

ÍNDICE

RESUMO	2
ABSTRACT	4
INTRODUÇÃO	6
Fisiopatologia da lesão de isquemia-reperfusão	7
Hidroxietilamidos	8
MATERIAIS E MÉTODOS	9
Modelo murino de IR hepática	10
Determinação das concentrações séricas de creatinina, ureia e ALT	11
Análise histopatológica das amostras renais.....	11
Análise Estatística	12
RESULTADOS	13
Marcadores séricos de lesão renal: creatinina e ureia	13
Análise histopatológica renal.....	16
DISCUSSÃO	19
Limitações deste trabalho	22
CONCLUSÕES	22
BIBLIOGRAFIA	24
AGRADECIMENTOS	30

LESÃO RENAL AGUDA EM MODELO MURINO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO HEPÁTICA SOB EXPANSÃO DE VOLUME PLASMÁTICO

Oliveira-Santos M^(a), Catré D^(c), Cabrita A^(a), Lopes MF^(a,b)

(a) Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

(b) Hospital Pediátrico do Centro Hospitalar de Coimbra

(c) Departamento de Anestesiologia do Hospital de São Teotónio

RESUMO

Introdução: As manobras de controlo vascular hepático utilizadas durante cirurgia do fígado estão normalmente associadas a lesão de isquemia-reperfusão devido à interrupção temporária da perfusão do órgão. Doze a setenta por cento dos doentes submetidos a transplantação hepática têm disfunção renal aguda, possivelmente devido a lesão de isquemia-reperfusão hepática, entre outros factores. O modelo murino tem sido amplamente utilizado para estudo desta lesão. As soluções de colóides sintéticos de hidroxietilamidos têm propriedades anti-inflamatórias e melhoram a microcirculação. Os hidroxietilamidos de terceira geração, nomeadamente o hidroxietilamido 130/0,4, têm melhor perfil de segurança que moléculas anteriores.

Objectivos: Avaliação da lesão renal em modelo murino de lesão de isquemia-reperfusão hepática parcial normotérmica. Em segundo lugar, pretendeu-se testar o efeito do hidroxietilamido 130/0,4 nessa lesão.

Métodos: O estudo decorreu de acordo com a legislação em vigor sobre experimentação animal. Distribuíram-se aleatoriamente 48 ratos Wistar do sexo masculino por quatro grupos de características idênticas ($n=12 \times 4$). Em dois deles, os grupos de isquemia-reperfusão, colocou-se um clamp microvascular no pedículo vascular dos lobos hepáticos esquerdo e mediano, induzindo isquemia parcial (70%), e removeu-se o clamp 60 minutos depois (grupo

IR+HEA, com administração de hidroxietilamido durante a reperfusão e grupo IR, sem fluidoterapia). Os restantes grupos, de controlo, foram operados e tratados segundo o mesmo protocolo, mas sem indução de isquemia (grupos *sham*+HEA e *sham*). Após 120 minutos de reperfusão nos grupos de isquemia-reperfusão e 180 minutos de cirurgia nos grupos de controlo colheu-se sangue da artéria aorta para doseamento de creatinina, ureia e alanina aminotransferase e retiraram-se amostras renais e hepáticas para análise histopatológica (*score*).

Resultados: Como já publicado pelo nosso grupo, o modelo de lesão de isquemia-reperfusão hepática parcial normotérmica foi eficaz na produção de lesão hepática. No presente trabalho, o grupo IR teve concentrações médias de creatinina e ureia superiores ao grupo *sham*, além de um *score* histopatológico mais alto ($p\text{-value}<0.05$). Comparando os grupos IR+HEA e IR, o primeiro teve creatininémia (23.50 ± 10.53 vs 38.15 ± 7.08 $\mu\text{mol/L}$; $p=0.002$ – resultados em média \pm desvio-padrão) e uremia (8.45 ± 1.55 vs 11.00 ± 1.60 mmol/L ; $p=0.002$) significativamente inferiores, bem como um *score* histopatológico mais reduzido.

Conclusões: O modelo de lesão de isquemia-reperfusão hepática parcial normotérmica foi eficaz na produção de lesão renal. Adicionalmente, o hidroxietilamido 130/0.4 mostrou um efeito protector na lesão renal neste contexto. São necessários novos estudos para testar as implicações clínicas da administração de hidroxietilamido 130/0,4 em cirurgia hepática.

ABSTRACT

Background: Hepatic vascular control techniques employed during liver surgery are usually associated with ischemic-reperfusion injury due to temporary interruption of the organ's blood flow. Twelve to seventy percent of patients who undergo hepatic transplantation develop acute renal dysfunction, possibly because of hepatic ischemic-reperfusion injury, among other factors. The murine model has been extensively used in the study of this injury. The synthetic colloid hydroxyethyl starch solutions show both anti-inflammatory properties and improvement in microcirculation. Third generation hydroxyethyl starches, namely hydroxyethyl starch 130/0,4, show a better safety profile than previous molecules.

Objectives: Evaluation of renal injury in a murine model of partial normothermic hepatic ischemic-reperfusion injury. Secondly, we aim to test the effect of hydroxyethyl starch 130/0,4 on kidney injury.

Methods: The study was conducted according to legislation on animal experimentation. Forty-eight male Wistar rats were randomized into four groups with identical characteristics ($n=12 \times 4$). In two of them, the ischemic-reperfusion injury groups, we placed a microvascular clamp in the vascular pedicle of the median and left liver lobes, inducing hepatic ischemia (70%), and removed the clamp 60 minutes later (IRI+HES group, with HES administration during reperfusion and IRI group, without fluid therapy). The remaining groups (controls) were *sham*-operated without hepatic ischemia and treated likewise (*sham*+HES and *sham* groups). After 120 minutes of reperfusion in the ischemic-reperfusion injury groups and 180 minutes in the controls we drew blood from the aorta artery for creatinine, urea and alanine aminotransferase quantification and removed kidney and liver samples for histopathological analysis (*score*).

