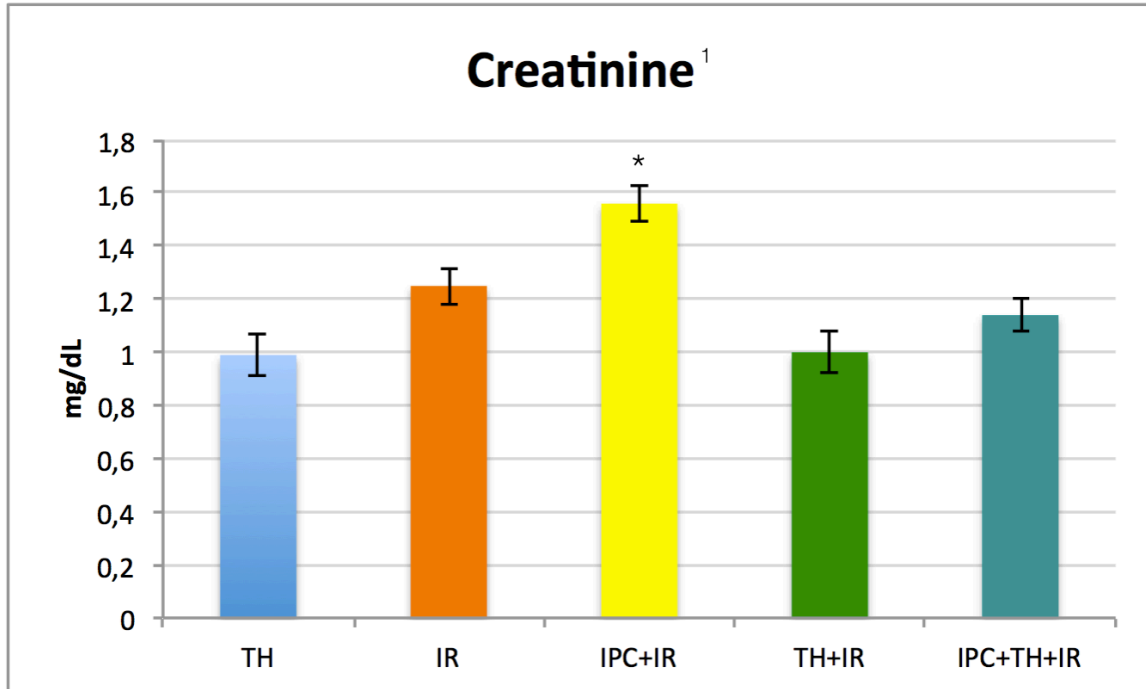


Figure 9 - Serum creatinine levels.

¹Data are expressed as mean \pm SE. Generalized linear models were adjusted to weight, age, and minimum systemic temperature. The Bonferroni correction was applied to the significance level of each test. Analysis included only experimental groups because sCr was estimated from peripheral blood at the end of the experiment; *Significantly different from all other groups ($P < 0.05$); **TH**: topical hypothermia without ischemia; **IR**: ischemia and reperfusion; **IPC+IR**: ischemic preconditioning followed by ischemia and reperfusion; **TH+IR**: topical hypothermia with ischemia and reperfusion; **IPC+TH+IR**: ischemic preconditioning followed by topical hypothermia with ischemia and reperfusion.

Discussion

Although several studies have tried to evaluate the effects of ischemic preconditioning on renal I/R injury, none of them investigated if local ischemic preconditioning had synergistic protective effect when combined with topical hypothermia during prolonged ischemia¹³. Torras *et al.*¹⁹ published functional and histological results of local ischemic preconditioning in kidneys flushed with Euro-Collins solution and cold stored for 5 hours before transplantation. They

showed that ischemic preconditioning before cold storage resulted in lower sCr and acute tubular necrosis following transplantation. Considering that topical hypothermia is an important surgical tool not only for transplantation, but also for other clinical scenarios such as partial nephrectomy, the present study was designed to evaluate if local ischemic preconditioning and topical hypothermia merge protective effects on I/R injury following 40 min of ischemia in an acute experiment (4 h of reperfusion) using histological changes as the main outcome. Tissue lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity were evaluated because of scarcity of data regarding the effect of ischemic preconditioning on them, despite the relevance of oxidative stress to I/R injury²⁰. Moreover, urea and sCr were tested in order to look for functional evidence of additive effect of ischemic preconditioning with topical hypothermia.

