

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

**ANÁLISE DO PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO REMOTO ASSOCIADO AO
RESFRIAMENTO NA LESÃO RENAL POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM RATOS**

GUILHERME LANG MOTTA

ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS OTÁVIO CORSO

COORIENTADOR: DR. EMANUEL BURCK DOS SANTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PORTO ALEGRE, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

**ANÁLISE DO PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO REMOTO ASSOCIADO AO
RESFRIAMENTO NA LESÃO RENAL POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM RATOS**

GUILHERME LANG MOTTA

ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS OTÁVIO CORSO

COORIENTADOR: DR. EMANUEL BURCK DOS SANTOS

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

PORTO ALEGRE, 2018

CIP - Catalogação na Publicação

Motta, Guilherme Lang
ANÁLISE DO PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO REMOTO
ASSOCIADO AO RESFRIAMENTO NA LESÃO RENAL POR
ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM RATOS / Guilherme Lang
Motta. -- 2018.
92 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, 2018.

1. Isquemia. 2. Reperfusão. 3. Radicais Livres.
4. Hipotermia. I. Corso, Carlos Otávio, orient. II.
dos Santos, Emanuel Burck, coorient. III. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico esta Dissertação aos meus pais, Antonio Fernando e Ana Lucia, incansáveis na busca pelo conforto e carinho à minha pessoa. Apoiadores de todas as aventuras e conselheiros nas mais importantes decisões.

Também dedico à minha irmã, Manuela, amiga de todas as horas por todos os anos da minha vida.

Dedico, finalmente, à Maira, que me escuta e conforta todos os dias. Agradeço por não me deixar desistir dos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador, professor doutor Carlos Otávio Corso, e ao meu coorientador, doutor Emanuel Burck dos Santos. Agradeço a ambos pela confiança depositada, além dos ensinamentos e companheirismo. Agradeço ao professor Corso por aceitar ser meu orientador, e ao doutor Emanuel por ter me motivado e ensinado as bases da cirurgia experimental. O conhecimento e experiência no campo da isquemia-reperfusão de tecidos de ambos foi o alicerce na formulação e execução deste projeto.

Muito obrigado ao Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), local da minha formação na residência médica em Urologia. Este centro formador de urologistas também é um local de verdadeiras amizades. O apoio do serviço para que eu iniciasse as atividades do mestrado ao longo do meu último ano de residência foi essencial para algumas conquistas profissionais que surgiram logo no início da minha carreira de urologista. Dentre diversos colegas e amigos, devo agradecimento especial ao Pablo Cambeses de Souza, o qual iniciou e compartilhou comigo grande parte das atividades da pesquisa. Outro colega do serviço, também fundamental para a estruturação do projeto foi Guilherme Behrend Silva Ribeiro, meu antecessor nas pesquisas de isquemia-reperfusão renal que muito me ensinou e auxiliou na elaboração deste estudo. Agradeço, ainda, aos chefes do serviço, Prof. Brasil Silva Neto e Prof. Tiago Elias Rosito, pela compreensão em permitir que executasse esta atividade conjunta às da residência médica

Agradeço ao professor doutor Pedro Guilherme Schaefer, patologista talentoso que aceitou colaborar com a análise histopatológica dos rins, parte fundamental do estudo. Estendo meu agradecimento ao pessoal do Laboratório de Patologia e Laboratório de Patologia

Experimental do HCPA pelo envolvimento durante a preparação e cuidado das amostras coletadas.

Agradeço à professora doutora Norma Anair Possa Marroni por ter apoiado mais um projeto da linha de isquemia-reperusão renal, oferecendo suporte científico, teórico e tecnológico para a análise dos marcadores de estresse oxidativo, outra etapa fundamental desta pesquisa. Meu reconhecimento se estende à bióloga doutora Silvia Regina Bona por ter participado nesta última etapa envolvendo os marcadores de estresse oxidativo, assim como todas pessoas do Laboratório de Fisiologia e Hepatologia Experimental do HCPA/UFRGS.

Ao Centro de Experimentação Animal do HCPA, agradeço pela possibilidade de realizar as cirurgias do projeto. Reconhecimento especial creditado para a enfermeira Marta Justina Giotti Cioato e para as veterinárias Daniela e Tuane pela inesgotável paciência no ensinamento das bases do cuidado animal durante sua manipulação e a capacidade de resolver as intercorrências que eventualmente surgiam durante esta etapa do estudo.

Ao acadêmico da Faculdade de Medicina da UFRGS, Caetano Lima, meu inestimável agradecimento pela organização e preparação dos procedimentos cirúrgicos. Caetano participou ativamente das cirurgias deste estudo, além de elaborar apresentações para a divulgação do nosso projeto antes mesmo do seu encerramento.

Finalizo agradecendo ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do HCPA pelo apoio financeiro. Sem este, o nosso estudo não teria condições de ser realizado. Obrigado à UFRGS e ao HCPA por terem feito parte da construção da minha carreira profissional e acadêmica.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	4
AGRADECIMENTOS.....	5
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO.....	14
REVISÃO DA LITERATURA.....	15
I. LESÃO TECIDUAL POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO.....	15
II. DANO CELULAR POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO.....	16
III. EFEITO DA ISQUEMIA-REPERFUSÃO NAS CÉLULAS RENAIIS.....	18
IV. MÉTODOS PARA REDUÇÃO DO DANO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO...	18
V. PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO.....	20
VI. MARCADORES INFLAMATÓRIOS E ESTRESSE OXIDATIVO.....	24
VII. TRANSFORMAÇÕES HISTOLÓGICAS DA ISQUEMIA-REPERFUSÃO.....	25
VIII. TÉCNICA CIRÚRGICA EXPERIMENTAL.....	26
REFERÊNCIAS DA REVISÃO.....	28
OBJETIVOS.....	37
ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS.....	38
ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP: monofosfato de adenosina

ATP: trifosfato de adenosina

ADP: difosfato de adenosina

Ca²⁺: cálcio

Cl⁻: cloro

CAT: catalase

F2IP: f2-isoprostanos

FIPE: Fundo de Incentivo à Pesquisa e
Eventos

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto
Alegre

HT: hipotermia tópica

H₂O: água

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

IL-1: interleucina-1

IR: isquemia-reperfusão

K⁺: potássio

Mg²⁺: magnésio

Na⁺: sódio

O₂: oxigênio

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

UFRGS: Universidade Federal do Rio
Grande do Sul

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Fisiopatologia da produção de radicais livres durante isquemia e reperfusão. Observa-se a degradação do ATP em hipoxantina devido ao metabolismo anaeróbico e formação dos radicais livres superóxido e hidroxila devido ao contato com o oxigênio. Figura modificada de *Bulkley*²⁹. *ADP = difosfato de adenosina; AMP = monofosfato de adenosina; ATP = trifosfato de adenosina; CAT = catalase; H₂O = água; H₂O₂ = peróxido de hidrogênio; O₂=oxigênio; SOD = superóxido dismutase.* (PÁGINA 17)

RESUMO

ANÁLISE DO PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO REMOTO ASSOCIADO AO RESFRIAMENTO NA LESÃO RENAL POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM RATOS

Introdução: A lesão renal por isquemia-reperfusão (IR) pode ser reduzida através de estratégias protetoras, entre elas a hipotermia e o pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR). A combinação destas sustenta um potencial efeito protetor a ser esclarecido.

Objetivos: Avaliar os efeitos da associação entre o pré-condicionamento isquêmico remoto e a hipotermia tópica em relação às lesões renais por IR, especialmente quanto ao estresse oxidativo e as alterações histológicas no tecido renal.

Métodos: Cirurgias experimentais em trinta e dois ratos Wistar, os quais foram aleatoriamente selecionados para quatro protocolos cirúrgicos: 1 - isquemia do pedículo renal esquerdo por 40 minutos seguido de reperfusão sob eutermia (37°C); 2 - isquemia do pedículo renal esquerdo por 40 minutos seguido de reperfusão sob hipotermia local (4°C); 3 - PCIR através de clameamento da artéria ilíaca esquerda por 15 minutos seguido reperfusão por 10 minutos, prosseguindo para isquemia do pedículo renal esquerdo por 40 minutos seguido de reperfusão sob eutermia; 4 - PCIR através de clameamento da artéria ilíaca esquerda por 15 minutos seguido reperfusão por 10 minutos, prosseguindo para isquemia do pedículo renal esquerdo por 40 minutos seguido de reperfusão sob hipotermia local. Todos os ratos sofreram nefrectomia direita no início do procedimento, sendo estes rins considerados o grupo controle. Após 240 minutos de reperfusão da IR, os animais foram submetidos a um segundo procedimento cirúrgico para a nefrectomia esquerda. Todos os rins foram submetidos a avaliação tecidual, onde foram analisados o grau de

necrose tubular aguda pela avaliação histopatológica, além do estresse oxidativo através da dosagem de isoprostanos e medida da atividade da superóxido dismutase e catalases. Avaliamos, ainda, as diferenças de creatinina plasmáticas antes e depois do experimento.

Resultados: A combinação de PCIR com hipotermia durante experimento de IR revelou ausência de diferenças comparado aos outros grupos de intervenção na análise do padrão histológico ($p=0.722$). O estresse oxidativo não apresentou variações significativas entre os grupos, exceto na medida do superóxido dismutase que foi mais elevada nos protocolos de isquemia fria ($p<0.05$). Animais submetidos a protocolos de IR sob hipotermia demonstraram menores valores de creatinina sérica ao término dos procedimentos ($p<0.001$).

Conclusão: A associação de pré-condicionamento isquêmico remoto com hipotermia local não gera proteção renal na lesão por IR. A hipotermia isolada, entretanto, parece ser efetiva na preservação da função renal durante eventos isquêmicos. Em nosso estudo, o pré-condicionamento isquêmico remoto isolado seguido de IR quente (37°C) não demonstrou benefícios nos parâmetros avaliados comparado à IR quente sem PCIR ou mesmo grupo controle, sugerindo que este modelo experimental de pré-condicionamento isquêmico remoto possui restrições na análise da janela precoce de proteção.

Palavras-chave: Isquemia, Reperusão, Pré Condicionamento, Hipotermia, Radicais Livres

ABSTRACT**REMOTE ISCHEMIC CONDITIONING ASSOCIATED WITH HYPOTHERMIA: ANALYSIS OF THE RENAL LESION IN THE ISCHEMIA-REPERFUSION DAMAGE OF RATS**

Introduction: Ischemia-reperfusion injury (IR) can be reduced using protective measures such as hypothermia and remote ischemic preconditioning (RIPC). The combination of these might result in potential protective effects to be clarified.

Objectives: To assess the effects of the association between RIPC and topical hypothermia in relation to renal IR injuries, especially regarding oxidative stress and histological changes in renal tissue.

Methods: Experimental surgeries in thirty two Wistar rats, which were randomly selected to four surgical protocols: 1 - IR by left renal pedicle ischemia for 40 minutes followed by single reperfusion (37oC); 2 - IR by left renal pedicle ischemia for 40 minutes followed by reperfusion under local hypothermia (4oC); 3 - RIPC by clamping the left iliac artery for 15 minutes followed by reperfusion for 10 minutes, proceeding to ischemia of the left renal pedicle for 40 minutes followed by reperfusion (37oC); 4 - RIPC by clamping the left iliac artery for 15 minutes followed by reperfusion for 10 minutes, proceeding to ischemia of the left renal pedicle for 40 minutes followed by reperfusion under local hypothermia (4oC). All rats underwent right nephrectomy at the beginning of the procedure, and these kidneys considered the control group. After 240 minutes of reperfusion, the animals were submitted to a second surgical procedure for left nephrectomy. All kidneys underwent tissue evaluation, describing the degree of acute tubular necrosis with histopathological analysis. Oxidative stress assessment occurred through isoprostane dosing and measurement of

superoxide dismutase and catalase activity. Differences in plasmatic blood creatinine were evaluated before and after the experiment.

Results: RIPPC combined with cold ischemia during IR experiment revealed no differences compared to any of the other interventional groups regarding the analysis of histological changes ($p=0.722$). Oxidative stress shows no significant variations among groups, except in superoxide dismutase measurements which were higher in cold protocols compared to warm protocols ($p<0.05$). Serum creatinine at end of procedure showed lower levels in the animals submitted to hypothermic IR protocols ($p<0.001$).

Conclusion: Combining remote ischemic preconditioning and local hypothermia provides no renal protection in IR injury. Hypothermia, however, seems to be effective in preserving renal function during ischemic events. Furthermore, in our study remote preconditioning solely followed by warm IR did not show benefits in any of the evaluated parameters compared to warm IR alone or control groups, suggesting that this experimental model of preconditioning has limitations in the early window of protection analysis (< 24 hours).

Key Words: Ischemia, Reperfusion Injury, Hypothermia, Free Radicals, Oxidative Stress

INTRODUÇÃO

A interrupção da perfusão celular por isquemia leva a uma cascata de eventos que culminam em disfunção e morte celular. A reperfusão paradoxalmente é capaz de produzir efeitos deletérios adicionais. Esse fenômeno, conhecido como lesão celular induzida por isquemia-reperfusão (IR), produz danos teciduais através da produção de radicais livres, espécies reativas de oxigênio capazes de modificar o funcionamento das proteínas e membranas celulares¹. Muitas situações clínicas e cirúrgicas geram, de forma inevitável, esse processo de IR como, por exemplo, transplantes, cirurgias com circulação extracorpórea e nefrectomias parciais com clampeamento transitório do pedículo renal²⁻⁵. A busca pela redução dos agravos causados pela IR na fisiologia tecidual motivou o desenvolvimento de diversas estratégias, entre elas: substâncias antioxidantes, hipotermia, soluções hipertônicas e o pré-condicionamento isquêmico (PCI)^{6,7}. Este último consiste na indução da produção de antioxidantes endógenos pelos tecidos através de curtos ciclos de isquemia-reperfusão, previamente a uma isquemia prolongada⁸⁻¹⁰. A possibilidade de se realizar curtos ciclos de isquemia em tecidos distantes do órgão que irá sofrer a IR prolongada motivou o desenvolvimento do pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR), promissor mecanismo de prevenção de danos^{11,12}. A hipotermia possui papel estabelecido como estratégia de reduzir o estresse oxidativo na IR renal, sendo fundamental na preservação de órgãos transplantados e utilizado em cirurgias renais com clampeamento arterial^{13,14}. Apesar das considerações acima, a associação do PCIR com a hipotermia e o seu efeito conjunto na prevenção de danos pela IR, entretanto, não foi descrita em modelos experimentais animais.

REVISÃO DA LITERATURA

I – LESÃO TECIDUAL POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO

A condição em que os tecidos sofrem um período de restrição do suprimento sanguíneo seguido pelo restabelecimento da perfusão, conseqüentemente, levando à reoxigenação celular define o processo de isquemia e reperfusão. A ausência de oxigênio devido à isquemia provoca lesão e morte celular. A reperfusão tecidual, paradoxalmente, é capaz de acrescentar dano às células que estão em processo de isquemia através da reoxigenação, processo conhecido como lesão por isquemia e reperfusão (IR)¹⁵.

Diversos cenários clínicos ilustram a lesão por IR, entre as mais frequentes estão o infarto agudo do miocárdio e o acidente vascular cerebral. O tecido renal sofre este tipo de lesão em muitas situações como transplantes renais, nefrectomias parciais sob clampeamento do pedículo renal e cirurgias de aorta abdominal^{3,15}. Durante o transplante renal, por exemplo, o rim pode sofrer longos períodos de isquemia até ser implantado no receptor¹⁶. Essencial para sua subsistência é a reperfusão tecidual através das anastomoses vasculares e fluxo sanguíneo. Apesar de vital, a reperfusão com sangue oxigenado pode lesar os tecidos sob isquemia¹⁷. O grau de lesão por IR apresenta influência no funcionamento e na resposta imune entre o enxerto e receptor¹⁸⁻²². O conhecimento e a prevenção da lesão por IR apresenta um benefício potencial nas diversas situações clínicas em que podemos antever a reperfusão tecidual^{23,24}.

II – DANO CELULAR POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO

A isquemia dos tecidos leva, devido à redução do aporte de oxigênio, a um distúrbio no processo de fosforilação oxidativa das mitocôndrias celulares em função da depleção de trifosfato de adenosina (ATP). Este se mostra essencial no adequado funcionamento celular através da geração de energia para processos homeostáticos como, por exemplo, nas bombas de sódio-potássio (Na^+/K^+) e cálcio-magnésio ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$). Quando estas se encontram desreguladas, ocorre edema devido ao influxo de Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} para o interior da célula e ativação da glicólise anaeróbia^{25,26}. Além disso, a isquemia induz à produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1), objetivando o recrutamento de leucócitos²⁷. Se a isquemia for prolongada, o edema tecidual progressivo somado ao acúmulo excessivo de leucócitos gera obstrução da microcirculação e lesão irreversível, fenômeno conhecido como “no-reflow”²⁸. Durante o metabolismo anaeróbio também verificamos uma degradação do ATP em hipoxantina. Além disso, neste meio isquêmico notamos um acúmulo da enzima xantina desidrogenase, a qual subsequentemente se transforma em xantina oxidase. Ao entrar em contato com oxigênio proveniente da reperfusão tecidual e sob ação conjunta da xantina oxidase, a hipoxantina sofre um processo de oxidação produzindo xantina e superóxido. Este último é um radical livre de dano celular direto moderado com potencial de se transformar, através da ação de enzimas locais, em hidroxila, considerado um radical livre altamente tóxico e reativo para os tecidos. Objetivando reduzir os níveis destas substâncias nocivas, a célula passa a produzir antioxidantes. Entre estes está a superóxido dismutase (SOD), enzima responsável por degradar o superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo este um radical livre menos nocivo. Outra enzima antioxidante implicada é a catalase (CAT), encarregada de transformar o H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio. Estas reações são ilustradas na *Figura 1*.

A complexa cascata de formação de radicais livres expõe a importância do contato do oxigênio com o tecido isquêmico e seu efeito deletério paradoxal^{1,29,30}.