Results: As already published by our group, the partial normothermic hepatic ischemic-reperfusion injury model was effective in producing liver injury. In the present work, we found that the IRI group had higher creatinine and urea concentrations than *sham*, in combination with a superior severity *score* (p -value<0.05). When comparing IRI+HES and IRI groups, the former had significantly lower creatinine (23.50 ± 10.53 vs 38.15 ± 7.08 $\mu\text{mol/L}$; $p=0.002$ – results in means \pm standard deviation) and urea (8.45 ± 1.55 vs 11.00 ± 1.60 mmol/L ; $p=0.002$) concentrations, as well as a lower histopathological *score*.

Conclusion: The partial normothermic hepatic ischemic-reperfusion injury murine model was effective in producing kidney injury. Moreover, hydroxyethyl starch 130/0,4 showed a protective effect against renal lesion in this context. Further studies are necessary to test clinical implications of hydroxyethyl starch 130/0,4 administration in liver surgery.

Palavras-chave:

Isquemia-reperfusão, hidroxietilamido, isquemia hepática parcial, modelo murino, lesão renal.

INTRODUÇÃO

A hemorragia per-operatória é uma complicação frequente no decorrer de cirurgia hepática, nomeadamente na hepatectomia, no transplante e na cirurgia de trauma, estando associada a um aumento da morbidade e mortalidade pós-operatória.¹ Esta é a base racional da utilização de manobras de controlo vascular hepático, que podem envolver oclusão da circulação aferente, por exemplo a manobra de Pringle², como oclusão aferente e eferente (ex: exclusão vascular hepática total).³ Estas técnicas associam-se contudo a lesão de isquemia-reperfusão (IR) hepática. Esta lesão foi descrita em 1975⁴ e consiste numa reacção inflamatória aguda resultante da interrupção temporária do aporte sanguíneo do órgão, em que se verifica um fenómeno de exacerbação do dano isquémico pela reperfusão tecidual que se segue.

A associação entre doença hepática e renal é bem conhecida. A disfunção renal aguda surge em 40 a 85% dos doentes com insuficiência hepática aguda⁵ e em 12 a 70% dos submetidos a transplantação hepática.⁶ No último caso o dano renal estará relacionado com a lesão de IR hepática, indutora de agressão sistémica⁷, em conjugação com outros factores agressores, como complicações per-operatórias (instabilidade hemodinâmica), sépsis, fenómenos de rejeição e utilização de fármacos nefrotóxicos.⁵

O modelo murino tem sido utilizado para estudo do dano renal no contexto de lesão de IR hepática.⁷⁻¹² Existe evidência de associação entre a disfunção renal (tanto morfológica como funcional) no decorrer da reperfusão e aumento da endotoxínemia, peroxidação lipídica e enzimas lisossómicas no plasma.⁸ Mais recentemente tem-se considerado que a activação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, a produção de mediadores inflamatórios e a apoptose das células endoteliais renais são determinantes na agressão renal, que por sua vez é proporcional à gravidade da lesão hepática.⁹

Fisiopatologia da lesão de isquemia-reperfusão

A lesão de IR hepática processa-se em duas etapas: fase inicial (até duas horas pós-reperfusão), em que predomina o stress oxidativo com origem nas células de Kupffer activadas e fase final (mais de seis horas após perfusão), essencialmente dependente da acção de neutrófilos.¹³ De um modo geral existe dano celular dos hepatócitos e das células endoteliais sinusoidais associado a falência microcirculatória, por desequilíbrio entre factores vasoconstritores e vasodilatadores.¹⁴ A morte celular surge por apoptose ou necrose.¹⁵

Os protagonistas da lesão de IR hepática podem dividir-se em factores celulares (células de Kupffer, neutrófilos, linfócitos e plaquetas) e mediadores (citocinas, espécies reactivas de oxigénio - ROS, sistema do complemento, cálcio).¹⁴ De entre os primeiros, destaca-se a activação das células de Kupffer durante os estádios iniciais da lesão, responsáveis pela produção de ROS e mediadores pró e anti-inflamatórios.¹⁶ Os neutrófilos produzem lesão pela libertação de proteases e de ROS.¹⁷

As citocinas desempenham um papel fulcral no início, manutenção e modelação da gravidade da inflamação.¹⁸ As mais estudadas são o factor de necrose tumoral alfa (TNF α), responsável tanto por morte celular como por regeneração¹⁵, interleucinas pró-inflamatórias (IL-1 e IL-6) e quimiocinas com poder de atracção leucocitária (ex: IL-8). As moléculas de adesão celular (selectinas, integrinas e moléculas de adesão intercelular) promovem a interacção entre leucócitos e células endoteliais, que é essencial para o recrutamento, migração e extravasamento dos glóbulos brancos.¹⁹

Durante a lesão de IR hepática as ROS (O₂⁻, OH⁻, óxido nítrico (NO)) têm origem não só nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e células de Kupffer mas também a nível mitocondrial, oxidação da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) e da hipoxantina (sistema xantina oxidase), induzindo dano celular directo e expressão de genes pró-inflamatórios.²⁰ O

sistema do complemento, ubíquo na resposta inflamatória, está associado à lesão de IR²¹, assim como o cálcio, dado o seu papel na activação de fosfolipases, nucleases e proteases.²²

O metabolismo anaeróbio da célula isquémica leva à conversão sucessiva de adenosina trifosfato (ATP) em adenosina. Estudos demonstram que o último composto confere protecção contra a isquemia pela inibição da activação de neutrófilos e da produção de ROS, aumentando a concentração de NO.²³