Right nephrectomy was performed before any intervention was performed because recovery of an ischemically damaged kidney is affected by the presence of a healthy kidney²¹. We showed that topical hypothermia by itself did not cause histological changes, oxidative stress damage, or changes in antioxidant enzymes activity compared to controls. Regarding histological changes in groups subjected to ischemia, ischemic preconditioning unexpectedly increased acute tubular necrosis, while topical hypothermia showed a trend towards decreasing it. The combination of ischemic preconditioning to topical hypothermia was neither beneficial nor detrimental, compared to ischemia alone. Some previously published studies that evaluated histological damage using a comparable 5-point scale showed significantly lower acute tubular necrosis when local ischemic preconditioning was performed before prolonged ischemia, but not all studies have reported positive findings. A recent meta-analysis collectively evaluating the effects of local and remote ischemic preconditioning on histological changes indicates that ischemic preconditioning is beneficial¹³.

We found increased antioxidant CAT activity in warm ischemia groups (IR and IPC+IR), compared with TH+IR group. Ischemic preconditioning combined to cold ischemia (IPC+TH+IPC group) resulted in similar CAT activity, compared to TH+IR group. The increase in CAT activity observed in IR group was also previously observed in kidneys exposed to similar conditions of I/R

injury¹⁷. Other studies with different periods of warm ischemia and reperfusion before kidney tissue harvesting reported conflicting results²²⁻²⁶. In essence, longer periods of ischemia consistently led to loss of CAT activity²²⁻²⁵. Perhaps the increase in CAT activity in our model occurred because ischemia and reperfusion periods were short, inducing slight oxidative stress that triggered an increase in CAT activity in the first few hours before its inactivation.

Our evaluation of F2IP levels did not reach statistical significance between groups in which kidneys experienced ischemia. As expected, topical hypothermia at 4°C without ischemia proved to cause no oxidative damage. Using another marker for lipid peroxidation, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), Dobashi *et al.*²² showed no increase in its levels with 30min of warm ischemia. Nonetheless, ischemia for 60 or 90 min consistently increased lipid peroxidation. SOD activity was similar among our groups. Although it also has conflicting results in the literature, the variation patterns are much like those of CAT²²⁻²⁶.

Regarding kidney function parameters, our experiment protocol showed that IPC impaired kidney function, compared to all other groups, as demonstrated by the significant increase in urea and sCr levels. In contrast, when IPC was combined to topical hypothermia, it looks like the functional damage caused by IPC was mitigated. The only published meta-analysis on this subject reports that ischemic preconditioning preserves renal function¹³. Nevertheless, it should be pointed out that the results of this meta-analysis are possibly inaccurate because of publication bias. Wever *et al.*¹³ stated that visual analysis of funnel plots revealed that small, negative studies appeared to be underrepresented, and that it was especially true for serum creatinine and urea. Other authors found that ischemic preconditioning decreased renal function or at least had a trend towards it^{27,28}.

In short, our study showed that topical hypothermia by itself did not cause histological, oxidative, or functional damage to the kidney. Also, when topical hypothermia was superimposed on ischemia, it had a trend towards preserving renal function and attenuating cell damage, as assessed by sCr and histological changes, respectively. In contrast, we found that ischemic

preconditioning not only lacks protective effects on I/R injury, but rather increases I/R injury.

The major strength of our study is that as far as we are aware, this is the first study to investigate if ischemic preconditioning has synergistic effects with topical hypothermia in decreasing renal I/R injury. Furthermore, there was a clear correlation of ischemic preconditioning with increased I/R injury, as evidenced by higher grades of acute tubular necrosis and higher sCr at the end of the experiment.