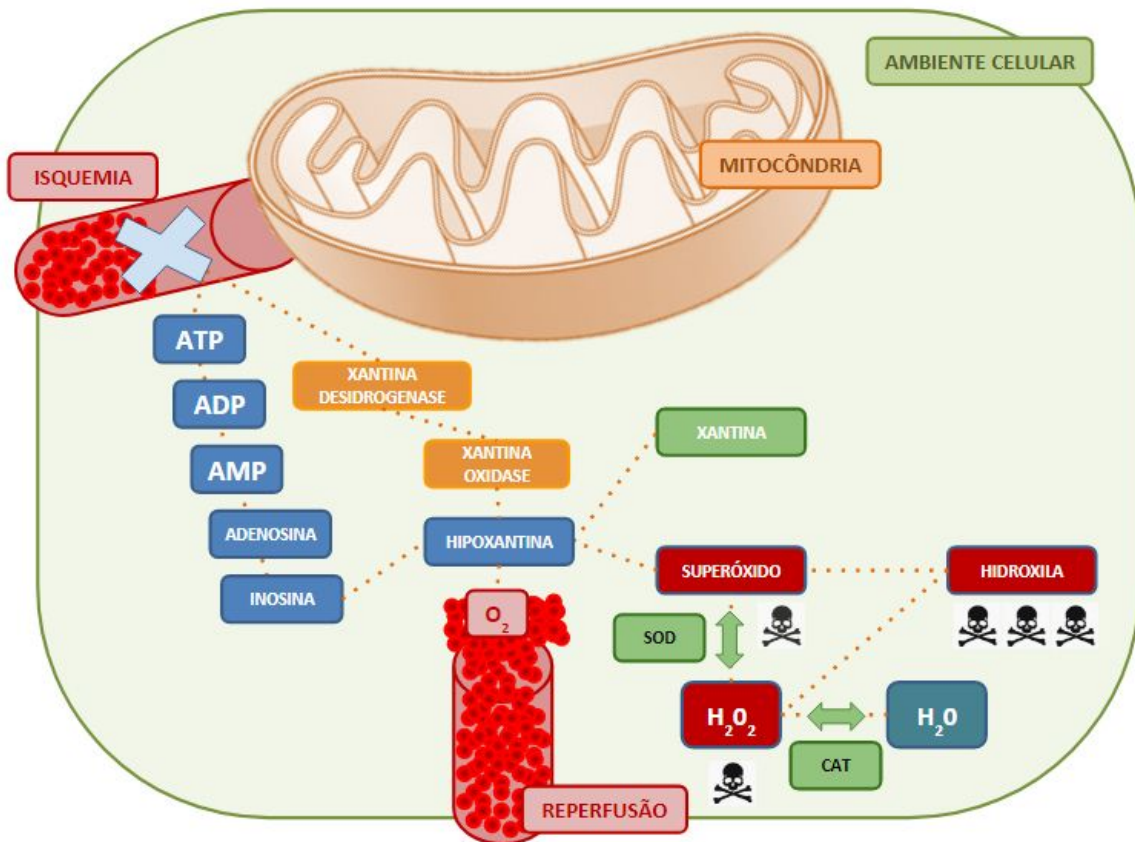


FIGURA 1: Fisiopatologia da produção de radicais livres durante isquemia e reperfusão. Observa-se a degradação do ATP em hipoxantina devido ao metabolismo anaeróbio e formação dos radicais livres superóxido e hidroxila devido ao contato com o oxigênio. Figura modificada de *Bulkley*²⁹. ADP = difosfato de adenosina; AMP = monofosfato de adenosina; ATP = trifosfato de adenosina; CAT = catalase; H₂O = água; H₂O₂ = peróxido de hidrogênio; O₂=oxigênio; SOD = superóxido dismutase.

III – EFEITO DA ISQUEMIA-REPERFUSÃO NAS CÉLULAS RENAIAS

As células do túbulo contorcido proximal e ramo ascendente da alça de Henle são as mais suscetíveis a sofrer lesão por IR, provavelmente pelo alto metabolismo necessário para as trocas iônicas desta região. O processo de isquemia e subsequente disfunção endotelial ocasionam ruptura e acúmulo das microvilosidades das células tubulares proximais na luz dos túbulos. Células tubulares também se destacam da membrana basal e adentram a luz tubular. Este acúmulo de células e debris obstrui a luz tubular, mecanismo responsável pela redução da filtração glomerular³⁰.

IV – MÉTODOS PARA REDUÇÃO DO DANO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO

Objetivando limitar a lesão celular causada pelo processo de IR, estratégias são estudadas e apresentam resultados significativos. As medidas terapêuticas tradicionais se baseiam na hipotermia e redução do tempo de isquemia³¹⁻³³.

A hipotermia sistêmica tem demonstrado benefícios quando avaliada por estudos experimentais em situações tais como isquemia miocárdica, transplante de órgãos, circulação extracorpórea, isquemia da medula espinhal e intestinal. Na prática clínica, observamos desfechos positivos, por exemplo, ao associar o resfriamento corporal durante o estado de pós parada cardíaca e hipóxia neonatal^{34,35}. Os mecanismos de regulação gênica da apoptose e reação inflamatória são influenciados pela hipotermia sistêmica, como foi observado no estudo de *Tang et al*³⁶. Apesar disso, a hipotermia sistêmica pode causar coagulopatia, acidose metabólica e arritmias, limitadores do seu uso³⁷. Desta forma, a hipotermia local emerge como uma alternativa com potencial menor de efeitos adversos. A hipotermia tópica realizada com técnica adequada e isolamento apropriado do órgão

resfriado, como demonstrado pelos experimentos em tecido hepático de *Grezzana Filho et al*, não influencia na temperatura sistêmica, assim como na pressão arterial média³⁸.

O resfriamento local do rim causa uma diminuição do metabolismo celular e, desta forma, reduz os danos da IR também neste órgão. O stress oxidativo é inferior nos rins sob hipotermia comparado com seus pares eutérmicos quando expostos à IR^{39,40}. Sendo assim, esta estratégia terapêutica é amplamente utilizada no transplante renal de humanos e está integrada na rotina deste procedimento há muitos anos. Existem diferentes maneiras de manter o órgão em hipotermia durante o transporte do enxerto: através de perfusão estática ou perfusão pulsátil, ambas eficazes na preservação do rim pelo período de 24 a 72 horas, sendo a pulsátil capaz de reduzir ainda mais o risco de perda de função e apresenta melhores taxas de sobrevida do enxerto quando comparado ao armazenamento estático^{41,42}. Os diferentes tipos de soluções no qual o tecido será envolvido também são alvo de estudo. Elas possuem solutos que objetivam preservar pH e íons, além de impermeabilizantes que evitam a entrada de líquidos no interior das células. Muitas soluções incluem colóides, antiplaquetários, removedores de radicais livres, entre outras substâncias na sua composição que podem acrescentar benefícios^{25,42,43}. As duas soluções de perfusão mais populares são *Euro-Collins* e *Universidade de Wisconsin*, sendo esta superior em relação à sobrevida do enxerto⁴³. Diversos outros procedimentos cirúrgicos que envolvem IR, como as nefrectomias parciais com clampeamento vascular transitório, também fazem uso do resfriamento através do isolamento do órgão com gelo, apresentando resultados estatisticamente positivos na redução de lesão renal e manutenção de função renal^{33,44}.

A temperatura ideal do resfriamento, apesar de pouco estudada, também deve ser analisada. Estudo experimental de *Santos et al* avaliou *in vivo* diferentes temperaturas em que o tecido renal de ratos da raça Wistar foram submetidos à IR, encontrando o valor de 4

graus Celsius como o de maior proteção aos efeitos do estresse oxidativo³⁹. *Fiorentini et al* demonstrou, ainda, que a hipotermia é capaz de reduzir os níveis de fator de necrose tecidual (TNF) após IR renal em órgãos remotos, como o pulmão, ilustrando a relevância e influência sistêmica que a temperatura local possui⁴⁵.

A redução no tempo de isquemia durante os procedimentos que envolvem IR apresenta benefícios com comprovada significância. A realização de procedimentos de forma mais rápida, por exemplo anastomoses vasculares em menor tempo durante o transplante renal, ou o desclameamento precoce nas nefrectomias parciais que necessitam oclusão transitória do pedículo ilustram na prática clínica como encurtar o tempo de isquemia^{31-33,46}. Os avanços em cirurgia laparoscópica/robótica motivaram, ainda, o desenvolvimento de fios de sutura ancorados que permitem rafiar tecidos sem nós, ilustrando outras formas de reduzir o tempo cirúrgico³².

Apesar da eficácia em reduzir a lesão por IR das estratégias descritas, novas medidas capazes de proteger os tecidos devem ser pesquisadas. O aumento do número de procedimentos cirúrgicos envolvendo IR, além das preocupantes demandas por transplantes em todo o mundo fundamentam a necessidade de novas estratégias para atenuar o dano pela IR^{17,47}. Nesse contexto, surge o pré-condicionamento isquêmico.

V – PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO

A realização de curtos períodos de isquemia e reperfusão, estratégia conhecida como pré-condicionamento isquêmico (PCI), é capaz de minimizar os danos causados por uma isquemia prolongada e reperfusão posterior. Os breves períodos de isquemia aplicados promovem um estímulo condicionante e podem ser realizados diretamente no órgão alvo da

IR (pré-condicionamento isquêmico local; PCIL), ou em tecido distante (pré-condicionamento isquêmico remoto; PCIR)^{8,48,49}.

Dentre os estudos pioneiros neste tópico está o de *Murry et al*, em que foram analisados os efeitos do PCIL no miocárdio canino⁸. Desde então diferentes órgãos estão em estudo, entre eles fígado e rim, assim como distintos animais, tais como porcos e ratos.

Os estudos experimentais de PCI em tecido renal tiveram início apenas em 1997, quando *Islam et al* fizeram uso dos protocolos vigentes de PCIL em rins de ratos, porém com resultados desanimadores. Este estudo teve importância, todavia, pois identificou que o período de isquemia renal de 40min era superior ao de 20min quando se objetiva promover lesão renal através de análise histopatológica e cintilográfica⁹. Logo após, *Toosy et al* identificaram que o intervalo de tempo entre o PCI e a isquemia prolongada era um fator importante. Evidenciou-se benefício do PCIL se realizado 5 minutos antes da IR, o mesmo não ocorrendo quando executado com intervalo de 30 minutos¹⁰. Este achado motivou o abandono dos experimentos utilizando os mesmos protocolos executados em tecido cardíaco, sendo necessário o aperfeiçoamento de um protocolo específico para o rim.

Torras et al definiram, através de relevante estudo no ano de 2002, as bases atuais dos protocolos experimentais em PCI de rins de ratos. Neste trabalho, após diversos experimentos com diferentes tempos de isquemia e reperfusão, formulou-se o protocolo de PCIL que demonstrou maior proteção renal. O PCIL se mostra mais eficiente se for realizado apenas um ciclo de 15 min de isquemia seguido de reperfusão por 10 min antes da subsequente isquemia prolongada da IR⁶. O tempo desta isquemia sustentada após o PCIL utilizado neste estudo foi de 40 min, já citado anteriormente como o período de IR que induz maior lesão renal por IR⁹.

Outra modalidade de PCI é o pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR). Este consiste em curtos ciclos de isquemia-reperfusão em um órgão distante de outro que sofrerá um ciclo prolongado de IR. O conceito de PCIR surgiu com o marcante estudo em caninos de *Przyklenk et al* em que se observou associação entre PCI de um território vascular coronariano e proteção miocárdica de outro território vascular durante subsequente IR cardíaca⁴⁸. Em 1996 *Gho et al* expandiram o potencial do PCIR ao reportar benefício de curtos ciclos de isquemia arterial mesentérica previamente à IR miocárdica, validando a hipótese de que tecidos utilizados para PCI não necessitam ser do mesmo órgão sob IR⁴⁹. *Kharbanda et al* observaram redução na lesão miocárdica por IR associando PCIR através de ciclos de isquemia utilizando torniquete no membro posterior de porcos⁵⁰. Este foi o primeiro experimento de PCIR com membros periféricos, diminuindo a complexidade do PCI e tornando factível seu uso na prática clínica. Desde então diferentes protocolos e tecidos vêm sendo testados, entre eles o rim.

O primeiro estudo que avaliou PCIR e renoproteção foi no ano de 2002, quando *Ates et al* realizaram um ciclo de 10 min de isquemia hepática seguido de 10 min de perfusão previamente a uma sustentada isquemia renal por 45 min. Os ratos submetidos a este protocolo apresentaram melhores parâmetros renais bioquímicos e histopatológicos quando comparados a animais que foram submetidos exclusivamente à IR isolada sem PCI⁵¹.

Lazaris et al estudaram os efeitos renais do clameamento aórtico subdiafragmático e o uso de PCIR, revelando menor lesão nos rins ao executar curtos ciclos de clameamento da aorta infrarrenal. Este é considerado o primeiro estudo a avaliar a isquemia periférica em PCIR renal⁵². No ano de 2011, *Wever et al* foram pioneiros ao estudar IR renal associando PCIR através de torniquetes nos membros posteriores de ratos. Quatro protocolos diferentes de PCIR foram testados: um ciclo de 12 minutos de isquemia seguido de 12 minutos de perfusão do membro posterior unilateralmente previamente à IR renal por 25

minutos; um ciclo de 12 minutos de isquemia seguido de 12 minutos de reperfusão do membro posterior bilateralmente previamente à IR renal por 25 minutos; três ciclos de 4 minutos de isquemia seguido de 4 minutos de reperfusão do membro posterior unilateralmente antes de IR por 25 minutos; três ciclos de 4 minutos de isquemia seguido de 4 minutos de reperfusão do membro posterior bilateralmente antes de IR por 25 minutos. Ocorreu proteção renal em todos grupos quando comparados com a IR sem PCIR. Houve uma superioridade dos protocolos bilaterais sobre os unilaterais, além disso os protocolos de ciclos fracionados de 4 minutos demonstraram resultados discretamente melhores comparando com o ciclo de 12 minutos⁵³.

Um dos trabalhos de maior impacto sobre PCI renal é uma meta-análise de 2012 que investigou 58 artigos experimentais, comparando diferentes protocolos e variáveis. Apesar de apenas cinco estudos incluídos analisarem o PCIR, os dados expõem equivalência dos benefícios entre pré-condicionamento isquêmico local e remoto¹².

A possibilidade de produzir os ganhos do PCI sem submeter o rim alvo de IR a isquemias prévias e reduzir as complicações vasculares locais (ex. trombozes arteriais) motivou o processo translacional para a pesquisa clínica do PCIR. Diversos estudos clínicos apresentaram resultados positivos na preservação da função renal quando procedimentos envolvendo IR, tais como circulação extracorpórea e clampeamento aórtico, foram associados com PCIR²⁻⁴. Estudo envolvendo nefrectomias parciais videolaparoscópicas (procedimento em que se realiza clampeamento vascular temporário do pedículo renal) demonstrou proteção renal quando a PCIR foi executada através de curtos ciclos de isquemia no membro inferior utilizando esfigmomanômetro, exemplificando o grande potencial prático que esta estratégia possui⁵⁴.

A associação entre PCI e hipotermia transoperatória na redução de danos renais por IR foi investigada, até então, apenas pelo nosso grupo de estudos em isquemia e reperfusão de

órgãos coordenados pelo *Prof. Dr. Carlos Otávio Corso*. Neste estudo, *Ribeiro et al* realizou IR no rim esquerdo de ratos por 40 minutos, sendo realizado PCIL com e sem resfriamento local em parte dos animais. Os dados não demonstraram efeito sinérgico do PCIL concomitante à hipotermia na proteção da lesão renal por IR. O modelo empregado de PCI não resultou em benefícios, pelo contrário, revelou-se redutor dos efeitos benéficos do resfriamento⁵⁵.

A despeito disso, estudo de desenho semelhante foi executado com hipotermia tópica associada a PCIL hepático. Este artigo observou sinérgismo entre as técnicas, resultando em maior proteção da combinação comparado à hipotermia ou ao PCIL isolados⁵⁶.

Revisão da literatura - através da análise de artigos sobre experimentação animal pesquisados nas bases de dados do PubMed e EMBASE - revelou não existir, neste momento, pesquisa que analisa o potencial sinérgico da hipotermia e o pré-condicionamento isquêmico remoto.

Apesar dos diversos experimentos e seus resultados, os mecanismos pelos quais o PCI promove proteção à IR ainda não estão elucidados. Conjetura-se uma produção endógena de antioxidantes capazes de reduzir o estresse oxidativo decorrente das transformações causadas pela anaerobiose e intensificadas pela reação com o oxigênio da reperfusão. Outra hipótese é de uma complexa cascata bioquímica intracelular envolvendo a geração de autacóides (tais como adenosina, bradicinina, endotelina e opióides) frente a um estímulo isquêmico capazes de circular e alcançar tecidos a distância^{54,57}. Fato comum a todos os estudos é que a fisiopatologia dos efeitos protetores do PCI local ou remoto ainda necessita maiores esclarecimentos.

VI - MARCADORES INFLAMATÓRIOS E ESTRESSE OXIDATIVO

Os danos teciduais causados pela IR estão relacionados ao processo inflamatório e suas transformações celulares. A hipóxia celular leva a uma resposta inflamatória, seguida do recrutamento leucocitário, formação de radicais livres e dano intracelular. A reperfusão promove a transformação de espécies reativas em substâncias ainda mais tóxicas. A suplementação por enzimas antioxidantes, tais como CAT e SOD, reduz danos teciduais por IR e a deficiência destas agrava lesões, dados que reforçam a influência do estresse oxidativo na IR. A medida da atividade de SOD e CAT correlaciona-se diretamente com a intensidade do estresse oxidativo tecidual e, desta forma, serve como parâmetro objetivo nos estudos experimentais⁵⁸⁻⁶⁴.