Na verdade, existe evidência de um papel protector do NO, possivelmente por melhorar a microcirculação, contrapondo o papel vasoconstritor da endotelina, com efeito negativo para a lesão de IR.¹⁵

O insulto isquémico e o stress oxidativo levam à reprogramação da expressão genética do hepatócito com finalidade protectora; um dos factores de transcrição mais estudados é o factor nuclear kappa B (NF-κB). A actividade do NF-κB aumenta durante o período isquémico, induzindo a produção de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão celular, sintetase de NO induzível e ROS. Embora a acção inicial seja pró-inflamatória, após nove a doze horas de reperfusão o NF-κB tem efeito anti-inflamatório.¹⁴

Hidroxietilamidos

Os hidroxietilamidos (HEA) são soluções de colóides sintéticos utilizados como expansores de volume em grande cirurgia. Os diferentes tipos de HEA têm características farmacocinéticas distintas; diferenciam-se essencialmente pelo peso molecular médio, grau de substituição molar (MS) e rácio C₂/C₆.²⁴

Um dos HEA de terceira geração, o HEA 130/0,4, tem um MS baixo (0,4). As propriedades farmacocinéticas destes HEA (entre elas a diminuição do grau de MS) estão na origem de

uma degradação mais rápida assegurando um melhor perfil de segurança. Em particular, alguns efeitos secundários descritos com a administração dos HEA anteriores não se verificam em estudos clínicos com o HEA 130/0,4, como é o caso da coagulopatia e da disfunção renal.²⁴

Adicionalmente, existe evidência de que os HEA de nova geração têm efeitos benéficos na microcirculação e na oxigenação dos tecidos²⁵ bem como efeito anti-inflamatório, inibindo a adesão de neutrófilos²⁶ e reduzindo a concentração e expressão de IL-6 e IL-8²⁷, moléculas de adesão celular²⁸ e molécula de adesão P-selectina.²⁹ Verificou-se em modelo animal que a utilização dos HEA diminui a activação de NF- κ B nos leucócitos mono e polimorfonucleares, a concentração de TNF α , a quimioatração e o sequestro orgânico de neutrófilos.³⁰

Hipótese: A administração do HEA 130/0,4 atenua a lesão renal em modelo murino de IR hepática parcial normotérmica.

Objectivo: Pretendeu-se como objectivo principal avaliar a lesão renal em modelo murino na sequência da lesão de IR hepática parcial normotérmica. O objectivo secundário consistiu na investigação do efeito da administração de HEA 130/0,4 no decurso da mesma lesão.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, em concordância com a legislação europeia e com as recomendações do National Institutes of Health “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council, Washington: National Academy Press, 1996), e pela Divisão de Bem-Estar Animal da Direcção Geral de Veterinária. Os ratos Wistar do sexo masculino eram descendentes de

animais adquiridos ao Laboratório Charles-River, Barcelona. Pesavam 309.090 ± 28.188 g (média \pm desvio padrão).

Os 48 ratos foram divididos em quatro grupos ($n=12$, cada). Dois grupos foram submetidos a IR hepática: o grupo IR+HEA em que se administrou o expansor de volume HEA 130/0,4 no momento da reperfusão e o grupo IR, sem aplicação de expansor de volume. Os outros dois grupos, utilizados como controlo, foram manipulados cirurgicamente mas sem indução de IR hepática: grupo *sham*+HEA em que se injectou o HEA130/0,4 e o grupo *sham*, sem administração de colóide.

A duração da isquemia nos grupos IR+HEA e IR foi de 60 minutos. Após 120 minutos de reperfusão nos grupos de IR e 180 minutos de cirurgia nos grupos *sham* foi colhido sangue da artéria aorta para determinação das concentrações séricas de alanina aminotransferase (ALT), creatinina e ureia, e foram extraídas amostras de rim e fígado para análise histopatológica. De seguida os ratos foram sacrificados por exsanguinação.

Modelo murino de IR hepática

Os procedimentos cirúrgicos foram efectuados sob anestesia com ketamina (115 mg/Kg) e clorpromazina (3,5 mg/Kg), administrados por via intramuscular, em ventilação espontânea. A temperatura central foi mantida a 37°C de forma constante por aquecimento com lâmpada. Utilizou-se um modelo de isquemia hepática normotérmica parcial a 70%.³¹⁻³³

Nos grupos IR+HEA e IR, após laparotomia mediana e secção do ligamento falciforme mobilizou-se o fígado, procedeu-se à exposição do pedículo vascular hepático e clampou-se a tríade hepática distalmente à bifurcação com recurso a um clamp microvascular (TKL-2) (Biover AG, Hergiswil, Switzerland), de modo a interromper selectivamente a circulação dos

lobos mediano e esquerdo. Este método de isquemia hepática parcial preserva a circulação dos lobos direito e caudado, pelo que evita a congestão venosa mesentérica que se verifica em modelos de isquemia total por insuficiência de anastomoses porto-sistémicas no rato. A alteração da coloração hepática dos segmentos isquémicos comprovou o bom posicionamento do clamp. Imediatamente antes e durante a reperfusão (60 minutos) injectou-se ao grupo IR+HEA na veia femoral esquerda previamente preparada a solução de HEA 130/0,4 na dose de 13 ml/Kg, administrando inicialmente um bólus de 1 mL seguida de perfusão intravenosa lenta do volume restante ao ritmo de 2 mL/min. Ao grupo IR não foi administrado expansor do plasma.

Os grupos *sham* e *sham*+HEA foram submetidos ao mesmo tipo de cirurgia, com dissecação, mas sem clampagem do pedículo hepático. Ao grupo *sham*+HEA foi injectada a solução de HEA130/0,4, como supra descrito no grupo IR+HEA.