Some potential limitations of our study must be emphasized. First, the acute nature of our experiment, with blood and specimen collection after only 4 h of reperfusion, could have hindered true (if different) long-term effects of ischemic preconditioning on I/R injury. It is possible that our preconditioning protocol with continuous ischemia for 15 min was too long, resulting in acute kidney injury per se. However, it is difficult to explain why other groups using similar IPC protocol had opposing results¹⁹. Second, our protocol was designed to test the "early window of protection", and there is some evidence that the "late window of protection" (ischemic preconditioning > 24 h before sustained ischemia) is more efficient in attenuating I/R injury¹³. Third, I/R injury is well-known temperature sensitive. Hence, lower minimum systemic temperature attained in groups subjected to topical hypothermia could affect results²⁹. Fourth, there are some data indicating that isoflurane, the volatile anesthetic used, has unique preconditioning characteristics³⁰. Hence, it could act as a confounding factor in our outcomes.

Conclusions

We could not establish additive effects of local ischemic preconditioning and topical hypothermia in protecting the kidney from I/R injury. Moreover, local ischemic preconditioning followed by warm ischemia impaired renal function more than warm ischemia alone.

References

1. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med.* 2011 Nov 7;17(11):1391–401. doi: 10.1038/nm.2507.
2. Kosieradzki M, Rowiński W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplant Proc.* 2008 Dec 4;40(10):3279–88. doi: 10.1016/j.transproceed.2008.10.004.
3. Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol.* 2011 Apr;7(4):189–200. doi: 10.1038/nrneph.2011.16.
4. Tilney NL, Guttman RD. Effects of initial ischemia/reperfusion injury on the transplanted kidney. *Transplantation.* 1997 Oct 15;64(7):945–7. PMID: 9381538.
5. Land WG. The role of postischemic reperfusion injury and other nonantigen-dependent inflammatory pathways in transplantation. *Transplantation.* 2005 Mar 15;79(5):505–14. PMID: 15753838.
6. Lu CY, Penfield JG, Kielar ML, Vazquez MA, Jeyarajah DR. Hypothesis: is renal allograft rejection initiated by the response to injury sustained during the transplant process? *Kidney Int.* 1999 Jun;55(6):2157–68. doi: 10.1046/j.1523-1755.1999.00491.x.
7. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schmouder RL. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation.* 1997 Apr 15;63(7):968–74. PMID: 9112349.
8. Novick AC. Renal hypothermia: in vivo and ex vivo. *Urol Clin North Am.* 1983 Nov;10(4):637–44. PMID: 6356550.
9. Becker F, van Poppel H, Hakenberg OW, Stief C, Gill I, Guazzoni G, Montorsi F, Russo P, Stöckle M. Assessing the impact of ischaemia time during partial nephrectomy. *Eur Urol.* 2009 Oct;56(4):625–34. doi: 10.1016/j.eururo.2009.07.016.
10. Opelz G, Wujciak T. Comparative analysis of kidney preservation methods. Collaborative Transplant Study. *Transplant Proc.* 1996 Feb;28(1):87–90. PMID: 8644351.
11. Matas AJ, Smith JM, Skeans MA, Thompson B, Gustafson SK, Schnitzler MA, Stewart DE, Cherikh WS, Wainright JL, Snyder JJ, Israni AK, Kasiske BL. OPTN/SRTR 2012 Annual Data Report: Kidney. *Am J Transplant.* 2014 Jan 1;14(S1):11–44. doi: 10.1111/ajt.12579.
12. Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Atherosclerosis.* 2009 Jun;204(2):334–41. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.10.029.
13. Wever KE, Menting TP, Rovers M, van der Vliet JA, Rongen GA, Masereeuw R, Ritskes-Hoitinga M, Hooijmans CR, Warlé M. Ischemic preconditioning in the animal kidney, a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE.* 2012 Feb 28;7(2):e32296. doi: 10.1371/journal.pone.0032296.