A dosagem direta dos radicais livres existe, porém a instabilidade bioquímica in vivo destes demanda alta complexidade dos reagentes laboratoriais. Em virtude disso, derivados da peroxidação lipídica são quantificados, entre eles o F2-isoprastano (F2IP) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)⁶⁵⁻⁶⁷. Sabe-se que o F2IP possui valores mais específicos e estáveis em relação ao grau de peroxidação lipídica e, desta forma, considerado o mais fidedigno na avaliação do estresse oxidativo⁶⁸.

VII - TRANSFORMAÇÕES HISTOLÓGICAS DA ISQUEMIA-REPERFUSÃO

A isquemia-reperfusão causa dano nas diferentes células renais, principalmente as presentes no túbulo contorcido proximal e no ramo ascendente da alça de Henle devido ao seu metabolismo intenso. Durante este processo ocorre disfunção endotelial e destacamento das células tubulares, responsáveis pela obstrução e redução da filtração glomerular³⁰. A análise histológica renal permite classificar a gravidade da necrose tubular aguda causada pela IR de rins de ratos em níveis, segundo *Jablonski et al*: 0 = ausência de alterações; 1 = mitoses e necroses de células individuais; 2 = necrose das células

adjacentes aos túbulos contorcidos proximais, preservando os túbulos; 3 = necrose das células adjacentes aos túbulos contorcidos, associada a necrose do terço distal dos túbulos contorcidos proximais; 4 = necrose afetando os três segmentos dos túbulos contorcidos proximais⁶⁹.

VIII - TÉCNICA CIRÚRGICA EXPERIMENTAL

Os modelos cirúrgicos animais são fundamentais no estudo dos danos renais agudos. As técnicas de isquemia-reperfusão renal em ratos possuem ampla popularidade em função da reprodutibilidade dos métodos empregados.

A realização da isquemia renal pode ser executada de diferentes maneiras, sendo o clampeamento da artéria renal esquerda a de mais fácil execução. O pedículo renal esquerdo é mais longo que o direito, fator técnico que facilita na identificação e isolamento da artéria renal esquerda e justifica o uso do rim deste lado como alvo dos experimentos. A etapa de reperfusão ocorre no momento em que o clampe da artéria renal é retirado e o sangue retorna ao órgão. O tempo de isquemia e reperfusão utilizado nos protocolos experimentais atuais, tanto para induzir um PCI como para causar dano por IR, foi definido através dos seguintes ensaios. *Islam et al* definiram, no ano de 1997, que o período de isquemia renal de 40min foi ideal quando se objetiva promover lesão renal na IR⁹. O protocolo de PCIL identificado por *Torras et al* em 2002 mostrou-se mais eficiente ao se realizar um único ciclo de 15min de isquemia seguido de reperfusão por 10 min antes da prolongada IR, motivando a replicação deste protocolo nos subsequentes estudos⁶. Os protocolos de PCIR ainda não foram avaliados por muitas pesquisas comparativas, portanto são restritos os dados que embasam os protocolos utilizados. O estudo de *Wever et al* é, no momento, o que se destaca ao experimentar diferentes protocolos com distintos períodos

de isquemia e reperfusão em PCIR. Neste estudo, houve discreta superioridade nos protocolos com ciclos fracionados de 4 minutos de PCIR comparando com único ciclo de 12 minutos⁵³.

A hipotermia também pode ser realizada com distintos protocolos, tanto sistêmica como local. O resfriamento local em cirurgia pode ser realizado utilizando soro fisiológico 0,9% congelado triturado em contato com o órgão que objetiva-se reduzir a temperatura. Há necessidade de se isolar o órgão para manter a temperatura sistêmica habitual. Além disso, a temperatura da hipotermia deve ser considerada pois diferentes temperaturas de resfriamento causam efeitos desiguais. *Santos et al* definiram que em ratos a hipotermia tópica sob temperatura de 4 graus Celsius possui a maior proteção no tecido renal que irá sofrer IR³⁹.

A translação dos resultados experimentais para a pesquisa clínica possui importantes limitações devido às diferenças entre as espécies. Apesar de tais restrições, os modelos animais são essenciais para o entendimento dos mecanismos oxidativos e inflamatórios da IR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO

1. Salvadori M, Rosso G, Bertoni E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World Journal of Transplantation*. 2015;5(2):52-67.
2. Schmidt MR, Smerup M, Konstantinov IE, Shimizu M, Li J, Cheung M. Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007 abril;292(4):1883-90.
3. Ali ZA, Callaghan CJ, Lim E, Ali AA, Nouraei SAR. Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial. *Circulation* 2007; set:116(11 suppl):I98-105.
4. Zimmerman RF, Ezeanuna PU, Kane JC, Cleland CD, Kempananjappa TJ. Ischemic preconditioning at remote site prevents acute kidney injury in patients following cardiac surgery. *Kidney Int.* 2011 out;80(8):861-7.
5. Chatauret N, Badet L, Barrou B, Hauet T. Ischemia-reperfusion: From cell biology to acute kidney injury. *Prog Urol.* 2014 Jun;24 Suppl 1:S4-12.
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. Stokfisz K, Ledakowicz-Polak A, Zagorski M, Zielinska M. Ischaemic preconditioning - Current knowledge and potential future applications after 30 years of experience. *Adv Med Sci.* 2017 May 13;62(2):307-316.
8. 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.

9. 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.
10. 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.
11. Przyklenk K, Darling CE, Dickson EW, Whittaker P. Cardioprotection “outside the box”- the evolving paradigm of remote preconditioning. *Basic Res. Cardiol.* 2003;98(3):149-57.
12. Wever KE, Menting TP, Rovers M, van der Vliet JÁ, Rongen GA. Ischemic preconditioning in the animal kidney – a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE.* 2012 fev; 7(2):e32296. doi:10.1371/journal.pone.0032296.
13. Delbridge MS, Shrestha BM, Raftery AT, El Nahas AM, Haylor JL. The effect of body temperature in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant. Proc.* 2007 dez;39(10):2983-5.
14. Susantitaphong P, Alfayez M, Cohen-Bucay A, Balk EM, Jaber BL. Therapeutic hypothermia and prevention of acute kidney injury: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Resuscitation.* 2012 fev;83(2):159-67.
15. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nature Medicine.* 2011 Nov 1;17(11):1391–401.
16. MacAllister R, Clayton T, Knight R, Robertson S, Nicholas J, Motwani M, Veighey K. REmote 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.
17. Kosieradzki M, Rowiński W. Ischemia/Reperfusion Injury in Kidney Transplantation: Mechanisms and Prevention. *Transplantation Proceedings.* 2008 Dec 1;40(10):3279–88.

18. Saat TC, van den Akker EK, IJzermans JNM, Dor FJMF, de Bruin RWF. Improving the outcome of kidney transplantation by ameliorating renal ischemia reperfusion injury: lost in translation? *Journal of Translational Medicine*. 2016;14:20
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. Jang HR, Ko GJ, Wasowska BA, Rabb H. The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney. *J Mol Med (Berl)*. 2009 Sep;87(9):859-64
21. Chen CC, Chapman WC, Hanto DW. Ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2015 Jan 1;7:117-34.
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. Ponticelli C. Ischaemia-reperfusion injury: a major protagonist in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2014 Jun;29(6):1134-40
24. Siedlecki A, Irish W, Brennan DC. Delayed graft function in the kidney transplant. *Am J Transplant*. 2011 Nov;11(11):2279-96
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. Gritsch HA, Blumberg JM. Renal Transplantation. In: Wein, A. Campbell-Walsh Urology. Estados Unidos: Elsevier, 2015. p.1069-88.
27. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology*. 2010 Dec 1;10(12):826–37.
28. Rezkalla SH, Kloner RA. No-reflow phenomenon. *Circulation*. 2002 fev 5;105(5):656-62.

29. Bulkley GB. Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. *Br. J. Cancer Suppl.* 1987 Jun;8:66-73.
30. Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nature Reviews Nephrology.* 2011 Apr 1;7(4):189–200.
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, Leeb K, Janetschek G. Nephron-Sparing Surgery for Renal Tumours: Acceleration and Facilitation of the Laparoscopic Technique. *European Urology.* 2007 Feb;51(2):358–65.
33. 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. *European Urology.* 2009 Oct;56(4):625–34.
34. Donnino MW, Andersen LW, Berg KM, Reynolds JC, Nolan JP, Morley PT, Lang E, Cocchi MN, Xanthos T, Callaway CW, Soar J. ILCOR ALS Task Force. Temperature management after cardiac arrest: an advisory statement by the Advanced Life Support Task Force of the International Liaison Committee on Resuscitation and the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee and the Council on Cardiopulmonary, Critical Care, Perioperative and Resuscitation. *Circulation.* 2015;132:2448–2456.
35. Koo E, Sheldon RA, Lee BS, Vexler ZS, Ferriero DM. Effects of therapeutic hypothermia on white matter injury from murine neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Res.* 2017 May 31. doi: 10.1038/pr.2017.75.
36. Tang XN, Yenari MA. Hypothermia as a cytoprotective strategy in ischemic tissue injury. *Ageing Res Rev.* 2010; 9(1):61-8.

37. Martini WZ. The effects of hypothermia on fibrinogen metabolism and coagulation function in swine. *Metabolism*. 2007 Feb;56(2):214-21.
38. Grezzana Filho TJ, Mendonça TB, Gabiatti G, Kruel CD, Corso CO. Topic liver hypothermia and ischemic preconditioning. A new model of ischemia and reperfusion in rats. *Acta Cir Bras*. 2009; 24(4):262-6.
39. Santos EBD, Koff WJ, Grezzana Filho T de JM, 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.
40. De Rosa S, Antonelli M, Ronco C. Hypothermia and kidney: a focus on ischaemia-reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2017 Feb 1;32(2):241-247.
41. Jiao B, Liu S, Liu H, Cheng D, Cheng Y, Liu Y. Hypothermic machine perfusion reduces delayed graft function and improves one-year graft survival of kidneys from expanded criteria donors: a meta-analysis. *PLoS One*. 2013 Dec 10;8(12):e81826.
42. Ploeg RJ, van Bockel JH, Langendijk PT, Groenewegen M, van der Woude FJ, Persijn GG, Thorogood J, Hermans J. Effect of preservation solution on results of cadaveric kidney transplantation. The European Multicentre Study Group. *Lancet*. 1992 Jul 18;340(8812):129–37.
43. Novick AC. Renal hypothermia: in vivo and ex vivo. *Urol Clin North Am*. 1983 Nov;10(4):637–44.
44. Smith ZL. Current Status of Minimally Invasive Surgery for Renal Cell Carcinoma. *Current Urology Reports*. 2016 Apr 19:1–7.

45. Fiorentini MR, Santos EB, Longo L, Kliemann LM, Koff WJ, Corso CO. Analysis of the effects of topical renal hypothermia on lung tissue after kidney ischemia and reperfusion in rats. *Acta Cir. Bras.* 2015 July Oct 30(7):445-451.
46. Opelz G, Döhler B, Ruhstroth A, Cinca S, Unterrainer C, Stricker L, Scherer S, Gombos P, Süsal C, Daniel V, Tran H. The collaborative transplant study registry. *Transplant Rev (Orlando).* 2013 Apr;27(2):43-5
47. Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Atherosclerosis.* 2009 Jun;204(2):334–41.
48. 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.
49. Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* 1996; 94 (9): 2193-200
50. Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schmidt MR, Hoschtitzky JA, Vogel M, Sorensen K, Redington AN, MacAllister R. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation.* 2002 Dec 3;106(23):2881-3.
51. Ateş E, Genç E, Erkasap N, Erkasap S, Akman S, Firat P, Emre S, Kiper H. Renal protection by brief liver ischemia in rats. *Transplantation.* 2002 Nov 15;74(9):1247-51.
52. Lazaris AM, Maheras AN, Vasdekis SN, Karkaletsis KG, Charalambopoulos A, Kakisis JD, Martikos G, Patapis P, Giamarellos-Bourboulis EJ, Karatzas GM, Liakakos TD. Protective effect of remote ischemic preconditioning in renal

ischemia/reperfusion injury, in a model of thoracoabdominal aorta approach. *J Surg Res.* 2009 Jun 5;154(2):267-73.

53. Wever KE, Warlé MC, Wagener FA, van der Hoorn JW, Masereeuw R, van der Vliet JA, Rongen GA. Remote ischaemic preconditioning by brief hind limb ischaemia protects against renal ischaemia-reperfusion injury: the role of adenosine. *Nephrol Dial Transplant.* 2011 Oct;26(10):3108-17.
54. Huang J, Chen Y, Dong B, Kong W, Zhang J, Xue W. Effect of remote ischaemic preconditioning on renal protection in patients undergoing laparoscopic partial nephrectomy: a blinded randomized controlled trial. *BJU Int.* 2013 mar;112(1):74-80.
55. Ribeiro GBS, Santos EB, Bona SR, Schaefer PG, Garcez TNA, Rabolini EB, Smaniotto GP, Marroni NAP, Corso CO. The effects of local ischemic preconditioning and topical hypothermia in renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Acta Cir Bras.* 2017 Oct; 32(10):816-826.
56. Grezzana Filho T de JM, Mendonça TB de, Gabiatti G, Rodrigues G, Marroni NAP, 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.
57. Hausenloy DJ. Cardioprotection techniques: preconditioning, postconditioning and remote conditioning (basic science). *Curr Pharm Des.* 2013;19(25):4544-63.
58. Rahman NA, Mori K, Mizukami M, Suzuki T, Takahashi N, Ohyama C. Role of peroxynitrite and recombinant human manganese superoxide dismutase in reducing ischemia-reperfusion renal tissue injury. *Transplant Proc.* 2009 Nov;41(9):3603-10.

59. Schneider MP, Sullivan JC, Wach PF. Protective role of extracellular superoxide dismutase in renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney international*. 2010;78(4):374-381.
60. 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.
61. Yamanobe T, Okada F, Iuchi Y, Onuma K, Tomita Y, Fujii J. Deterioration of ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in SOD1-deficient mice. *Free Radic Res*. 2007 Feb;41(2):200-7.
62. Nath KA, Paller MS. Dietary deficiency of antioxidants exacerbates ischemic injury in the rat kidney. *Kidney Int*. 1990 Dec;38(6):1109-17.
63. Dennis JM, Witting PK. Protective Role for Antioxidants in Acute Kidney Disease. *Nutrients*. 2017;9(7):718.
64. 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.
65. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*. 1993. May;57(5 suppl):715S-724S.
66. 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.

67. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem.* 2005 Mar 23;53(6):1841–56.
68. 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.
69. 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.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) através do clampeamento da artéria ilíaca comum esquerda associado, ou não, à hipotermia tópica renal sobre os danos do tecido renal decorrentes do processo de isquemia-reperfusão renal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se o PCIR, associado ou não à hipotermia, é capaz de atenuar o desenvolvimento de estresse oxidativo e lesão histopatológica renal ocasionados pela IR do rim.
- Avaliar se a hipotermia, associado ou não ao PCIR, é capaz de atenuar o desenvolvimento de estresse oxidativo e a lesão histopatológica renal ocasionados pela IR do rim.
- Avaliar se a associação de PCIR com hipotermia é capaz de amplificar o potencial benefício de cada uma das estratégias de prevenção de danos na IR renal

ARTIGO ORIGINAL REDIGIDO EM LÍNGUA INGLESA

The effects of remote ischemic preconditioning and topical hypothermia in renal ischemia-reperfusion injury in rats.

Guilherme Lang Motta¹, Pablo Cambeses Souza² Emanuel Burck dos Santos³, Silvia Regina Bona⁴, Pedro Guilherme Schaefer⁵, Caetano Araújo Torres Lima⁶, Norma Anair Possa Marroni⁷, Carlos Otávio Corso⁸.

¹ MD, Fellow Master Degree, Postgraduate Program in Medicine: Surgical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil. Conception and design of the study; technical procedures; acquisition, interpretation and analysis of data; manuscript writing.

² MD, Fellow Master Degree, Postgraduate Program in Medicine: Surgical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil. Acquisition and interpretation of data; technical procedures.

³ MD, MSc, PhD, Department of Urology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil. Conception and design of the study; critical revision.

⁴ MSc, PhD, Laboratory of Experimental Gastroenterology and Hepatology, HCPA, Porto Alegre, Brazil. Acquisition and interpretation of data; technical procedures.

⁵ MD, Department of Pathology, HCPA, Porto Alegre, Brazil. Histopathological examinations; acquisition of data.

⁶ Graduate Student, School of Medicine, UFRGS, Porto Alegre, Brazil. Acquisition of data; technical procedures

⁷ MSc, PhD, Full Professor, Physiologist, Laboratory of Experimental Gastroenterology and Hepatology, HCPA, Porto Alegre, Brazil and Laboratory of Oxidative Stress and Antioxidants, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, Brazil. Acquisition and interpretation of data; technical procedures.

⁸ MD, MSc, PhD, Associate Professor of Surgery, Department of Surgery, UFRGS, and Surgery Unit, HCPA, Porto Alegre, Brazil; General Surgery Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil. Conception and design of the study; interpretation of data; manuscript writing; critical revision; final approval

Corresponding author: Carlos Otávio Corso, MD, PhD. General Surgery Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Address: Ramiro Barcelos Street 2350, room 747, Porto Alegre, RS, Brazil, Postal Code 90035-903. Email: corso@portoweb.com.br. Phone: +55 5133598232

ABSTRACT

The effects of remote ischemic preconditioning and topical hypothermia in renal ischemia-reperfusion injury in rats.

Introduction: Ischemia-reperfusion injury (IR) can be reduced using measures such as hypothermia and remote ischemic preconditioning (RIPC). Combination of these might result in potential protection to be clarified.

Objectives: To assess the association between RIPC and topical hypothermia in renal IR injuries, especially regarding oxidative stress and histological changes.

Methods: Thirty two Wistar rats, after right nephrectomy, were randomly assigned to four surgical experimental protocols in the left kidney: warm ischemia (group 1), cold ischemia (group 2), RIPC followed by warm ischemia (group 3) and RIPC followed by cold ischemia (group 4). After 240 minutes of reperfusion, the left kidney was collected to analysis of histological changes, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity. The right kidney was used as the control group. Serum was collected before and after procedures to evaluate creatinine.