Determinação das concentrações séricas de creatinina, ureia e ALT

As amostras sanguíneas foram centrifugadas para separação do plasma, com posterior preservação a -20°C até determinação da concentração de creatinina, ureia e ALT, utilizando química seca. A análise foi feita em analisador automático para bioquímica (Autoanalisador Vitros 250, Johnson & Johnson[®]). Os valores das concentrações de creatinina, ureia e ALT foram expressos em µmol/L, mmol/L e UI/L, respectivamente.

Análise histopatológica das amostras renais

Os rins foram fixados em formol tamponado a 10%, desidratados e embebidos em parafina. Coraram-se cortes de 5µm com hematoxilina-eosina (HE) ou ácido periódico de Schiff (PAS).

Para avaliação do grau de lesão túbulo-intersticial as lâminas de tecido renal foram examinadas de forma cega (origem das amostras desconhecida). Foram especificamente pesquisados os seguintes sinais de lesão túbulo-intersticial: perda da bordadura em escova, edema intersticial, dilatação tubular, lesão do epitélio tubular, formação de cilindros e detritos celulares.³⁴ As lesões foram graduadas semi-quantitativamente numa escala de 0 a 4, utilizando o sistema de classificação referenciado noutros estudos³⁵, sendo 0: rim normal; 1: lesão mínima (<5% de envolvimento); 2: lesão ligeira (5% a 25%); 3: lesão moderada (>25% a 75%); 4: lesão grave (>75%). Foram observados 10 campos da cortical e medular externa, (aleatoriamente distribuídos) por rim em ampliação $\times 40$.

Análise Estatística

Os dados foram analisados com recurso ao *software* PASW Statistics 18 (SPSS, Inc., Chicago, IL, 251 USA). A normalidade das distribuições das variáveis escalares em estudo foi analisada pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk.

A comparação das médias das variáveis escalares (creatinina e ureia) foi realizada com o teste de análise de variâncias (ANOVA one-way) seguido do teste de Tukey *post hoc* para comparação múltipla de médias dos diferentes grupos de tratamento. Para o estudo da variável ordinal *score* histopatológico utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para a comparação múltipla das médias das ordens, duas-a-duas (Marôco³⁶). O teste de Dunn inclui o cálculo do *p-value* segundo a correcção de Bonferroni.

O nível de significância utilizado foi 0.05, rejeitando-se a hipótese nula quando $p < 0.05$. As amostras obtidas foram descritas graficamente através de diagramas de extremos e quartis, em

que o primeiro quartil representa o percentil 25, o segundo quartil o percentil 50 (mediana) e o terceiro quartil o percentil 75.

RESULTADOS

Nos grupos de estudo não se encontraram diferenças estatisticamente significativas no peso médio dos ratos. A mortalidade foi nula. Como já publicado pelo nosso grupo de trabalho³⁷, o modelo de IR hepática foi eficaz na produção de lesão neste órgão, como demonstrado pelo aumento estatisticamente significativo dos marcadores de lesão hepática (ALT e análise histológica) no grupo IR quando comparado com o grupo *sham*. Adicionalmente, a comparação dos mesmos marcadores entre os grupos IR+HEA e IR revelou efeito protector do HEA 130/0,4 na lesão de IR hepática.

Marcadores séricos de lesão renal: creatinina e ureia

Os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk confirmaram a normalidade da distribuição das variáveis creatinina e ureia. Os testes de ANOVA one-way rejeitaram H_0 (a distribuição dos valores da variável é idêntica nos diferentes grupos), revelando que pelo menos um dos grupos exibiu concentrações diferentes de creatinina ($p=0.002$) e ureia ($p=0.000$).

As médias dos valores da creatininemia e uremia nos quatro grupos de estudo estão registadas na tabela I. As concentrações de creatinina e de ureia séricas foram inferiores no grupo *sham* em comparação com o grupo IR como se pode inferir da análise descritiva presente nas figuras 1 e 2. A diferença entre as médias destes dois grupos revelou-se, como demonstrado

na tabela II, estatisticamente significativa. Comparando os grupos *sham* e *sham*+HEA não se verificaram diferenças em termos médios na creatininemia nem na uremia.

Os marcadores de lesão renal foram inferiores no grupo IR+HEA (23.50 $\mu\text{mol/L}$ de creatinina e 8.45 mmol/L de ureia) relativamente ao grupo IR (38.15 $\mu\text{mol/L}$ de creatinina e 11.00 mmol/L de ureia) (tabela I), apresentando esta diferença significado estatístico (tabela II).

Tabela I – Valores dos marcadores séricos de lesão renal.

Grupos	Creatinina ($\mu\text{mol/L}$)			Ureia (mmol/L)		
	Média	DP	Mín;máx	Média	DP	Mín;máx
IR	38.15	7.08	13.30;88.60	11.00	1.60	9.60;13.20
IR+HEA	23.50	10.53	11.70;32.10	8.45	1.55	6.10;10.40
<i>sham</i>	26.80	11.65	16.50;41.40	7.40	2.03	5.80;15.80
<i>sham</i> +HEA	27.55	10.58	15.40;34.00	9.45	3.05	7.30;11.90

DP- desvio padrão.

Tabela II – Comparação múltipla das médias das variáveis, duas-a-duas, pelo teste de Tuckey *post hoc* (creatinina e ureia) e teste de Dunn (*score* histopatológico)*.

Grupos	Creatinina		Ureia		Score Histopatológico	
	Dif	<i>p</i>	Dif	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i> _{aj}
IR IR+HEA	16.933	.002	2.867	.002	.074	.445
IR <i>sham</i>	11.983	.043	3.100	.001	.000	.000
IR <i>sham</i> +HEA	13.333	.020	1.692	.110	.001	.003
IR+HEA <i>sham</i> +HEA	-3.600	.844	-1.175	.384	.097	.582
IR+HEA <i>sham</i>	-4.950	.674	.233	.989	.017	.104
<i>sham</i> +HEA <i>sham</i>	-1.35	.990	1.408	.231	.471	1.000

Dif – diferença média entre os grupos; *p*_{aj} – *p-value* ajustado segundo a correcção de Bonferroni. *As comparações com diferença significativa estão assinaladas a cinzento.