14. Hausenloy DJ, Yellon DM. The therapeutic potential of ischemic conditioning: an update. *Nat Rev Cardiol*. 2011 Nov;8(11):619–29. doi: 10.1038/nrcardio.2011.85.
15. Das M, Das DK. Molecular mechanism of preconditioning. *IUBMB Life*. 2008 Apr;60(4):199–203. doi: 10.1002/iub.31.
16. Grezzana Filho Tde J, Mendonça TB, Gabiatti G, Rodrigues G, Marroni NA, Treis L, De Rossi SD, Corso CO. Topical hepatic hypothermia plus ischemic preconditioning: analysis of bile flow and ischemic injuries after initial reperfusion in rats. *Acta Cir Bras*. 2011;26(3):194–201. PMID: 21537521.
17. Santos EB, Koff WJ, Grezzana Filho Tde J, De Rossi SD, Treis L, Bona SR, Pêgas KL, Katz B, Meyer FS, Marroni NA, Corso CO. Oxidative stress evaluation of ischemia and reperfusion in kidneys under various degrees of hypothermia in rats. *Acta Cir Bras*. 2013;28(8):568–73. PMID: 23896835.
18. 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. PMID: 6340272.
19. 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. doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00360.x.
20. Johnson KJ, Weinberg JM. Postischemic renal injury due to oxygen radicals. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1993 Jul;2(4):625–35. PMID: 7859026.
21. Finn WF. Enhanced recovery from postischemic acute renal failure. Micropuncture studies in the rat. *Circ Res*. 1980 Mar 1;46(3):440–8. PMID: 7357698.
22. Dobashi K, Ghosh B, Orak JK, Singh I, Singh AK. Kidney ischemia-reperfusion: modulation of antioxidant defenses. *Mol Cell Biochem*. 2000 Feb;205(1-2):1–11. PMID: 10821417.
23. Sela S, Shasha SM, Mashiach E, Haj M, Kristal B, Shkolnik T. Effect of oxygen tension on activity of antioxidant enzymes and on renal function of the postischemic reperfused rat kidney. *Nephron*. 1993;63(2):199–206. PMID: 8450913.
24. Singh I, Gulati S, Orak JK, Singh AK. Expression of antioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury. *Mol Cell Biochem*. 1993 Aug 25;125(2):97–104. PMID: 8283974.
25. Barnard ML, Snyder SJ, Engerson TD, Turrens JF. Antioxidant enzyme status of ischemic and postischemic liver and ischemic kidney in rats. *Free Radic Biol Med*. 1993 Aug 1;15(2):227–32. PMID: 8375697.
26. Yoshioka T, Bills T, Moore-Jarrett T, Greene HL, Burr IM, Ichikawa I. Role of intrinsic antioxidant enzymes in renal oxidant injury. *Kidney Int*. 1990 Aug 1;38(2):282–8. PMID: 2402119.
27. Obal D, Dettwiler S, Favoccia C, Rascher K, Preckel B, Schlack W. Effect of sevoflurane preconditioning on ischaemia/reperfusion injury in the rat kidney in vivo. *Eur J Anaesthesiol*. 2006 Apr;23(4):319–26. doi: 10.1017/S0265021505002000.
28. Bedir S, Ma Y, Antonelli J, Cadeddu JA, Gahan JC. Ineffectiveness of remote ischemic

- renal preconditioning in a porcine solitary-kidney model. *J Endourol.* 2015 May;29(5):590–4. doi: 10.1089/end.2014.0563.
29. Delbridge MS, Shrestha BM, Raftery AT, Nahas EI AM, Haylor JL. The effect of body temperature in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc.* 2007 December;39(10):2983-85. doi: 10.1016/j.transproceed.2007.04.028.
30. Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC. Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: Reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology.* 1997 Aug 1;87(2):361–70. PMID: 9286901.

Acknowledgements

The staff of the Animal Experimentation Unit, Protein and Molecular Analysis Unit and Experimental Pathology Unit of the Research Center, HCPA, for their technical assistance and support.

Correspondence

Carlos Otávio Corso
Disciplina de Cirurgia Digestiva, HCPA
Rua Ramiro Barcelos, 2350/sala 747
90035-903 Porto Alegre – RS Brasil
Tel.: (55 51)3359-8232
corso@portoweb.com.br

Received: June 27, 2017

Review: Aug 28, 2017

Accepted: Sept 29, 2017

Conflict of interest: none

Financial source: FIPE/HCPA

¹Research performed at Animal Experimentation Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre-RS, Brazil. Part of Master degree thesis, Postgraduate Program in Medicine: Surgical Sciences. Tutor: Carlos Otávio Corso.