Results: RIPC combined with cold ischemia during IR experiment revealed no differences compared to any of the other interventional groups regarding histological changes ($p=0.722$). Oxidative stress shows no significant variations among groups. Serum creatinine at end of procedure showed lower levels in the animals submitted to hypothermic IR protocols ($p<0.001$).

Conclusion: Combining RIPC and local hypothermia provides no renal protection in IR injury. Hypothermia, however, seems preserve renal function during ischemic events. Furthermore, RIPC solely followed by warm IR did not show benefits in any parameters compared to warm IR alone or control groups, suggesting limitations in the early window of protection analysis.

Key Words: Ischemia, Reperfusion Injury, Hypothermia, Free Radicals, Oxidative Stress

INTRODUCTION

Interruption of blood flow through ischemia leads to a cascade of events culminating in cell death. During anaerobic metabolism of ischemic tissues, intracellular hypoxanthine accumulates due to adenosine triphosphate (ATP) degradation. The reintroduction of blood flow through reperfusion paradoxically produces additional damage, which is a phenomenon known as ischemia-reperfusion injury (IR)¹. This occurs by combining oxygen from tissue reperfusion with hypoxanthine resulting in free radical production, which is extremely harmful to the cellular environment^{2,3}. Clinical situations in which we find IR are diverse, such as transplants, extracorporeal circulation, and partial nephrectomies⁴⁻⁶.

Several strategies to reduce IR damage have been developed, including the use of hypothermia, hypertonic solutions, antioxidants, and, more recently, ischemic preconditioning (IPC)⁶. Hypothermia is routinely used during organ transplantation preservation and renal surgery by arterial clamping, and is widely used to prevent damage from IR⁷.

Inducing endogenous production of antioxidants through short cycles of ischemia-reperfusion prior to prolonged ischemia is the definition of IPC, and is one of the most recent strategies for preventing IR damage⁸⁻¹⁰. The ability to perform IPC in tissues distal to the IR-exposed organ, known as remote ischemic preconditioning (RIPC), makes this a promising and practical transoperative maneuver^{11,12}.

There is considerable evidence on the benefits of hypothermia and RIPC as isolated strategies for the prevention of IR damage in contrast to little information on the association of synergistic protective effects. Therefore, we evaluated the combined effect of RIPC and hypothermia on renal IR injury through a pioneering study with experimental surgery in rats.

METHODS

The study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (project number, 150471). It is in compliance with the international guidelines of good practices in animal research from the National Institute of Health (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Bethesda, USA, 2011) and was conducted in accordance with the International Principles for Biomedical Research Involving Animals, published by the Council of International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) as well as the Brazilian law on the scientific use of animals (Law 11.794 / 2008).

Animals and Study Design

In a prospective design, 32 male Wistar rats weighing between 277–447g and aged 54–66 days were randomly assigned following simple randomization (random numbers) into four groups (group 1, group 2, group 3, and group 4) of eight animals according to the surgical protocol for the left kidney. Animals were housed in the Animal Experimentation Unit of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) in groups of four in separate cages at room temperature ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) under a 12-hour light/dark cycle with free access to water and rat chow.

All 32 animals underwent right nephrectomy at the beginning of the procedure, and 8 of these 32 right kidneys were randomly selected to form the control group (Group 0). In Group 1, ischemia of the left renal pedicle was induced for 40 minutes under euthermia (37°C ; Warm ischemia) followed by reperfusion for 4 hours, when we performed left nephrectomy and euthanasia. In Group 2, left renal pedicle ischemia was performed for 40 minutes under local hypothermia (4°C ; Cold ischemia) and systemic euthermia followed by reperfusion for 4

hours under euthermia and left nephrectomy. Group 3 underwent RIPC by clamping the left iliac artery for 15 minutes followed by reperfusion for 10 minutes, proceeding to ischemia of the left renal pedicle for 40 minutes under euthermia (37°C; RIPC + Warm ischemia), new reperfusion for 4 hours, and left kidney withdrawal. Group 4 underwent RIPC by clamping the left iliac artery for 15 minutes followed by reperfusion for 10 minutes under euthermia, proceeding to ischemia of the left renal pedicle for 40 minutes under local hypothermia (4°C; RIPC + Cold ischemia), and reperfusion for 4 hours under euthermia (Figure 1).

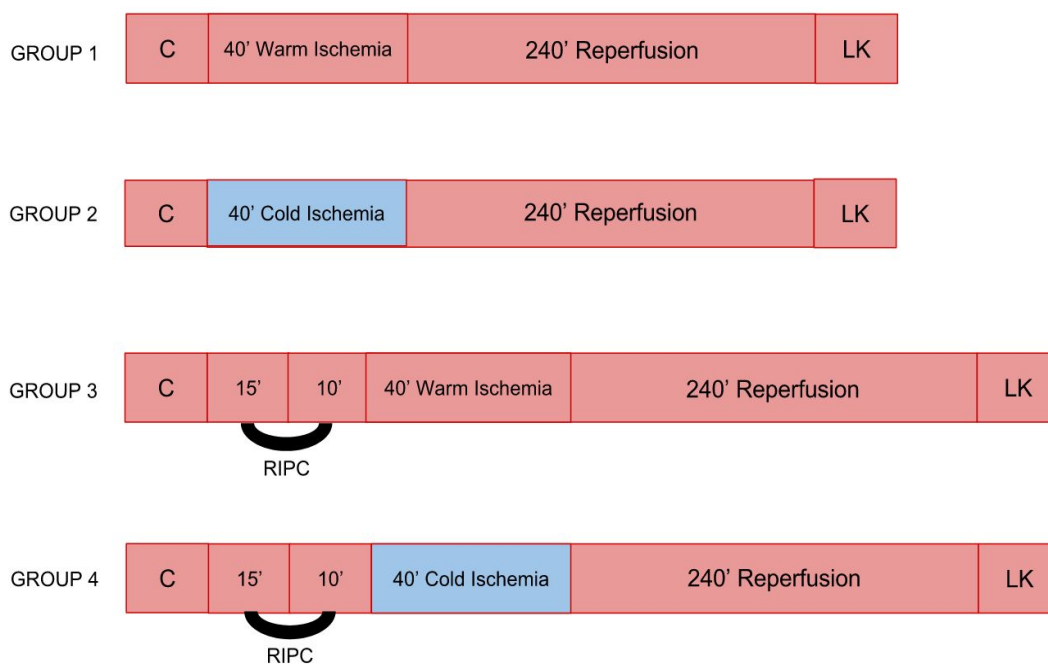


Figure 1 - Surgical protocols. “C” indicates right nephrectomy, which represents the Control (Group 0). “LK” represents left kidney retrieval. “RIPC” means remote ischemic preconditioning using 15 minutes of ischemia of the left iliac artery followed by 10 minutes of reperfusion

Anesthesia was induced with isoflurane vaporized at 3-5% by inhalation. Soon after, the animals were placed supine on a heated surgical table; general anesthesia was maintained by vaporization of isoflurane at 2-3% with an oxygen flow of 1 L/min, with the reflexes of the right hind paw being periodically tested in order to guarantee adequate anesthesia. The

systemic temperature of the animals was constantly measured through a rectal electronic thermometer (Termomed 1.0, Intoterm, Porto Alegre, Brazil). When necessary, a heating lamp was used to maintain the systemic temperature between 35.0°C and 37.1°C.

After inducing general anesthesia, 1 ml of blood was collected through retro-orbital puncture for the initial analysis of creatinine under ophthalmic anesthesia. Then, abdominal trichotomy, intraperitoneal administration of tramadol (10 mg/kg), 0.5% bupivacaine (1 mg/kg) injection at the median incision site, and, finally, longitudinal median laparotomy were performed. Right total nephrectomy was performed initially after laparotomy in all 32 animals. Half of the kidneys were stored in formalin 10% for future histopathological analysis; the other half were kept at a temperature of -80°C for analysis of oxidative stress markers.

The left kidney of the animals was submitted to the four experimental nephrectomy protocols mentioned previously. The local temperature in the kidney was maintained under euthermia in groups 1 and 3, whereas renal hypothermia was applied in groups 2 and 4 during renal pedicle ischemia. This local hypothermia was performed by keeping the kidney in contact with frozen and crushed 0.9% saline solution and isolated from the other tissues through a fenestrated protective latex tissue; the temperature was controlled at 4°C using an intraparenchymal thermometer (BAT 12, IITC Life Science, W. Hills, CA, USA) installed in the renal cortex.

RIPC was induced in groups 3 and 4 by clamping the left common iliac artery under euthermia for 15 minutes and reperfusion for 10 minutes before proceeding to left kidney IR. Left renal pedicle ischemia was performed in all groups (under euthermia in groups 1 and 3 and hypothermia in groups 2 and 4) by clamping the renal pedicle for 40 minutes, followed by reperfusion under euthermia for 240 minutes. Microvascular clamps (Medicon, Tuttlingen, Germany) were used to induce vascular ischemia of the left common iliac artery and left renal pedicle. At the end of 40 minutes of renal ischemia, the vascular clamp was removed

and the abdominal wall was sutured. After this, the animal was kept awake for 240 minutes under analgesia (new dose of tramadol 10 mg/kg) with free access to water in a heated cage. At the end of the reperfusion period, the anesthetic process and laparotomy were repeated to perform a left nephrectomy. As in the right kidney, half of the left kidneys were kept in formalin 10% for histopathological evaluation; the other half were stored at a temperature of -80°C for measurement of oxidative activity. At the end of the procedure, a new blood sample was collected through cardiac puncture followed by euthanasia using cardiectomy.

Histopathological analysis

Renal tissue was fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, sliced, and stained by the periodic acid-Schiff (PAS) and hematoxylin and eosin (H&E) methods. Acute tubular necrosis was measured through the scale described by *Jablonski et al.* in 5 degrees (Figure 2): 0, absence of abnormalities; 1, mitosis and necrosis in individual cells; 2, necrosis of the cells adjacent to the proximal convoluted tubules, preserving the neighboring tubules; 3, necrosis restricted to the distal third of the proximal convoluted tubules and a zone of necrosis extending to the inner cortex; and 4, necrosis of all segments of the proximal convoluted tubules¹³. This analysis was performed by a blinded pathologist.

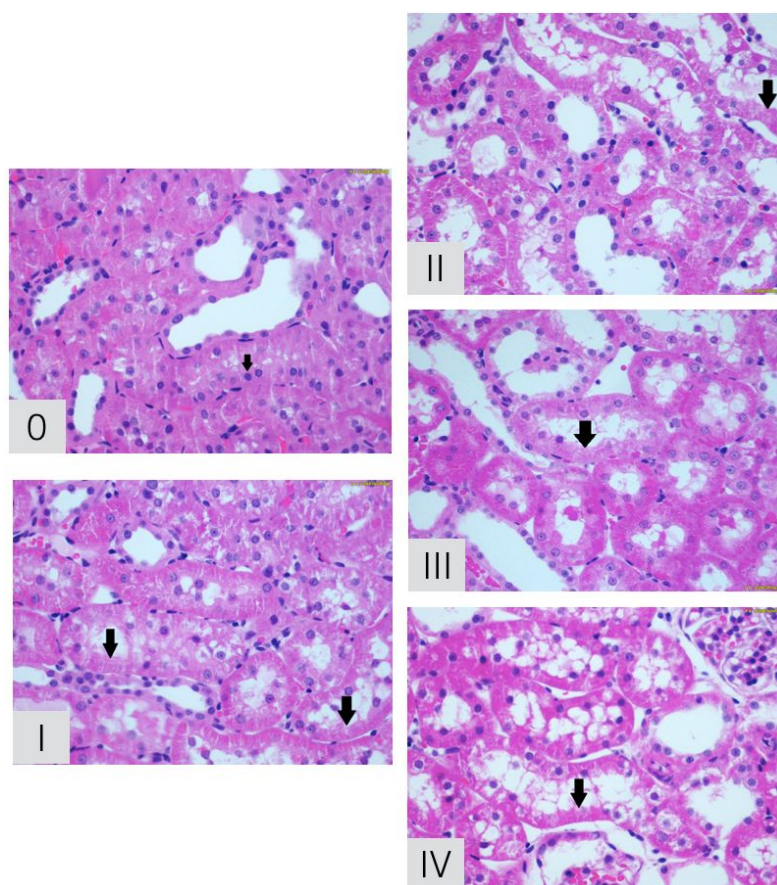


Figure 2 - *Acute tubular necrosis degrees by Jablonski. 0, absence of abnormalities; I, mitosis and necrosis in individual cells; II, necrosis of the cells adjacent to the proximal convoluted tubules, preserving the neighboring tubules; III, necrosis restricted to the distal third of the proximal convoluted tubules and a zone of necrosis extending to the inner cortex; and IV, necrosis of all segments of the proximal convoluted tubules*

Oxidative stress and antioxidant enzyme activity

Free radicals are biochemically unstable *in vivo*, with a costly dosage and highly complex practical usage. Thus, lipid peroxidation derivatives are usually quantified¹⁴. As a renal oxidative stress measure, tissue levels of F2-isoprostanes (F2IP), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) activities were quantified.

In order to complete the analyses, half of the kidneys preserved at -80°C underwent homogenization for 40 seconds at 4°C in the presence of 1.15% KCl (9 mL/g tissue) and phenylmethylsulfonyl fluoride at a concentration of 100 mM isopropanol (10 μL per ml of KCl) using Ultra-turrax homogenizer (IKA Works Inc., Wilmington, DE, USA). This homogenate was then centrifuged in a Sorvall Super T21 refrigerated centrifuge (Kendro Laboratory Products, Weaverville, NC, USA), and the supernatant was collected and frozen again at -80°C for biochemical analyses. In addition, protein concentration was measured by the Bradford method using standard bovine albumin and spectrophotometry at 595 nm.

F2-isoprostane (F2IP) is considered a reliable tissue marker of lipid peroxidation, presenting very stable and specific values in the quantification of oxidative stress¹⁴. Tissue levels of F2IP were determined through the 8-iso-PGF 2α ELISA kit (ADI-900-010, Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, USA) after homogenization of the kidney.

The measurement of superoxide dismutase activity (SOD) was performed by inhibiting superoxide radical reaction with epinephrine in a spectrophotometer at 480 nm and expressed as USOD/min/mg protein.

Quantification of catalase activity (CAT) was based on the decomposition of hydrogen peroxide in a spectrophotometer at 240 nm and expressed as pmol/mg protein.

Biochemical analysis of renal function

Levels of serum creatinine were determined at baseline from 1 mL of blood collected through retro-orbital puncture and at euthanasia from blood collected through cardiac puncture using a Roche Cobas 8000 c702 automatic biochemistry apparatus.

Statistical analysis

Data analysis was performed using a general linear model for statistical significance using SPSS program (SPSS Statistics for Windows, Version 21.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA). Since histological grade is an ordinal variable, Kruskal-Wallis test in conjunction with Dunn's test were used. Bonferroni correction was applied for multiple comparisons between groups. The level of significance was set at 5% ($p < 0.05$), and data were expressed as mean and standard error (SE). Sample size was calculated based in Santos *et al*¹⁵ previous research using a 80% power of study and considering a 5% significance level.

RESULTS

Weight, age, systemic final temperature, and baseline creatinine did not differ between groups of animals (data not shown).

Histological analysis identified all grades of acute tubular necrosis ranging from 0 to 4. It was not possible to ascribe a specific grade to an individual interventional group due to overlapping of findings. The control group, however, presented only grade 0 damage, which was not found in any other group. Furthermore, grade 4 absence occurred only in experimental group 3 (remote preconditioning with warm ischemia) and the controls.

There was a significant difference between groups regarding histological grade and the controls ($p = 0.001$). The control group presented a significantly lower degree than all other groups ($p < 0.05$). Among interventional groups, there was no statistically significant difference ($p = 0.722$).

Oxidative stress levels were measured by F2IP tissue survey and revealed no statistically difference between interventional groups and control kidneys. When comparing exclusively

the warm ischemia groups (Group 1 and 3), we observed that those exposed to RIPC before warm IR presented higher F2IP levels than those in the warm ischemia without preconditioning group ($p < 0.05$) (Figure 3).

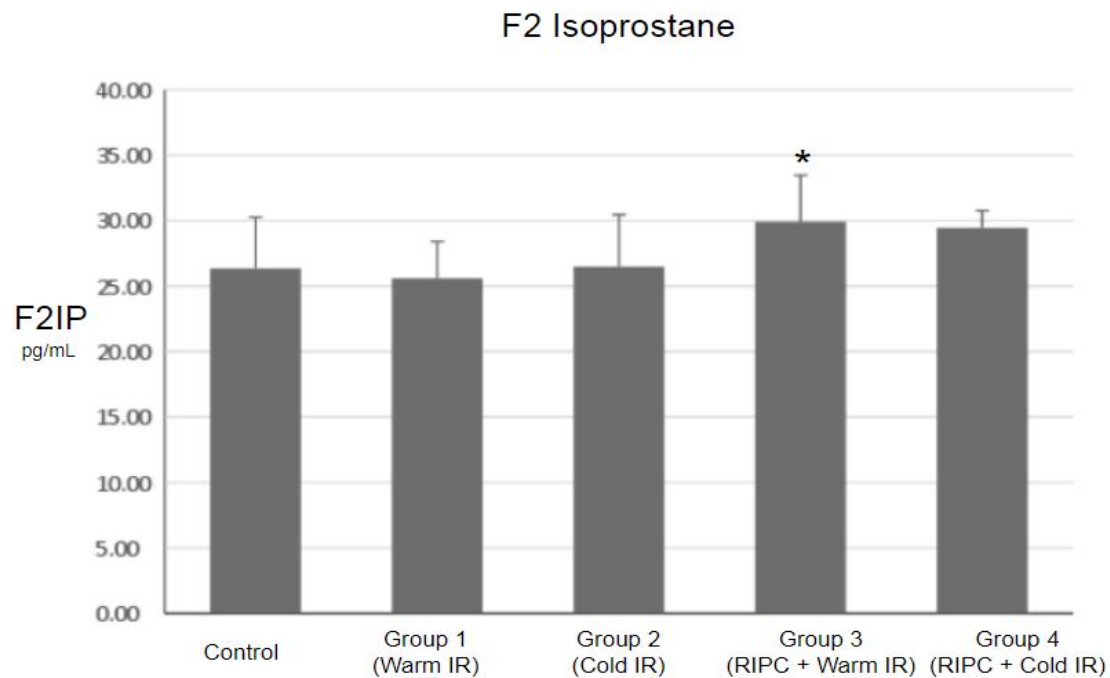


Figure 3 - Comparison between groups and F2-isoprostanes tissue levels. No statistically difference between interventional groups and control kidneys. * Among warm ischemia groups, we observe that those submitted to RIPC before warm IR present higher F2IP levels than warm ischemia without preconditioning ($p < 0.05$). Data are expressed as mean \pm SE. Generalized linear models were applied. Bonferroni correction was applied to the significance levels of each test.