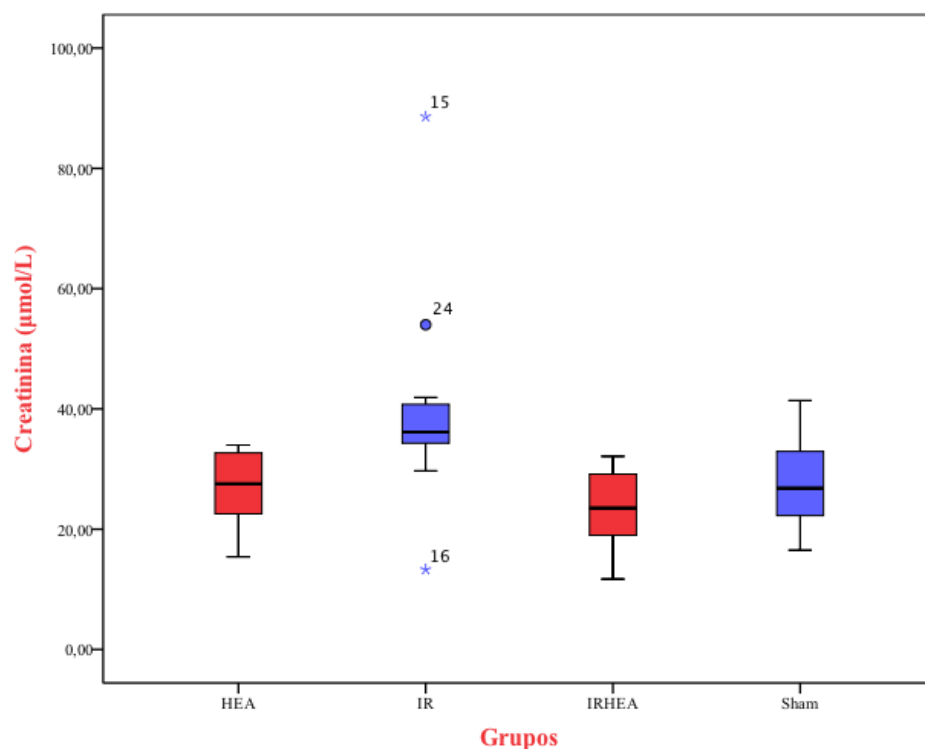


Figura 1 – Níveis de creatinina nos diferentes grupos. Os grupos representados a vermelho foram tratados com HEA.

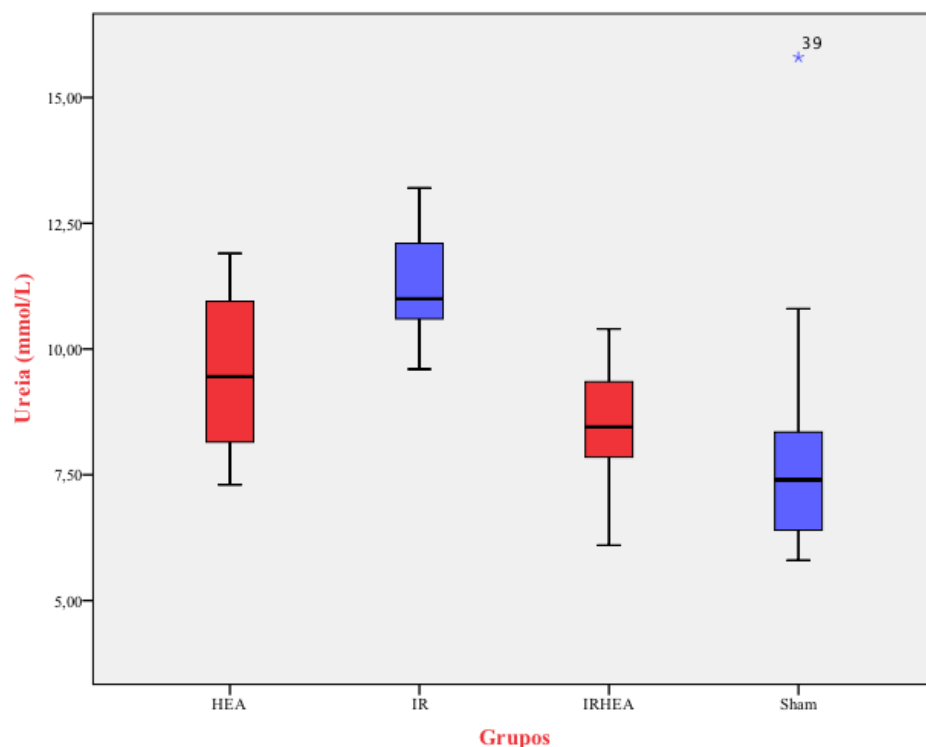


Figura 2 - Níveis séricos de ureia nos diferentes grupos. Os grupos representados a vermelho foram tratados com HEA.

Análise histopatológica renal

O *score* histopatológico revelou menor gravidade de lesões renais nos grupos *sham* e *sham*+HEA quando comparado com o grupo IR, com significado estatístico (figura 4 e tabela II).

Já na comparação entre grupos *sham* e *sham*+HEA não se detectaram diferenças significativas (tabela II). As lesões histológicas renais observadas nos ratos destes dois grupos foram pouco extensas e incluíram com maior frequência perda parcial da bordadura em escova das células do epitélio tubular e necrose isolada de células epiteliais (figura 3 – (A) e (B)).