Catalase measurements did not differ statistically between interventional and control groups ($p = 0.736$) (Figure 4).

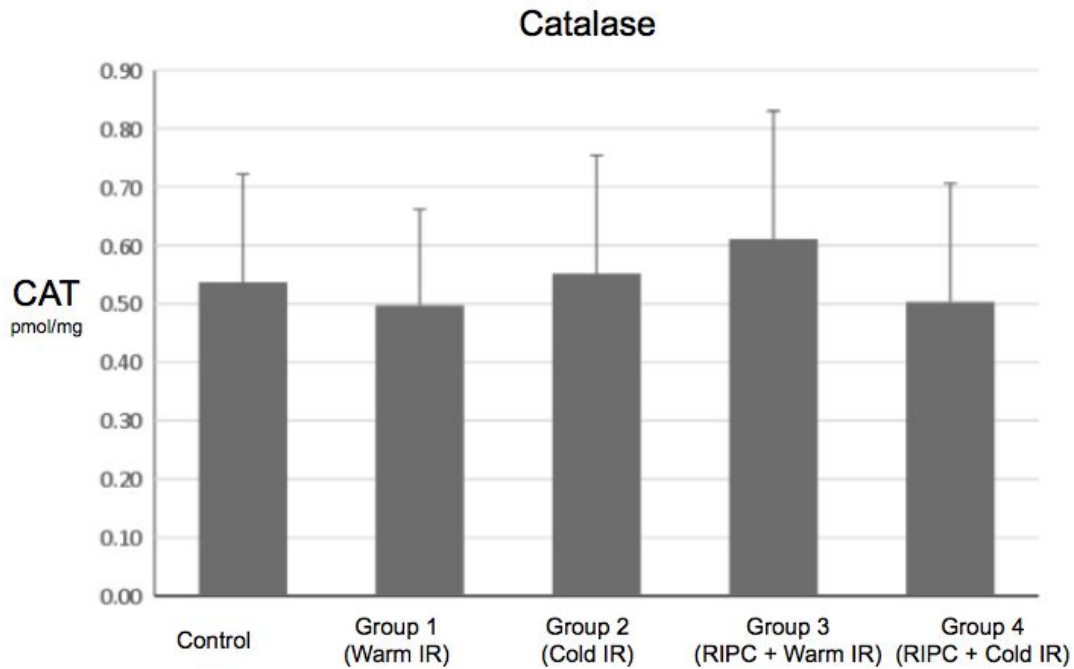


Figure 4 - Comparison between groups and CAT activity. CAT levels do not differ statistically between interventional and control groups ($p=0.736$). Data are expressed as mean \pm SE. Generalized linear models were applied. Bonferroni correction was applied to the significance levels of each test.

SOD activity showed higher levels in cold ischemia (groups 2 and 4) compared to that in warm ischemia without RIPC (group 1) ($p < 0.05$); however, there was no difference between the interventional groups and control group ($p = 0.736$) (Figure 5).

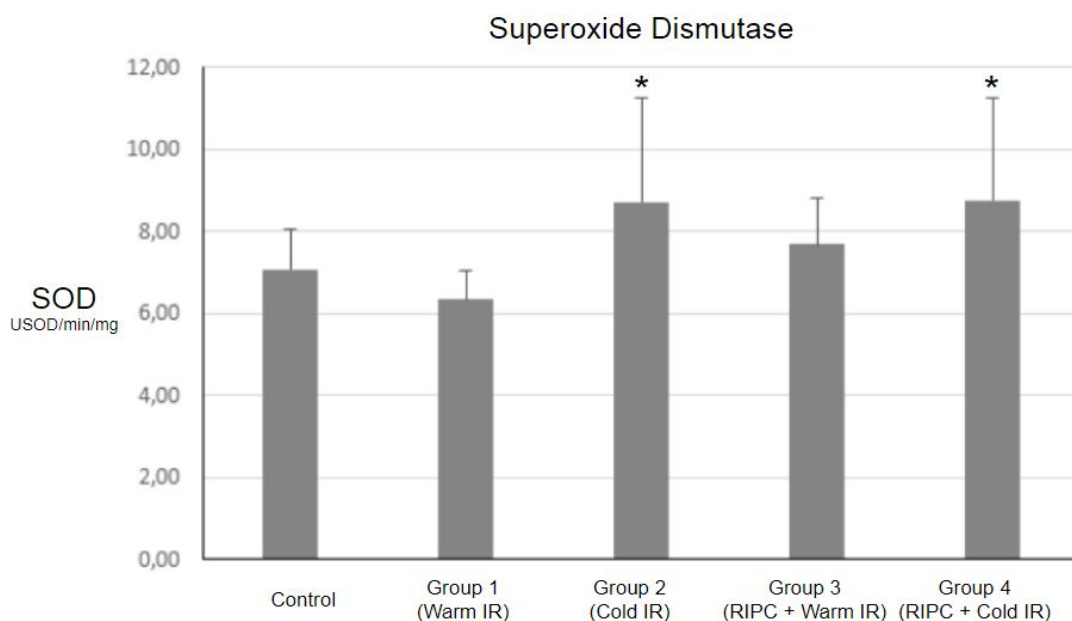


Figure 5 - Comparison between groups and SOD activity. * SOD activity show higher levels in cold ischemia (groups 2 and 4) compared to warm ischemia without RIPC (group 1) ($p < 0.05$), however there is no difference between experimental groups and control. Data are expressed as mean \pm SE. Generalized linear models were applied. Bonferroni correction was applied to the significance levels of each test.

Biochemical analysis of renal function at the end of the procedure revealed lower serum creatinine levels in cold ischemia groups (with or without RIPC) compared to the warm ischemia sample (with or without RIPC) ($p < 0.001$) (Table 1).

	GROUP 1 (Warm IR)	GROUP 2 (Cold IR)	GROUP 3 (RIPC + Warm IR)	GROUP 4 (RIPC + Cold IR)	P Value
Baseline Creatinine (mg/dL)	0,35 ± 0,06	0,32 ± 0,10	0,34 ± 0,06	0,32 ± 0,06	0,735
Final Creatinine (mg/dL)	1,72 ± 0,26 ^a	0,98 ± 0,17 ^b	1,67 ± 0,41 ^a	1,28 ± 0,36 ^b	<0,001

Table 1 – Serum creatinine levels. Observe that baseline creatinine do not differ, however at end of experiment there are lower values of creatinine in animals submitted to cold ischemia ($p<001$). Similar letters (**a,b**) do not diverge in the Bonferroni correction for 5% significance.

DISCUSSION

Ischemic preconditioning (IPC) is a maneuver in which short periods of ischemia and reperfusion precede prolonged ischemia and subsequent reperfusion, promoting a conditioning stimulus at the target organ (local preconditioning [LIPC]) or at distant tissues (remote preconditioning [RIPC]). This is an effective strategy in reducing injury through the tissue IR process^{4,6,8}.

The first analysis on the effects of preconditioning was described by *Murry et al.* in 1986 where the effects of LIPC on canine myocardium were evaluated⁸. Since then, several studies involving different animals, organs, tissues, and IPC protocols have been described.

The effects of preconditioning on renal tissue were first described in 1997, when *Islam et al.* performed LIPC in rat kidneys. The use of protocols based on myocardial experiments revealed discouraging results. However, this study identified that the ischemia period should

be more than 20 minutes when there is intent to promote renal injury; further, a duration of 40 minutes was found to be ideal for this purpose⁹.

In 2002, *Torras et al.* performed a complex study using different variations of IPC in the kidneys of rats, reaching the current bases of preconditioning protocols. In study occasion, it was evidenced that LIPC was shown to be more nephroprotective when performed with a single 15-min cycle of ischemia followed by reperfusion for 10 min before subsequent prolonged IR. Due to the similarity with our study, this was the protocol used during our experiments⁶.

An alternative to PCI is RIPC, which is defined as short cycles of ischemia-reperfusion in a tissue distant from another which will undergo a prolonged cycle of IR. The concept of RIPC arose in 1993 when a canine experimental study by *Przyklenk et al.* showed that inducing short IR cycles in a coronary vascular territory caused myocardial protection of another vascular territory during subsequent cardiac IR¹⁶. *Gho et al.* expanded the potential of RIPC by reporting benefits of short cycles of ischemia in the mesenteric artery prior to myocardial IR in 1996, validating the hypothesis that tissues used for IPC do not need to be from the same organ under IR¹⁷.

The first study involving RIPC and nephroprotection occurred in 2002, when *Ates et al.* performed a short cycle of hepatic ischemia and reperfusion prior to sustained renal ischemia in rats. Animals submitted to this protocol presented better biochemical and histopathological renal parameters when compared to rats exposed exclusively to IR without preconditioning¹⁸. *Wever et al.* were pioneers in studying renal IR by inducing RIPC through tourniquets in the hind limbs of rats in 2011, similarly to our study protocol. At that time, different RIPC protocols were tested, with nephroprotection occurring in all groups when compared to IR without RIPC. It is interesting to mention that there was a superiority of bilateral protocols over unilateral ones and, in addition, protocols of fractional cycles showed

discretely better results comparing with those with a single cycle¹⁹. One of the most important studies on renal IPC is a meta-analysis on 58 experimental articles, which compared several protocols. The results revealed equivalent benefits between local and remote ischemic preconditioning¹².

The preconditioning mechanism of protection remains to be clarified despite the result of several studies. It is believed that there is an endogenous production of antioxidants that could reduce intracellular oxidative stress. In addition, it is known that the production of autacoids (adenosine, opioids, endothelin, and bradykinin) is involved in this process, since these substances are elevated during IPC^{5,18-21}.

The potential to generate benefits without subjecting the target organ to multiple ischemia and reducing local vascular complications (e.g., arterial thrombosis) is encouraging for the clinical application of PCIR. Its use has been described with reassuring results in the preservation of renal function during procedures associated with renal IR, such as aortic clamping, extracorporeal circulation, renal transplantation, and partial nephrectomy^{5,21,22}.

Hypothermia causes minor cellular metabolism and is another strategy for reducing tissue damage from the IR process, since renal oxidative stress is lower under low temperatures compared to its eutermic pairs¹⁵. The benefit of local hypothermia in renal tissue varies according to temperature, as demonstrated by *Santos et al.* in a study demonstrating that the temperature of 4°C leads to a lower oxidative activity in renal tissue submitted to IR in Wistar rats compared to that in other degrees of hypothermia¹⁵. *Fiorentini et al.* also identified that performing local hypothermia during renal IR reduces inflammatory activity in remote organs not involved in the IR (e.g., lung), revealing the systemic benefits of this maneuver²³.

Other variables can influence the effects of hypothermia, including the tissue preservation solution and perfusion protocols. There are several means of preserving organs for transplantation, such as the *University of Wisconsin* and *Euro-Collins* solutions. It seems that the former promotes greater survival of renal grafts during transplantation²⁴.

Despite several studies evaluating ischemic preconditioning, there are no studies combining RIPC and hypothermia to identify whether there is a synergistic protective effect when applying these two modalities for protection against the effects of prolonged IR on renal tissue. The association between local renal preconditioning and transoperative hypothermia was investigated by *Ribeiro et al.*, when LIPC was performed with and without low kidney temperatures. The results did not demonstrate the synergistic effects of LIPC concomitant with hypothermia in renal protection during IR. In fact, hypothermia benefits were reduced when the kidneys were exposed to LIPC²⁵.

Considering the feasibility and benefits of RIPC or hypothermia, we performed the present study to elucidate the potential combination of its effects on IR lesions. We produced a short-term experiment using histopathological, oxidative stress and creatinine as endpoints.

In our study, only male rats were selected to keep the sample as homogeneous as possible. There is also evidence of a greater susceptibility of this sex to renal injury due to IR. It is believed that estrogen has protective potential for renal tissue under ischemia, a fact that should be better clarified in the future²⁶.

The unique anesthesia protocol and preoperative preparation were performed in all animals, since many substances administered could protect or damage the tissue under ischemia and reperfusion. Tramadol, an opioid analgesic used in our experiment, was recently associated with an influence on ischemic preconditioning, according to *Oliveira et al.* This study demonstrated that tramadol reduces renal IR damage when used alone and associated with

RIPC. However, there was no positive synergistic effect between RIPC and tramadol, since performing RIPC without administering tramadol has been shown to be more effective in reducing renal damage than that when combined²⁰. Another drug used in our study with influence on the IR process is isoflurane, which was used as an inhalation anesthetic. There is evidence of the preconditioning effects of the drug itself and this information should be considered when interpreting the results of our study²⁷.

In analyzing the histopathological changes, we observed that there were no differences among the experimental groups, even when comparing single warm IR with hypothermia or preconditioning protocols. However, there was a statistical difference with control kidneys, meaning that this experimental model of surgery is capable of inducing damage.

The absence of benefits from IPC is previously reported in one of the largest meta-analysis of experimental ischemic preconditioning, where 12 of 26 studies included did not demonstrate advantages in performing IPC regarding histological changes¹². In this meta-analysis, the authors analyzed 205 controls and 191 IR animals submitted to different ischemic preconditioning protocols (including local and RIPC) for a subsequent IR and histopathological assessment. An overall significant IPC protective effect against tissue damage was found; however, a strong trend towards a late window of protection is mentioned, suggesting that these advantages were more pronounced when kidneys were collected at least 24 hours after preconditioning. Furthermore, an overall study heterogeneity of 63% is also cited by the authors. In our study, left nephrectomies occurred 240 minutes after IPC, which is considered an early window, and this could justify the lack of differences among the interventional protocols in our study.

Despite considerable evidence on renal protection using hypothermia, lack of protection or histologic damage due to cold temperatures is also mentioned^{15,28}. In a similar experiment using acute reperfusion, *Santos et al.* could not prove statistically that hypothermia reduces

histological changes in short-time IR¹⁵. Moreover, another study comparing structural changes in renal rats exposed to a single episode of hypothermia showed that rewarmed kidneys (kidneys exposed to cold and subsequent warm temperatures) have more tubular changes than persistently cold kidneys²⁸. Our study used a short-time rewarmed protocol that demonstrated no differences on histology after hypothermic IR. The combination of remote ischemic preconditioning and hypothermia was also neither beneficial nor detrimental, compared to single ischemia-reperfusion.

Oxidative stress measured by F2IP tissue levels demonstrated that euthermic RIPC unexpectedly increased isoprostanes compared to single warm IR, but no differences from controls were observed in this regard. Remote IPC associated with hypothermia resulted in similar F2IP levels compared to those in other interventional protocols and control. Antioxidant enzymes activities defined by CAT and SOD levels also revealed no divergence between RIPC, hypothermia or combined (RIPC + hypothermia) protocols, and controls. Albeit cold protocols induced more antioxidant activity in the SOD analysis, these groups did not differ from controls. This shortage of statistically variation in oxidative stress data probably results from the acute nature of our experiment, with kidneys being collected after only four hours of reperfusion.

Regarding renal function parameters, our study demonstrates that cold protocols (cold IR and RIPC + Cold IR) promote lower serum creatinine levels after IR compared to those in warm protocols. Performing remote preconditioning has a non-statistically significant trend to protect kidneys in warm IR. Nevertheless, the combination of hypothermia and RIPC reduces the benefits of hypothermia alone with no associated synergistic protection.

In summary, our study reveals that RIPC combined with hypothermia did not confer protection against histological, oxidative, or functional changes in kidneys after IR. Additionally, there is no benefit in performing RIPC in this model of experimental surgery.

Despite these results, hypothermia protocols demonstrate better functional outcomes than warm IR.

The main strength of this research is that, to the best of our knowledge, this is a pioneer study on the influence of remote ischemic preconditioning on hypothermia during renal damage from IR. Although we did not achieve positive results in this combination, further studies are necessary to validate these experimental models.

The limitations in our study must be acknowledged. Initially, short-term experiments such as ours could preclude the long-term effects of ischemic preconditioning of IR. Furthermore, we assessed the “early window of protection”, with evidence that “late” protocols (IPC 24-hours before IR) are more efficient in reducing IR damage¹². Moreover, even though the final systemic temperatures were not statistically different, we recognize that many animals from cold protocols had some variation in their temperature, which could contribute to bias. Finally, the drugs used during surgery could interfere with our results, since recent data reveal that isoflurane and tramadol could also produce preconditioning effects and confound our outcomes^{20,27}.

CONCLUSION

No synergistic benefits were found when remote ischemic preconditioning was applied to hypothermia in renal IR. Even though we did not achieve positive results in this study, this is the first research involving protocols of remote preconditioning and hypothermia together. Furthermore, we could demonstrate that hypothermia promotes better functional outcomes than warm protocols.