No grupo IR, com *score* histopatológico de maior gravidade, observou-se além da perda generalizada da bordadura em escova, dilatação tubular, desagregação da arquitectura epitelial

e necrose celular confluyente (figura 3 – (C) e (D)). Ocasionalmente foram observados “moldes tubulares”.

No grupo IR+HEA observaram-se as mesmas lesões que no grupo IR mas menos pronunciadas quer em gravidade quer em extensão (figura 3 – (E) e (F)). Essa diferença não foi contudo significativa (tabela II).

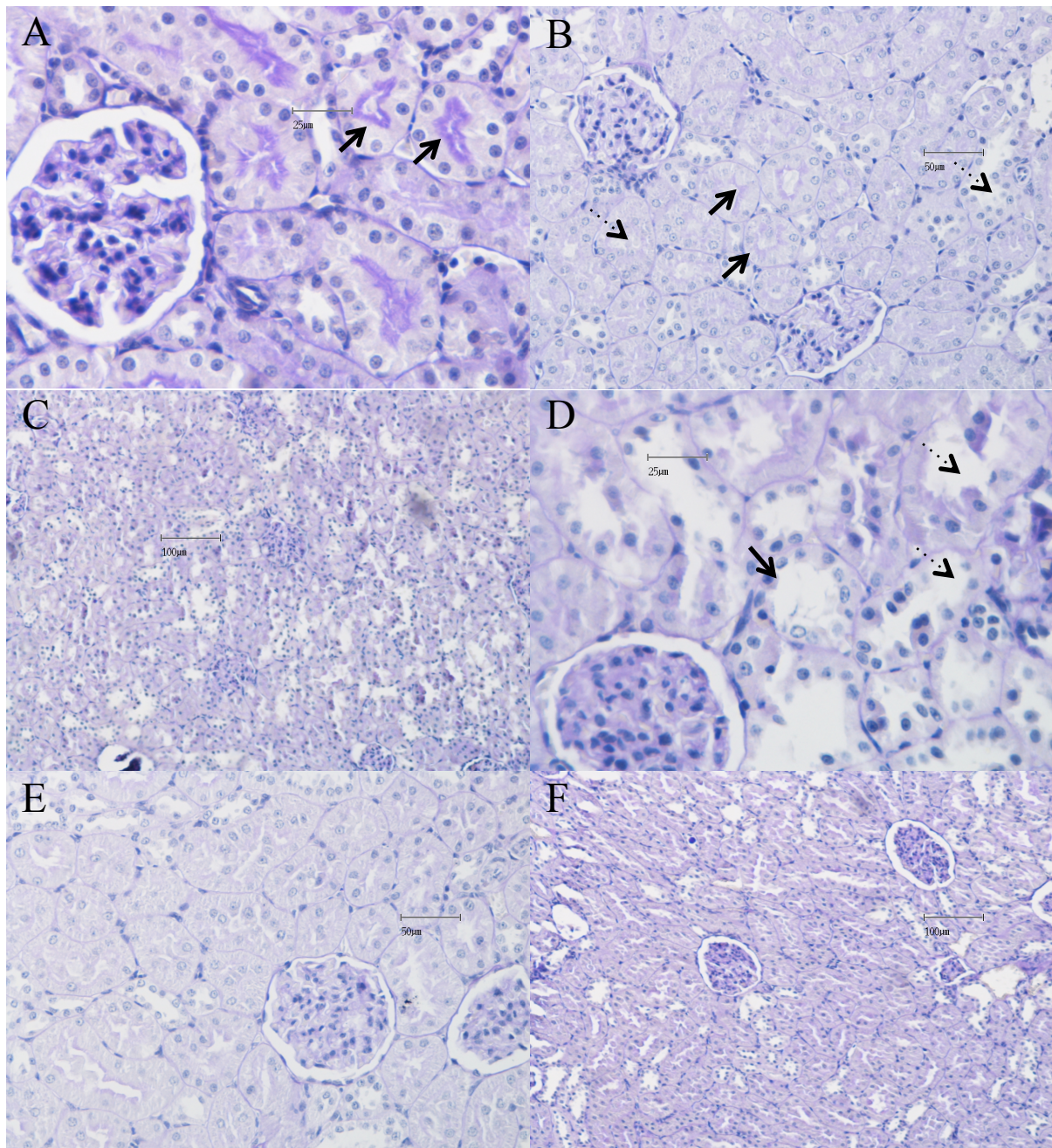


Figura 3 – Resultados histomorfológicos: fotomicrografias das amostras renais coradas com PAS. (A) – Imagem do grupo *sham* ($\times 40$) onde se visualiza a bordadura em escova dos túbulos contornados proximais (setas). (B) – Grupo *sham*+HEA ($\times 20$), observando-se arquitectura conservada com perda parcial da bordadura em escova (setas) e necrose de células epiteliais (cabeças de seta). (C) – Arquitectura celular desorganizada numa amostra do grupo IR ($\times 10$). (D) – Pormenor de uma lâmina do grupo IR ($\times 40$), com perda generalizada da bordadura em escova, dilatação tubular (seta), desagregação da arquitectura epitelial (cabeças de seta) e necrose celular confluyente. Fotomicrografias do grupo IR+HEA, em (E) e (F), com ampliação $\times 20$ e $\times 10$ respectivamente, em que se observam lesões menos marcadas comparativamente ao grupo IR.

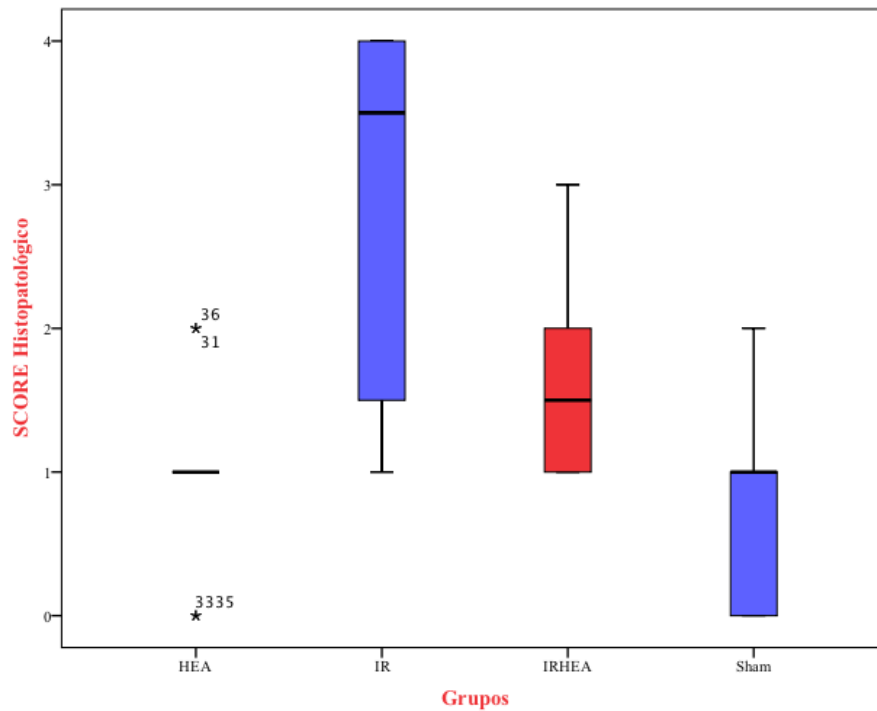


Figura 4 – *Score* histopatológico nos quatro grupos do estudo, visualizando-se os *scores* superiores obtidos no grupo IR comparativamente aos grupos IR+HEA e *sham*.

DISCUSSÃO

Este trabalho demonstra que o modelo de IR hepática parcial normotérmica é eficaz na produção de lesão renal, verificando-se atenuação da mesma sob expansão de volume com HEA 130/0,4. Conforme já publicado pelo nosso grupo, verificou-se que o modelo apresenta lesões hepáticas.³⁷

Publicações anteriores já demonstraram a existência de lesão renal em ratos submetidos a isquemia hepática parcial (70%) seguida de reperfusão.^{9-11,38,39} Nestes trabalhos a lesão renal foi objectivada por elevação de marcadores bioquímicos, visualização de alterações histológicas como necrose, edema e vacuolização de células tubulares, dilatação e atrofia tubular, existência de “moldes tubulares”, infiltração neutrofilica e aumento da permeabilidade vascular, entre outros.

O modelo de isquemia hepática parcial evita a congestão esplâncnica associada à isquemia hepática total, com a vantagem de ser tecnicamente simples.³³ No entanto, há evidência de assimetria do fluxo sanguíneo hepático durante a reperfusão, sendo superior nos lobos não isquémicos pela menor resistência vascular neste território.^{40,41} Consequentemente, alguns autores optam por outras abordagens, como a hepatectomia dos lobos não isquémicos prévia à reperfusão⁸ e a isquemia hepática total com shunt portossistémico.⁴² No nosso trabalho optámos pela isquemia hepática parcial dada a simplicidade técnica, boa reprodutibilidade e os resultados satisfatórios previamente obtidos.^{9-11,38,39}

Os nossos resultados permitem concluir que o grupo IR apresentou lesões renais, comprovadas pelas concentrações de creatinina e ureia e *score* histopatológico significativamente superiores no modelo IR em comparação com o *sham*. Estes resultados são concordantes com os da literatura^{7-12,38-42}, nomeadamente no que se refere ao tipo de lesões microscópicas observadas: perda generalizada da bordadura em escova, dilatação e necrose

tubular, desagregação da arquitectura epitelial e “moldes tubulares”. Estes dados reforçam o papel importante da lesão de IR hepática no desenvolvimento de disfunção renal.

A análise dos marcadores de disfunção renal não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos *sham* e *sham*+HEA, o que mostra que no nosso modelo o HEA 130/0,4 não lesou o rim.

Dado o princípio dos efeitos benéficos dos HEA em grandes cirurgias, por apresentarem propriedades anti-inflamatórias e melhoria na microcirculação, bem como dados actuais da melhoria do perfil de segurança destes expansores de volume de terceira geração²⁴ e ainda a evidência de efeito protector em modelos animais de IR cerebral⁴³ e muscular⁴⁴, colocámos a hipótese de que estes colóides atenuam a lesão multissistémica de IR hepática.

O nosso grupo concluiu previamente³⁷ que o HEA 130/0,4 tem efeito protector na lesão do fígado no modelo de IR hepática. Nesse trabalho verificou-se uma maior atenuação da lesão hepática no grupo em que se administrou HEA em comparação com grupo de controlo em que foi aplicado soro fisiológico hipertónico. Assim, concluiu-se que o efeito protector decorre provavelmente das propriedades moleculares do HEA, parecendo a propriedade de expansor de volume menos relevante.

Os resultados do presente estudo sugerem efeito protector do HEA 130/0,4 na lesão renal por IR hepática. Identificaram-se níveis de creatinina e ureia significativamente inferiores no grupo tratado com HEA (IR+HEA) relativamente ao grupo IR. A avaliação histopatológica também mostrou atenuação das lesões no grupo IR+HEA comparativamente ao grupo IR, embora a análise estatística não revelasse diferença significativa entre os mesmos grupos, provavelmente devido a dimensão amostral reduzida.