DECLARATION

The authors declare no conflicts of interest. This study received financial support from Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

REFERENCES

1. Salvadori M, Rosso G, Bertoni E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World Journal of Transplantation*. 2015;5(2):52-67. PMID: 26131407
2. Bulkley GB. Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. *Br. J. Cancer Suppl*. 1987 Jun;8:66-73. PMID: 3307876.
3. Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nature Reviews Nephrology*. 2011 Apr 1;7(4):189-200. PMID: 21364518
4. Schmidt MR, Smerup M, Konstantinov IE, Shimizu M, Li J, Cheung M. Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2007 Apr;292(4):1883-90. PMID: 17172279
5. Ali ZA, Callaghan CJ, Lim E, Ali AA, Nouraei SAR. Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial. *Circulation* 2007; Sep;116(11 suppl):I98-105. PMID: 17846333
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. PMID: 12028463
7. Susantitaphong P, Alfayez M, Cohen-Bucay A, Balk EM, Jaber BL. Therapeutic hypothermia and prevention of acute kidney injury: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Resuscitation*. 2012 Feb;83(2):159-67. PMID: 21983123
8. 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. PMID: 3769170

9. 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. PMID: 9202547
10. 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. PMID: 10468768
11. Przyklenk K, Darling CE, Dickson EW, Whittaker P. Cardioprotection “outside the box”- the evolving paradigm of remote preconditioning. *Basic Res. Cardiol.* 2003;98(3):149-57. PMID: 12883832
12. Wever KE, Menting TP, Rovers M, van der Vliet JÁ, Rongen GA. Ischemic preconditioning in the animal kidney – a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE.* 2012 Feb;7(2):e32296. doi:10.1371/journal.pone.0032296. PMID: 22389693
13. 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
14. 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. PMID: 15155533
15. Santos EBD, Koff WJ, Grezzana Filho T de JM, 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
16. 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. PMID: 7680290

17. Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* 1996; 94(9): 2193-200. PMID: 8901671
18. Ateş E, Genç E, Erkasap N, Erkasap S, Akman S, Firat P, Emre S, Kiper H. Renal protection by brief liver ischemia in rats. *Transplantation*. 2002 Nov 15;74(9):1247-51. PMID: 12451261
19. Wever KE, Warlé MC, Wagener FA, van der Hoorn JW, Masereeuw R, van der Vliet JA, Rongen GA. Remote ischaemic preconditioning by brief hind limb ischaemia protects against renal ischaemia-reperfusion injury: the role of adenosine. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Oct;26(10):3108-17. PMID: 21427077
20. Oliveira RC, Brito MV, Ribeiro RF, Oliveira LO, Monteiro AM, Brandão FM, Cavalcante LC, Gouveia EH, Henriques HY. Influence of remote ischemic conditioning and tramadol hydrochloride on oxidative stress in kidney ischemia/reperfusion injury in rats. *Acta Cir Bras*. 2017 Mar;32(3):229-35. PMID: 28403347
21. Huang J, Chen Y, Dong B, Kong W, Zhang J, Xue W. Effect of remote ischaemic preconditioning on renal protection in patients undergoing laparoscopic partial nephrectomy: a blinded randomized controlled trial. *BJU Int*. 2013 Mar;112(1):74-80. PMID: 23452148
22. MacAllister R, Clayton T, Knight R, Robertson S, Nicholas J, Motwani M, Veighey K. REmote 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. PMID: 26020087

23. Fiorentini MR, Santos EB, Longo L, Kliemann LM, Koff WJ, Corso CO. Analysis of the effects of topical renal hypothermia on lung tissue after kidney ischemia and reperfusion in rats. *Acta Cir. Bras.* 2015 Jul; 30(7):445-51. PMID: 26270135
24. Novick AC. Renal hypothermia: in vivo and ex vivo. *Urol Clin North Am.* 1983 Nov;10(4):637-44. PMID: 6356550
25. Ribeiro GBS, Santos EB, Bona SR, Schaefer PG, Garcez TNA, Rabolini EB, Smaniotto GP, Marroni NAP, Corso CO. The effects of local ischemic preconditioning and topical hypothermia in renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Acta Cir Bras.* 2017 Oct;32(10):816-26. PMID: 29160368
26. Metcalfe PD, Meldrum KK. Sex differences and the role of sex steroids in renal injury. *J Urol.* 2006 Jul;176(1):15-21. PMID: 16753358
27. Menting TP, Ergun M, Bruintjes MH, Wever KE, Lomme RM, van Goor H, Warlé MC. Repeated remote ischemic preconditioning and isoflurane anesthesia in an experimental model of renal ischemia-reperfusion injury. *BMC Anesthesiol.* 2017 Jan 28;17(1):14. PMID: 28129737
28. Tveita T, Johansen K, Lien AH, Myklebust R, Lindal S. Morphologic changes in tubular cells from in situ kidneys following experimental hypothermia and rewarming. *APMIS.* 2005 Jan;113(1):13-20. PMID: 15676010

ARTIGO ORIGINAL REDIGIDO EM LÍNGUA PORTUGUESA**Efeitos do pré-condicionamento isquêmico remoto e hipotermia tópica na lesão renal por isquemia-reperfusão em ratos**

Guilherme Lang Motta¹, Pablo Cambeses Souza² Emanuel Burck dos Santos³, Silvia Regina Bona⁴, Pedro Guilherme Schaefer⁵, Caetano Araújo Torres Lima⁶, Norma Anair Possa Marroni⁷, Carlos Otávio Corso⁸.

¹ Mestrando do Programa de Pós Graduação em Ciências Cirúrgicas , Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Concepção e desenho do estudo; procedimentos técnicos; aquisição, interpretação e análise de dados; elaboração do manuscrito.

² Mestrando do Programa de Pós Graduação em Ciências Cirúrgicas , Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Aquisição e análise de dados; procedimentos técnicos.

³ Departamento de Urologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil. Concepção e desenho do estudo; revisão crítica do manuscrito.

⁴ Departamento de Fisiologia , Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Aquisição e análise de dados; procedimentos técnicos.

⁵ Departamento de Patologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil. Análises histopatológicas; aquisição de dados.

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

⁷ Departamento de Fisiologia , Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁸ Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil;
Serviço de Cirurgia Geral, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

Autor para correspondência: Carlos Otávio Corso, MD, PhD. Serviço de Cirurgia Geral,
Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2350, sala 747, Porto
Alegre, RS, Brasil, CEP 90035-903. Email: corso@portoweb.com.br. Telefone +55
5133598232

RESUMO

Efeitos do pré-condicionamento isquêmico remoto e hipotermia tópica na lesão renal por isquemia-reperfusão em ratos

Introdução: A lesão renal por isquemia-reperfusão (IR) pode ser reduzida através de estratégias, como hipotermia e pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR). A combinação destas sustenta um potencial efeito protetor a ser esclarecido.

Métodos: Trinta e dois ratos Wistar, após nefrectomia direita, foram aleatoriamente selecionados para quatro protocolos cirúrgicos experimentais no rim esquerdo: isquemia quente (grupo 1); isquemia fria (grupo 2); PCIR seguido de isquemia quente (grupo 3); PCIR seguido de isquemia fria (grupo 4). Após 240 minutos de reperfusão da IR, o rim esquerdo foi retirado para análise histopatológica e de estresse oxidativo. O rim direito foi utilizado como grupo controle. Avaliamos, ainda, as diferenças da creatinina plasmática antes e depois do experimento.

Resultados: A combinação de PCIR com hipotermia durante experimento de IR revelou ausência de diferenças comparado aos outros grupos de intervenção na análise do padrão histológico ($p=0.722$). O estresse oxidativo não apresentou variações significativas entre os grupos. Animais submetidos a protocolos de IR sob hipotermia demonstraram menores valores de creatinina sérica ao término dos procedimentos ($p<0.001$).

Conclusão: Associar PCIR com hipotermia local não gera proteção renal na lesão por IR. Hipotermia isolada, entretanto, parece ser efetiva na preservação da função renal durante eventos isquêmicos. Além disso, o PCIR isolado seguido de IR quente não demonstrou

benefícios nos parâmetros avaliados comparado à IR quente sem PCIR ou mesmo grupo controle, sugerindo restrições na análise da janela precoce de proteção.

Palavras-chave: Isquemia, Lesão por Reperusão, Hipotermia Induzida, Radicais Livres, Estresse Oxidativo.

INTRODUÇÃO

Interrupção do fluxo sanguíneo por isquemia leva a uma cascata de eventos culminando em morte celular. Durante o metabolismo anaeróbio do tecido isquêmico ocorre acúmulo de hipoxantina intracelular devido à degradação de trifosfato de adenosina (ATP). A reintrodução do fluxo através da reperfusão paradoxalmente produz dano adicional, fenômeno conhecido como lesão por isquemia-reperfusão (IR)¹. Isso ocorre porque a combinação de oxigênio proveniente da reperfusão tecidual com hipoxantina gera a produção de radicais livres, substâncias nocivas ao ambiente celular^{2,3}. As situações clínicas em que encontramos a IR são diversas, tais como transplantes, circulação extracorpórea e nefrectomias parciais⁴⁻⁶.

Diversas estratégias para redução do dano pela IR vêm sendo desenvolvidas, entre elas o uso de hipotermia, soluções hipertônicas, antioxidantes e, mais recentemente, o pré-condicionamento isquêmico (PCI)⁶. A hipotermia faz parte rotineira da preservação de órgãos transplantados e utilizada frequentemente em cirurgias renais com clampamento arterial, tendo seu papel bem estabelecido na diminuição do estresse oxidativo pela IR⁷. Induzir a produção endógena de antioxidantes através de curtos ciclos de isquemia-reperfusão previamente a uma isquemia prolongada é o que define o PCI, uma das estratégias mais recentes na prevenção de danos por IR⁸⁻¹⁰. A capacidade de executar o PCI em tecidos distantes ao órgão submetido à IR, conhecida por pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR), torna este em uma promissora e prática manobra transoperatória^{11,12}.

Em função do conhecimento atual sobre a hipotermia e PCIR como estratégias isoladas de prevenção de danos pela IR, surge a necessidade de verificar se a associação de ambas possui efeitos protetores sinérgicos. Desta forma, avaliamos o efeito conjunto do PCIR e da

hipotermia na lesão por IR renal através de pioneiro estudo com cirurgia experimental em ratos.

MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (projeto 150471), estando em conformidade com os guias internacionais de boas práticas em pesquisa com animais do National Institutes of Health (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Bethesda, EUA, 2011) e de acordo com os Princípios Internacionais para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais, publicados pelo Conselho de Organizações Internacionais de Ciências Médicas (CIOMS), assim como pela lei brasileira de uso científico dos animais (Lei 11.794/2008).

Animais e Desenho do Estudo

Trinta e dois ratos de sexo masculino da raça Wistar, pesando entre 277 - 447g e idade entre 54 - 66 dias de vida, foram aleatoriamente divididos por randomização simples (sorteio dos animais) em quatro grupos (G1, G2, G3 e G4) de oito animais conforme os protocolos de experimentação cirúrgica aos quais o rim esquerdo foi submetido.

Todos os trinta e dois animais sofreram nefrectomia direita ao início do procedimento, sendo aleatoriamente selecionados oito destes 32 rins direitos para formar o grupo controle (G0). Em G1 induziu-se isquemia do pedículo renal esquerdo por 40 minutos sob eutermia (37°C) seguido de reperfusão por 4 horas, quando então executamos nefrectomia esquerda e eutanásia. No grupo G2 foi realizada isquemia do pedículo renal esquerdo por 40 minutos sob hipotermia renal local (4°C) e eutermia sistêmica seguido de reperfusão por 4 horas sob

eutermia e nefrectomia esquerda. O grupo G3 sofreu PCIR através de clameamento da artéria íliaca esquerda por 15 minutos seguido de reperfusão por 10 minutos, prosseguindo para isquemia do pedículo renal esquerdo por 40 minutos sob eutermia, nova reperfusão durante 4 horas e coleta do rim esquerdo. Grupo G4 submeteu-se a PCIR através de clameamento da artéria íliaca esquerda por 15 minutos seguido de reperfusão por 10 minutos sob eutermia, prosseguindo para isquemia do pedículo renal esquerdo por 40 minutos sob hipotermia renal local (4°C) e reperfusão por 4 horas sob eutermia (Figura 1).

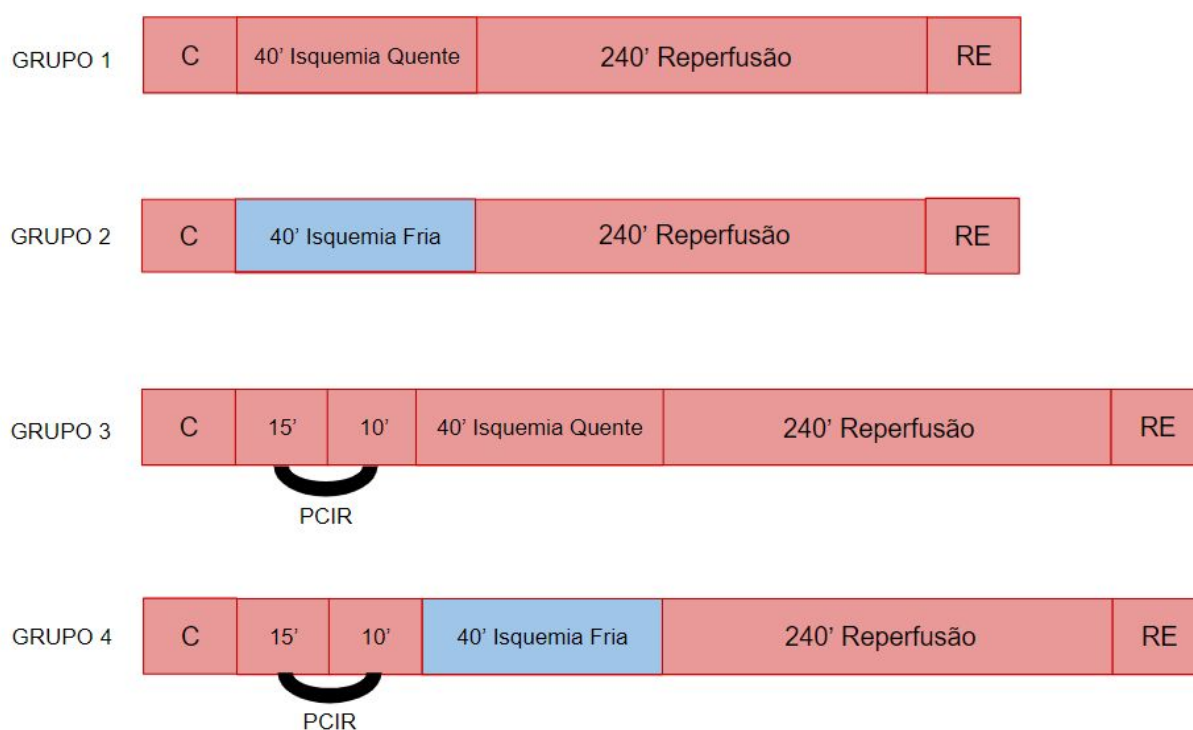


Figura 1 – Protocolos cirúrgicos. “C” indica nefrectomia direita, a qual representa o Controle (Grupo 0). “RE” representa a retirada do rim esquerdo. “PCIR” significa pré-condicionamento isquêmico remoto utilizando 15 minutos de isquemia da artéria íliaca esquerda seguida de 10 minutos de reperfusão.

Realizou-se indução anestésica com isoflurano vaporizado a 3-5% através de campânula. Logo após, os animais foram acomodados em posição supina sobre mesa cirúrgica aquecida. A manutenção da anestesia geral foi realizada através da vaporização do isoflurano a 2-3% sob fluxo de oxigênio a 1L/min, sendo os reflexos da pata traseira direita periodicamente testada a fim de garantir o adequado plano anestésico. A temperatura sistêmica dos animais foi aferida constantemente através de um termômetro eletrônico (Termomed 1.0, Intoterm, Porto Alegre/Brasil) instalado via retal. A temperatura sistêmica foi mantida entre 35,0°C a 37,1°C através do calor produzido por lâmpadas incandescentes.

Após induzir anestesia geral, coletou-se 1mL de sangue através de punção retro-orbital para análise inicial da creatinina sob efeito de colírio anestésico. Procedeu-se, então, para tricotomia abdominal, administração de tramadol 10mg/kg intraperitoneal, injeção de bupivacaína 0,5% 1mg/kg no local de incisão mediana e, finalmente, a laparotomia mediana longitudinal era executada. Nefrectomia total direita foi executada logo após a laparotomia em todos os 32 animais. Metade do rim foi armazenada em formalina 10% para futura análise histopatológica e a outra metade mantida sob temperatura de -80°C para análise dos marcadores de estresse oxidativo.

O rim esquerdo dos animais foi submetido aos quatro protocolos experimentais de nefrectomia mencionados anteriormente. A temperatura local no rim foi mantida sob eutermia nos grupos 1 e 3, já hipotermia renal ocorreu nos grupos 2 e 4 durante a isquemia do pedículo renal. Esta hipotermia local foi realizada através do contato do rim com soro fisiológico 0,9% congelado e picado, mantendo o rim isolado dos demais tecidos através de uma lâmina de látex fenestrada e controlando a sua temperatura em 4°C através de termômetro intraparenquimatoso (BAT 12, IITC Life Science, W. Hills, CA/EUA) instalado no córtex renal.

O PCIR foi induzido nos grupos 3 e 4 através do clameamento da artéria ilíaca comum esquerda sob eutermia por 15 minutos e reperfusão por 10 minutos antes de prosseguir para a IR do rim esquerdo. A isquemia do pedículo renal esquerdo foi realizada em todos os grupos (sob eutermia nos grupos 1 e 3; sob hipotermia nos grupos 2 e 4) através de clameamento do pedículo renal por 40 minutos, seguido de reperfusão sob eutermia por 240 minutos. Utilizou-se clampe microvascular atraumático (Medicon, Tuttlingen/ Alemanha) na execução da isquemia vascular da artéria ilíaca comum esquerda e do pedículo renal esquerdo. Ao término da isquemia renal por 40 minutos, retirou-se o clampe vascular, suturou-se a parede abdominal e o animal foi mantido por 240 minutos desperto sob efeito analgésico (nova dose de tramadol 10mg/kg) e com livre acesso a água em gaiola aquecida.

Ao término deste período de reperfusão, repetia-se o processo anestésico, laparotomia e, então, retirava-se o rim esquerdo. Assim como o rim direito, metade do rim esquerdo foi mantida em formalina 10% para avaliação histopatológica e a outra metade armazenada sob temperatura de -80°C para medida da atividade oxidativa. Ao término do procedimento, prosseguiu-se nova coleta de sangue através de punção cardíaca e eutanásia por cardiectomia.

Análise histopatológica

O tecido renal foi fixado em formalina a 10%, embebido em parafina, cortado em lâminas e corado através dos métodos de ácido periódico de Schiff (PAS) e de hematoxilina e eosina (H&E). A necrose tubular aguda foi medida através da escala descrita por *Jablonski et al* em 5 graus (Figura 2): 0 - ausência de anormalidades; 1 - mitose e necrose em células individuais; 2 - necrose das células adjacentes aos túbulos contorcidos proximais,

preservando os túbulos vizinhos; 3 - necrose restrita ao terço distal dos túbulos contorcidos proximais e uma zona de necrose se estendendo ao córtex interno; 4 - necrose de todos segmentos dos túbulos contorcidos proximais¹³. A análise das lâminas foi executada por um patologista cego em relação ao grupo de experimentação renal.

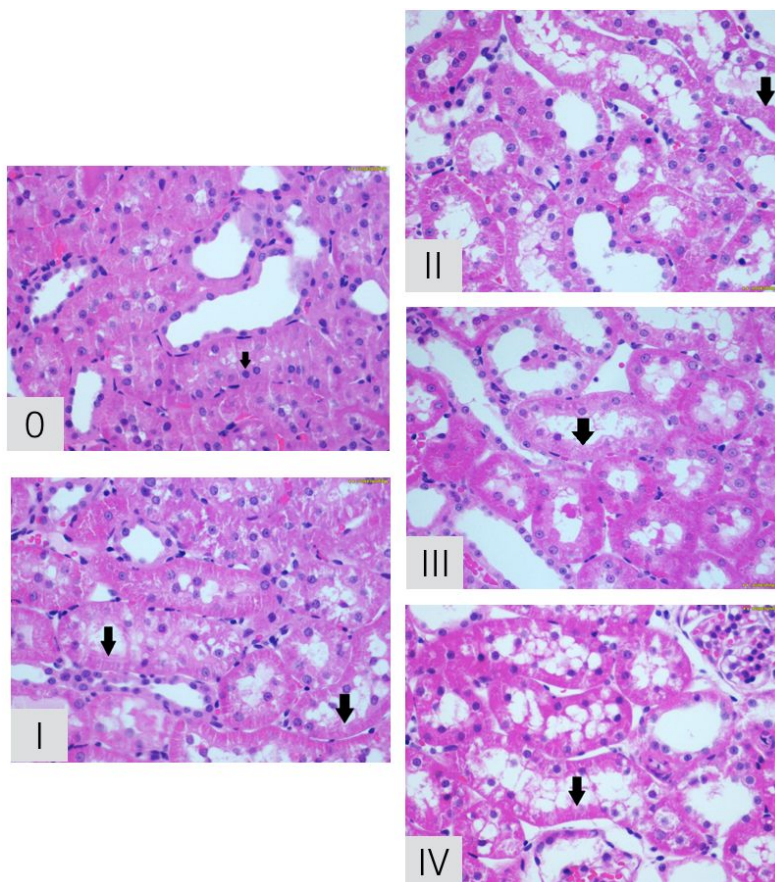


Figura 2 - *Necrose tubular aguda por Jablonski*: **0** - ausência de anormalidades; **I** - mitose e necrose em células individuais; **II** - necrose das células adjacentes aos túbulos contorcidos proximais, preservando os túbulos vizinhos; **III** - necrose restrita ao terço distal dos túbulos contorcidos proximais e uma zona de necrose se estendendo ao córtex interno; **IV** - necrose de todos segmentos dos túbulos contorcidos proximais.

Estresse oxidativo

Os radicais livres são bioquimicamente instáveis in vivo, sendo sua dosagem dispendiosa e de complexa aplicação prática. Desta forma, habitualmente são quantificados derivados da peroxidação lipídica¹⁴. Como medida do estresse oxidativo renal foram quantificados os níveis teciduais de F2-isoprostanos (F2IP), dosagens da atividade de Superóxido Dismutase (SOD) e da atividade da Catalase (CAT).

Para realizar tais análises metade do rim conservado a -80°C sofreu processo de homogeneização por 40 segundos a 4°C na presença de KCl 1,15% (9ml/g de tecido) e fluoreto de fenilmetilsulfonil a uma concentração de 100mM de isopropanol (10µl por ml de KCl) utilizando homogeneizadora Ultra-turrax (IKA Works Inc., Wilmington, DE/Estados Unidos). Este homogeneizado foi então centrifugado em centrífuga refrigerada Sorvall Super T21 (Kendro Laboratory Products, Weaverville, NC / Estados Unidos), sendo o sobrenadante coletado e congelado novamente a -80°C para as análises bioquímicas. O precipitado foi descartado. Além disso, foi necessária a dosagem da concentração de proteínas através do método de Bradford, utilizando albumina bovina padrão e espectrofotometria a 595nm. Esta concentração de proteína é essencial na medida dos níveis das enzimas antioxidantes.

O F2-isoprostano (F2IP) é considerado um confiável marcador tecidual da peroxidação lipídica, apresentando valores muito estáveis e específicos na quantificação do estresse oxidativo¹⁴. Os níveis teciduais de F2IP foram determinados através do kit 8-iso-PGF2α ELISA (ADI-900-010, Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY/ EUA) após a homogeneização do rim.

A medida da atividade da superóxido dismutase (SOD) foi realizada através da inibição da reação do radical superóxido com adrenalina em espectrofotômetro a 480nm.

A quantificação da atividade da catalase (CAT) baseou-se na decomposição do peróxido de hidrogênio em um espectrofotômetro a 240 nm.

Avaliação bioquímica da função renal

Os níveis de creatinina sérica foram determinados através de uma medida basal (1mL de sangue coletado através de punção retro-orbital antes da laparotomia) e outra durante eutanásia (sangue coletado através de punção cardíaca), processados através de analisador modular automático Cobas 8000 série c702.

Análise estatística

A análise dos dados foi realizada aplicando modelo linear generalizado para significância estatística usando o programa SPSS (SPSS Statistics for Windows, Version 21.0, IBM Corp., Armonk, NY / EUA).

Para o grau histológico, por ser uma variável ordinal, os testes de Kruskal-Wallis em conjunto com teste de Dunn foram utilizados. A correção de Bonferroni foi aplicada para as comparações múltiplas entre os grupos. Um valor de P inferior a 0,05 foi considerado significativo. Dados foram expressos como média e erro padrão (EP). Cálculo amostral foi baseado na pesquisa de *Santos et al*¹⁵, utilizando poder de estudo em 80% e considerando nível de significância em 5%.

RESULTADOS

Peso, idade, temperatura sistêmica final e creatinina basal não diferiram entre os grupos de animais (dados não expostos).

Análise histológica identificou todos os graus de necrose tubular aguda, ou seja, graus 0 a 4. Não foi possível vincular de forma específica um grau de lesão a um grupo único de intervenção devido à sobreposição de achados. O grupo controle, entretanto, apresentou apenas lesão grau 0, o qual não foi identificado nos outros grupos estudados. Além disso, dano grau 4 esteve ausente apenas nos grupos controle e 3 (PCIR em temperatura 37°C).

Houve diferença significativa em relação à histologia entre os grupos e controle ($p=0.001$). Grupo controle apresentou lesões de menor grau estatístico em comparação aos demais grupos ($p<0.05$). Entre os grupos experimentais não houve diferenças significativas ($p=0.722$).

Níveis de estresse oxidativo foram avaliados pela medida tecidual de F2IP e revelaram ausência de diferença significativa entre os rins dos grupos controle e experimentais. Comparando exclusivamente os grupos de isquemia quente (Grupos 1 e 3), observamos que aqueles submetidos à PCIR antes da IR quente apresentaram níveis mais elevados de F2IP em relação aos que sofreram IR sem PCIR prévio ($p<0.05$) (Figura 3).

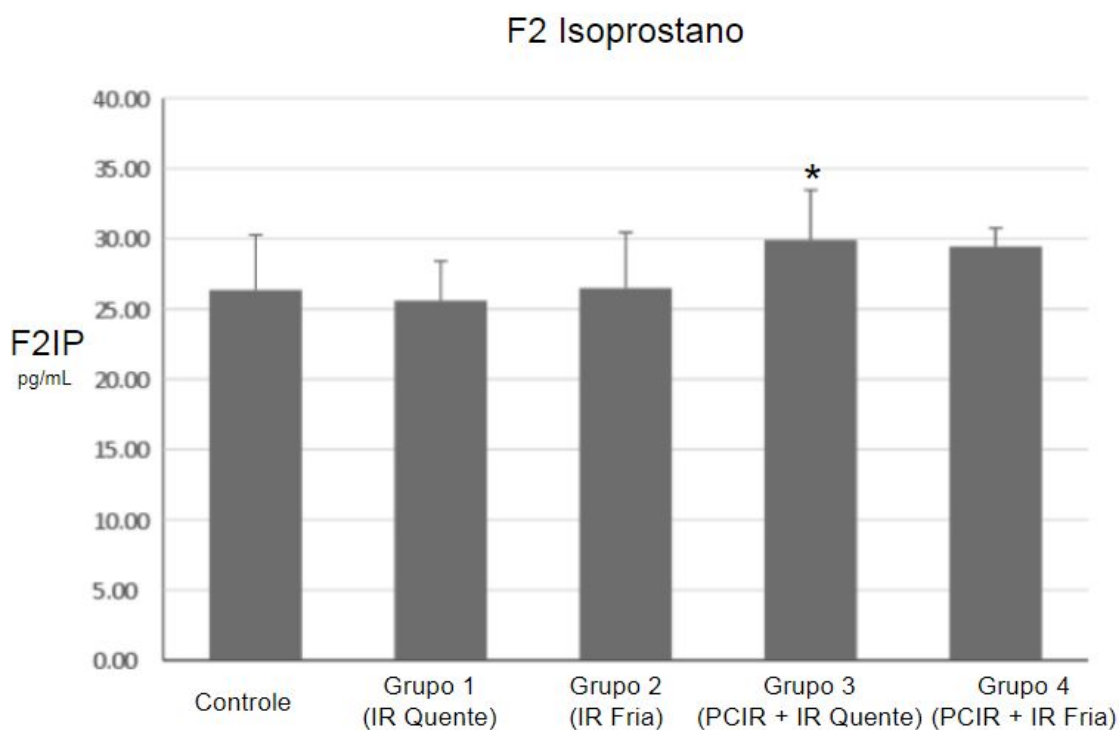


Figura 3 – Comparação entre os níveis de F2-isoprostanos teciduais e grupos. Não há diferença estatística entre os grupos experimentais e controle. * Entre os grupos de isquemia quente, observamos que aqueles submetidos a PCIR antes da IR sob 37°C demonstraram maiores níveis de F2IP em relação ao grupo IR quente sem pre-condicionamento ($p < 0.05$). Dados expressos como média \pm desvio padrão. Modelos lineares generalizados foram aplicados. Correção de Bonferroni foi aplicada para comparação de pares.

Valores de CAT não sofreram variações significativas entre controle e experimentos ($p = 0.736$) (Figura 4). Atividade de SOD apresentou valores mais elevados durante hipotermia (Grupos 2 e 4) comparado à eutermia sem PCIR (Grupo 1) ($p < 0.05$), entretanto não houve diferença entre os grupos experimentais e controle ($p = 0.736$) (Figura 5).

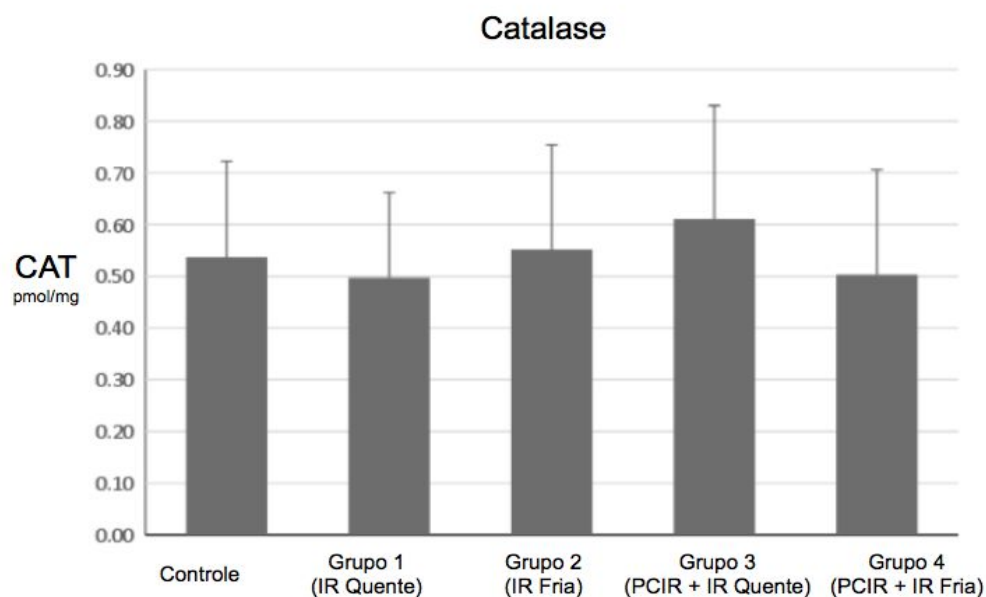


Figura 4 – Análise da atividade da CAT entre os grupos. Níveis de CAT não apresentaram diferença significativa entre controle e grupos intervenção ($p=0.736$). Dados expressos como média \pm desvio padrão. Modelos lineares generalizados foram aplicados. Correção de Bonferroni foi aplicada para comparação de pares.

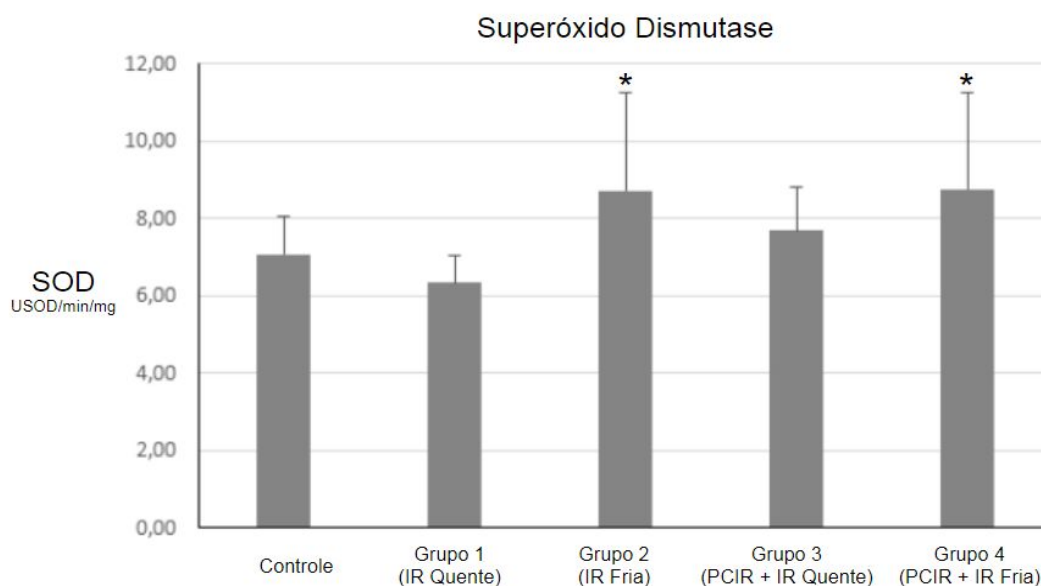


Figura 5 – Avaliação de atividade da SOD entre os grupos. * SOD apresentou níveis mais elevados na hipotermia (Grupos 2 e 4) comparado a eutermia sem PCIR (Grupo 1) ($p<0.05$),

entretanto não houve diferença estatística entre os grupos experimentais e controle. Dados expressos como média \pm desvio padrão. Modelos lineares generalizados foram aplicados. Correção de Bonferroni foi aplicada para comparação de pares.

Análise bioquímica da função renal ao final do procedimento revelou níveis inferiores de creatinina sérica nos animais sob hipotermia (Grupos 2 e 4) comparado aos experimentos sob eutermia (Grupos 1 e 3) ($p < 0.001$) (Tabela 1).

	GRUPO 1 (IR Quente)	GRUPO 2 (IR Fria)	GRUPO 3 (PCIR + IR Quente)	GRUPO 4 (PCIR + IR Fria)	Valor P
Creatinina Basal (mg/dL)	0,35 \pm 0,06	0,32 \pm 0,10	0,34 \pm 0,06	0,32 \pm 0,06	0,735
Creatinina Final (mg/dL)	1,72 \pm 0,26 ^a	0,98 \pm 0,17 ^b	1,67 \pm 0,41 ^a	1,28 \pm 0,36 ^b	<0,001

Tabela 1 – Níveis de creatinina. Observe que a creatinina basal não difere, entretanto ao término dos experimentos identificamos valores inferiores de creatinina nos animais submetidos a hipotermia ($p < 0.001$). Letras semelhantes (**a,b**) não possuem diferença significativa através da correção de Bonferroni a 5%.

DISCUSSÃO

O pré-condicionamento isquêmico (PCI), manobra em que curtos períodos de isquemia e reperfusão precedem uma prolongada isquemia e reperfusão subsequente, promove um estímulo condicionante no órgão alvo (pré-condicionamento local, PCIL) ou em tecidos a

distância (pré-condicionamento remoto, PCIR). Esta é uma estratégia eficaz na diminuição de lesão pelo processo de isquemia e reperfusão tecidual^{4,6,8}.

A primeira descrição de análise dos efeitos do pré-condicionamento foi com o pioneiro estudo de *Murry et al* no ano de 1986, quando os efeitos do PCIL no miocárdio canino foram avaliados⁸. Desde então diversos estudos envolvendo diferentes animais, órgãos, tecidos e protocolos de PCI passaram a ser descritos.

Os efeitos do pré-condicionamento no tecido renal foram descritos, inicialmente, no ano de 1997, quando *Islam et al* executaram PCIL em rins de ratos. O uso de protocolos de PCIL baseado em experimentos envolvendo miocárdio trouxe resultados desencorajadores, entretanto este estudo observou que o período de isquemia renal deveria ser superior a 20 minutos quando há intenção de promover lesão renal, sendo 40 minutos ideal para este fim⁹.

Apenas no ano de 2002, *Torras et al* executaram complexo estudo utilizando diferentes variações de PCI em rins de ratos, chegando às bases atuais dos protocolos de preconditionamento. Nessa ocasião foi evidenciado que um PCIL se mostrava mais nefroprotetor se realizado com apenas um ciclo de 15 min de isquemia seguido de reperfusão por 10 min antes de subsequente prolongada IR. Devido à semelhança com nosso estudo, este foi o protocolo utilizado durante nossos experimentos⁶.

Uma alternativa de PCI é o pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR). Definido como curtos ciclos de isquemia-reperfusão em um tecido distante de outro o qual sofrerá um ciclo prolongado de IR. O conceito de PCIR surgiu em 1993 através do estudo em caninos de *Przyklenk et al*, quando se observou que induzir curtos ciclos de IR em um território vascular coronariano causou proteção miocárdica de outro território vascular durante subsequente IR cardíaca¹⁶. Em 1996 *Gho et al* expandiram o potencial do PCIR ao reportar benefício de

curtos ciclos de isquemia arterial mesentérica previamente à IR miocárdica, validando a hipótese de que tecidos utilizados para PCI não necessitam ser do mesmo órgão sob IR¹⁷.

O primeiro estudo envolvendo PCIR e nefroproteção ocorreu em 2002, quando *Ates et al* realizaram um curto ciclo de isquemia e reperfusão hepática previamente a uma sustentada isquemia renal em ratos. Os animais submetidos a este protocolo apresentaram melhores parâmetros renais bioquímicos e histopatológicos quando comparados aos ratos que foram submetidos exclusivamente à IR isolada sem PCI¹⁸.

Wever et al foram pioneiros ao estudar IR renal associando PCIR através de torniquetes nos membros posteriores de ratos no ano de 2011, de forma semelhante ao nosso estudo. Na ocasião, diferentes protocolos de PCIR foram testados, ocorrendo nefroproteção em todos grupos quando comparados com a IR sem PCIR. Interessante mencionar que houve uma superioridade dos protocolos bilaterais sobre os unilaterais, além disso, os protocolos de ciclos fracionados demonstraram resultados discretamente melhores comparando com o ciclo único¹⁹.

Um dos estudos mais relevantes sobre PCI renal é uma meta-análise do ano de 2012, a qual analisou 58 trabalhos experimentais, comparando diversos protocolos e variáveis. Neste artigo cinco estudos incluídos analisaram o PCIR e os dados revelam equivalência dos benefícios entre pré-condicionamento isquêmico local e remoto¹².

O mecanismo de proteção do PCI ainda não está esclarecido apesar dos diversos estudos realizados. Acredita-se que exista uma produção endógena de antioxidantes, reduzindo o estresse oxidativo intracelular. Sabe-se, ainda, que neste processo está envolvida a produção de autacóides (entre elas: adenosina, opióides, endotelina e bradicinina), visto que tais substâncias estão elevadas neste processo^{5,18-21}.

O potencial de gerar benefícios sem submeter o órgão alvo a múltiplas isquemias e reduzir as complicações vasculares locais (ex. trombose arterial) encorajou o processo de aplicação clínica do PCIR. Seu uso tem sido descrito com resultados animadores na preservação da função renal em procedimentos cirúrgicos associados a IR renal, como por exemplo: clampeamento aórtico, circulação extracorpórea, transplante renal e nefrectomia parcial^{5,21,22}.

O uso de hipotermia causa redução do metabolismo celular, sendo outra estratégia na diminuição dos danos teciduais pelo processo de IR. O estresse oxidativo renal é inferior no rim sob baixas temperaturas comparado com seus pares eutérmicos quando realizada IR¹⁵. O benefício da hipotermia local no tecido renal varia conforme a temperatura, como demonstrado por *Santos et al* em estudo que evidenciou que a temperatura de 4 graus *Celsius* leva a uma menor atividade oxidativa no tecido renal submetido a IR em ratos da raça Wistar quando comparado a outros graus de hipotermia¹⁵. *Fiorentini et al* identificou, ainda, que a execução de hipotermia local durante IR no rim é capaz de reduzir os níveis de atividade inflamatória em órgãos remotos não envolvidos na IR, tais como o pulmão, revelando os benefícios sistêmicos que o resfriamento local possui²³. Outras variáveis influenciam nos efeitos da hipotermia em órgãos, entre elas a solução de preservação dos tecidos e as formas de perfusão. Existem diversos meios de preservação de órgãos para transplante e, ao comparar as mais utilizadas, observamos que a solução *Universidade de Wisconsin* promove maior sobrevida dos enxertos renais quando comparada à solução de *Euro-Collins*²⁴.

Apesar dos diversos estudos avaliando condicionamento isquêmico, não existem pesquisas combinando o PCIR e hipotermia para identificar se há um efeito protetor sinérgico ao aplicar estas duas modalidades de proteção contra os efeitos da IR prolongada em tecido renal. A associação entre condicionamento local e hipotermia transoperatória

foi investigada por *Ribeiro et al*, quando realizou-se PCIL com e sem resfriamento local rins de ratos submetidos a IR. Os dados não demonstraram efeito sinérgico do PCIL concomitante à hipotermia na proteção da lesão renal por IR. O modelo empregado de PCIL não resultou em benefícios, pelo contrário, revelou-se redutor dos efeitos benéficos do resfriamento²⁵.

Considerando o potencial benéfico e a praticidade do condicionamento remoto e da hipotermia, desempenhamos o presente estudo para identificar se ocorre uma combinação dos seus efeitos nas lesões por IR após 40 minutos de isquemia sob diferentes temperaturas. Realizamos um experimento de curto prazo (4h de reperfusão) utilizando como desfechos as alterações histopatológicas, a atividade do estresse oxidativo e as medidas bioquímicas de função renal.

Em nosso estudo, optamos pelo uso de animais do sexo masculino para manter a amostra mais homogênea possível. Além disso, existem evidências de uma maior susceptibilidade deste gênero para lesão renal por IR. Acredita-se que o estrogênio tenha um potencial protetor nos tecidos renais sob isquemia, fato que deve ser melhor esclarecido futuramente²⁶.

Seguimos um protocolo de anestesia e preparo preoperatório igual em todos os animais, pois sabemos que muitas substâncias administradas podem realizar proteção ou danos nos tecidos sob isquemia e reperfusão. O tramadol, analgésico opiáceo utilizado em nosso experimento, foi recentemente associado a influenciar no condicionamento isquêmico, segundo estudo de *Oliveira et al*. Neste trabalho foi demonstrado que o tramadol reduz os danos de IR renal quando usado isoladamente e em conjunto de um PCIR. Entretanto, não houve um efeito sinérgico positivo entre PCIR e tramadol visto que realizar um PCIR sem administrar tramadol se mostrou mais eficaz em reduzir dano renal por IR do que quando combinados²⁰. Outro fármaco utilizado em nosso estudo e que possui influência no processo

de IR é o anestésico inalatório isoflurano, existindo evidências de efeitos condicionantes do próprio medicamento²⁷. Estas informações devem ser consideradas ao interpretar os resultados de nosso estudo, podendo ser considerado um viés de confusão nos resultados.

Analisando as mudanças histopatológicas, observamos que não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais, inclusive ao comparar isoladamente IR quente com o protocolo de hipotermia ou de PCIR. Entretanto, identificamos diferença estatística dos experimentos com os rins do grupo controle, o que significa que este modelo experimental de cirurgia é capaz de induzir danos.

Ausência de benefícios com PCI já foi reportado em uma das maiores meta-análises sobre pré-condicionamento isquêmico experimental, quando 12 de 26 estudos incluídos não foram capazes de demonstrar vantagem em realizar PCI na proteção histológica¹². Nesta relevante pesquisa, os autores analisaram 205 controles e 191 animais submetidos a diferentes protocolos de pré-condicionamento (incluindo PCI local e remoto) anteriormente a uma IR e avaliação histopatológica. Identificou-se proteção significativa global pelo PCI no dano tecidual, porém há uma grande tendência de considerar estes resultados devido a uma janela de proteção tardia, ou seja, estes resultados são mais evidentes quando os rins são coletados após 24 horas de pré-condicionamento. Além disso, os próprios autores citam que existe uma heterogeneidade de 63% entre os estudos analisados. Em nosso estudo, as nefrectomias esquerdas ocorreram 240 minutos após o PCI, considerando, portanto, uma janela de proteção precoce, o que poderia justificar nossa ausência de diferenças entre os protocolos experimentais.

Apesar das variadas evidências indicando vantagens na utilização de hipotermia durante IR, a ausência de proteção ou, até mesmo, os danos histológicos devido a baixas temperaturas também são mencionados na literatura^{15,28}. Em um modelo experimental similar de isquemia-reperfusão, Santos *et al* não evidenciaram que a hipotermia reduziu

significativamente lesão histológica em IR de curto-prazo¹⁵. Ademais, outro estudo comparando transformações estruturais em rins de ratos expostos a hipotermia única demonstrou que os órgãos submetidos a hipotermia seguida de eutermia produziram maiores alterações tubulares do que aqueles que se mantiveram sob hipotermia contínua²⁸. Nosso estudo utiliza um protocolo de curto-prazo com rins que sofrem hipotermia e subsequente aumento de sua temperatura até o momento da coleta e, desta forma, não identificamos diferenças histológicas após IR sob hipotermia. A combinação de PCIR e hipotermia não foi benéfica ou, tampouco, prejudicial ao tecido renal, comparado a IR isolada.

O estresse oxidativo medido pelos níveis teciduais de F2IP demonstrou que o PCIR eutérmico aumentou inesperadamente os isoprostanos em comparação com o IR quente isolado, porém não houve diferenças com o controle. O pré-condicionamento isquêmico remoto associado à hipotermia resultou em níveis de F2IP semelhantes em comparação com os outros protocolos experimentais e controle

As atividades das enzimas antioxidantes definidas pelos níveis de CAT e SOD também não revelaram divergências com o controle ou os grupos intervencionais. Embora os protocolos envolvendo hipotermia induzam maiores atividades antioxidantes na análise de SOD, esses grupos não diferiram do controle. Esta escassez de diferenças estatísticas nos dados de estresse oxidativo provavelmente resulta da natureza aguda do nosso experimento, em que os rins são coletados apenas quatro horas após reperfusão

Em relação aos parâmetros de função renal, nosso estudo demonstra que os protocolos frios (IR sob hipotermia e RIPC + IR sob hipotermia) promovem níveis inferiores de creatinina sérica após IR em comparação com protocolos de IR sob eutermia. A realização do pré-condicionamento remoto tem uma tendência não estatisticamente significativa em proteger os animais submetidos a IR quente. No entanto, a combinação de hipotermia e

PCIR reduz os benefícios da hipotermia isolada e não há proteção sinérgica nesta associação.

Em resumo, nosso estudo revela que o pré-condicionamento isquêmico remoto combinado com hipotermia não conferiu proteção em alterações histológicas, oxidativas ou funcionais nos rins após IR. Além disso, não há benefício na realização de pré-condicionamento isquêmico remoto neste modelo de cirurgia experimental. Apesar disso, os protocolos de hipotermia demonstram melhores resultados funcionais em comparação com IR quente.

A principal validade desta pesquisa é que, até onde sabemos, este é o estudo pioneiro em avaliar se o pré-condicionamento isquêmico remoto influencia a hipotermia durante o dano renal por IR. Embora não tenhamos resultados positivos nesta combinação, estudos negativos são necessários para expor o verdadeiro comportamento dos modelos experimentais.

As limitações do nosso estudo devem ser declaradas. Inicialmente, experiências de curto prazo, como a nossa, poderiam impedir os efeitos em longo prazo do pré-condicionamento isquêmico. Além disso, avaliamos a "janela inicial de proteção" e há evidências de que os protocolos "tardios" (PCI 24 horas antes do IR) são mais eficientes na redução do dano IR¹². Ademais, mesmo que as temperaturas sistêmicas finais não fossem estatisticamente diferentes, reconhecemos que muitos dos animais submetidos a protocolos de hipotermia apresentaram muitas variações transitórias em sua temperatura durante o procedimento, o que poderia ser um fator de confusão. Finalmente, as drogas utilizadas durante as cirurgias podem interferir em nossos resultados, já que dados recentes revelam que isoflurano e tramadol também podem produzir efeitos de pré-condicionamento e interferir em nossos resultados^{20,27}.

CONCLUSÃO

Não foram encontrados associação sinérgica positiva quando o pré-condicionamento isquêmico remoto foi associado à hipotermia na IR renal. Apesar de não demonstrar resultados positivos, este é o primeiro estudo envolvendo protocolos de pré-condicionamento remoto e hipotermia juntos. Além disso, identificamos em nossa pesquisa que a hipotermia promove melhores resultados funcionais do que protocolos sob temperaturas quentes.

DECLARAÇÃO

Os autores declaram não existir conflitos de interesse. Este estudo recebeu suporte financeiro do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO

1. Salvadori M, Rosso G, Bertoni E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World Journal of Transplantation*. 2015;5(2):52-67. PMID: 26131407
2. Bulkley GB. Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. *Br. J. Cancer Suppl*. 1987 Jun;8:66-73. PMID: 3307876.
3. Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nature Reviews Nephrology*. 2011 Apr 1;7(4):189-200. PMID: 21364518
4. Schmidt MR, Smerup M, Konstantinov IE, Shimizu M, Li J, Cheung M. Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2007 Apr;292(4):1883-90. PMID: 17172279
5. Ali ZA, Callaghan CJ, Lim E, Ali AA, Nouraei SAR. Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial. *Circulation* 2007; Sep;116(11 suppl):I98-105. PMID: 17846333
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. PMID: 12028463
7. Susantitaphong P, Alfayez M, Cohen-Bucay A, Balk EM, Jaber BL. Therapeutic hypothermia and prevention of acute kidney injury: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Resuscitation*. 2012 Feb;83(2):159-67. PMID: 21983123
8. 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. PMID: 3769170

9. 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. PMID: 9202547
10. 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. PMID: 10468768
11. Przyklenk K, Darling CE, Dickson EW, Whittaker P. Cardioprotection “outside the box”- the evolving paradigm of remote preconditioning. *Basic Res. Cardiol*. 2003;98(3):149-57. PMID: 12883832
12. Wever KE, Menting TP, Rovers M, van der Vliet JÁ, Rongen GA. Ischemic preconditioning in the animal kidney – a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*. 2012 Feb;7(2):e32296. doi:10.1371/journal.pone.0032296. PMID: 22389693
13. 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
14. 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. PMID: 15155533
15. Santos EBD, Koff WJ, Grezzana Filho T de JM, 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
16. 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. PMID: 7680290

17. Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* 1996; 94(9): 2193-200. PMID: 8901671
18. Ateş E, Genç E, Erkasap N, Erkasap S, Akman S, Firat P, Emre S, Kiper H. Renal protection by brief liver ischemia in rats. *Transplantation*. 2002 Nov 15;74(9):1247-51. PMID: 12451261
19. Wever KE, Warlé MC, Wagener FA, van der Hoorn JW, Masereeuw R, van der Vliet JA, Rongen GA. Remote ischaemic preconditioning by brief hind limb ischaemia protects against renal ischaemia-reperfusion injury: the role of adenosine. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Oct;26(10):3108-17. PMID: 21427077
20. Oliveira RC, Brito MV, Ribeiro RF, Oliveira LO, Monteiro AM, Brandão FM, Cavalcante LC, Gouveia EH, Henriques HY. Influence of remote ischemic conditioning and tramadol hydrochloride on oxidative stress in kidney ischemia/reperfusion injury in rats. *Acta Cir Bras*. 2017 Mar;32(3):229-35. PMID: 28403347
21. Huang J, Chen Y, Dong B, Kong W, Zhang J, Xue W. Effect of remote ischaemic preconditioning on renal protection in patients undergoing laparoscopic partial nephrectomy: a blinded randomized controlled trial. *BJU Int*. 2013 Mar;112(1):74-80. PMID: 23452148
22. MacAllister R, Clayton T, Knight R, Robertson S, Nicholas J, Motwani M, Veighey K. REmote 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. PMID: 26020087

23. Fiorentini MR, Santos EB, Longo L, Kliemann LM, Koff WJ, Corso CO. Analysis of the effects of topical renal hypothermia on lung tissue after kidney ischemia and reperfusion in rats. *Acta Cir. Bras.* 2015 Jul; 30(7):445-51. PMID: 26270135
24. Novick AC. Renal hypothermia: in vivo and ex vivo. *Urol Clin North Am.* 1983 Nov;10(4):637-44. PMID: 6356550
25. Ribeiro GBS, Santos EB, Bona SR, Schaefer PG, Garcez TNA, Rabolini EB, Smaniotto GP, Marroni NAP, Corso CO. The effects of local ischemic preconditioning and topical hypothermia in renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Acta Cir Bras.* 2017 Oct;32(10):816-26. PMID: 29160368
26. Metcalfe PD, Meldrum KK. Sex differences and the role of sex steroids in renal injury. *J Urol.* 2006 Jul;176(1):15-21. PMID: 16753358
27. Menting TP, Ergun M, Bruintjes MH, Wever KE, Lomme RM, van Goor H, Warlé MC. Repeated remote ischemic preconditioning and isoflurane anesthesia in an experimental model of renal ischemia-reperfusion injury. *BMC Anesthesiol.* 2017 Jan 28;17(1):14. PMID: 28129737
28. Tveita T, Johansen K, Lien AH, Myklebust R, Lindal S. Morphologic changes in tubular cells from in situ kidneys following experimental hypothermia and rewarming. *APMIS.* 2005 Jan;113(1):13-20. PMID: 15676010