A causa do efeito protector dos HEA na lesão de IR hepática não está estabelecida. Especula-se que estará relacionada com a diminuição da inflamação, facto este que se encontra na base fisiopatológica do fenómeno de IR, através de interferência com factores celulares (inibição da activação, adesão e sequestro de neutrófilos) e mediadores (inibição de citocinas e moléculas de adesão celular).^{26,27,30}

Estudos recentes sugerem um efeito protector do HEA 130/0,4 na função renal, nomeadamente num modelo ovino de choque endotoxémico⁴⁵ e em transplantação renal em humanos.⁴⁶ No entanto ainda existe controvérsia sobre os alegados efeitos benéficos.²⁴ Uma revisão sistematizada recente menciona efeitos deletérios renais dos HEA em comparação com outros fármacos utilizados em fluidoterapia para ressuscitação, especialmente em doentes sépticos.⁴⁷

A disfunção renal em cirurgia do fígado tem implicações na morbilidade e mortalidade pós-operatória, tendo-se vindo a constatar um papel importante do fenómeno de IR hepática na génese desta lesão. Mais recentemente Park e colaboradores^{38,39} constataram que a lesão renal decorrente da IR hepática em modelo experimental potencia a própria lesão hepática. Os autores afirmam que a protecção renal reduz o dano hepático independentemente da lesão de IR hepática primária. Esta investigação reforça a importância do controlo da disfunção renal no contexto da lesão multissistémica decorrente de IR hepática.

A constatação de protecção renal pela administração de HEA 130/0,4 em cirurgia hepática, baseada nos resultados experimentais aqui registados, deve ser replicada em estudos clínicos.

Limitações deste trabalho

Uma dimensão amostral superior poderia ter conferido significado estatístico à diferença entre os *scores* histopatológicos de IR e IR+HEA (tabela II). Neste contexto o alargamento da dimensão da amostra seria de considerar, no entanto o número de ratos sacrificados deve ser o menor possível desde que se obtenha resultados passíveis de conclusão.

Em segundo lugar, a especificidade dos métodos de avaliação de disfunção renal é relativamente baixa. Actualmente são utilizados outros procedimentos para este efeito, como o doseamento de marcadores inflamatórios (ex: TNF α , moléculas de adesão celular) e de stress oxidativo, cálculo da *clearance* da creatinina, detecção da apoptose de células renais, visualização do citoesqueleto de actina e infiltração neutrofílica, avaliação da permeabilidade vascular, entre outros.^{9,12} No entanto, este trabalho analisou parâmetros classicamente associados à função renal (concentração de creatinina e ureia séricas) em combinação com exame histopatológico objectivado pelo cálculo de um *score*. Exames mais específicos e dispendiosos seriam necessários no caso de se pretender estudar a fisiopatologia da lesão ou se na avaliação inicial não se obtivessem resultados positivos. No nosso caso, dado que os marcadores empregues foram adequados para que os resultados apresentassem robustez nas conclusões da investigação, outras análises mais específicas poderão ser dispensadas.

CONCLUSÕES

Este trabalho de investigação experimental permitiu concluir que o modelo murino de IR hepática parcial normotérmica é eficaz na produção de lesão renal e que a administração do expansor de volume de terceira geração HEA 130/0,4 atenua a lesão renal neste contexto. Este

trabalho permite acrescentar o papel protector do HEA 130/0,4 na lesão renal por lesão de IR hepática e replica resultados já conhecidos de disfunção renal em modelos de IR hepática.

Estas conclusões abrem expectativas em relação ao benefício da utilização do HEA 130/0,4 em cirurgia hepática para prevenção da disfunção renal, hipótese que deve ser testada clinicamente.

BIBLIOGRAFIA

1. Sitzmann JV, Greene PS. Perioperative predictors of morbidity following hepatic resection for neoplasm: a multivariate analysis of a single surgeon experience with 105 patients. *Ann Surg* 1994;219:13-17.
2. Pringle JH. Notes on the arrest of hepatic haemorrhage due to trauma. *Ann Surg* 1909;48:541-549.
3. Smyrnotis V, Farantos C, Kostopanagiotou G, Arkadopoulos N. Vascular control during Hepatectomy: Review of Methods and Results. *World Journal of Surgery* 2005;29:1384-1396.
4. Toledo-Pereyra LH, Simmons RL, Najarian JS. Protection of the ischemic liver by donor pretreatment before transplantation. *Am J Surgery* 1975;129:513-517.
5. Betrosian AP, Agarwal B, Douzinas EE. Acute renal dysfunction in liver diseases. *World J Gastroenterol* 2007;13:5552–5559.
6. Chuang FR, Lin CC, Wang PH, Cheng YF, Hsu KT, Chen YS, Lee CH, Chen CL. Acute renal failure after cadaveric related liver transplantation. *Transplant Proc* 2004;36:2328–2330.
7. Jiang H, Meng F, Li W, Tong L, Qiao H, Sun X. Splenectomy ameliorates acute multiple organ damage induced by liver warm ischemia reperfusion in rats. *Surgery* 2007 Jan;141(1):32-40.
8. Kudo Y, Egashira T, Takayama F, Yamanaka Y, Shimada T. Investigation of the renal injury caused by liver ischemia-reperfusion in rats. *Arch Toxicol* 1993;67:502–509.
9. Lee HT, Park SW, Kim M, D'Agati VD. Acute kidney injury after hepatic ischemia and reperfusion injury in mice. *Lab Invest* 2009;89:196–208.

10. Behrends M, Hirose R, Park YH, Tan V, Dang K, Xu F, Park SH, Niemann CU. Remote renal injury following partial hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *J Gastrointest Surg* 2008;12:490–495.
11. Park SW, Chen SW, Kim M, D'Agati VD, Lee HT. Human activated protein C attenuates both hepatic and renal injury caused by hepatic ischemia and reperfusion injury in mice. *Kidney Int* 2009;76(7):739-50.
12. Polat C, Tokyol C, Kahraman A, Sabuncuoglu B, Yilmaz S. The effects of desferrioxamine and quercetin on hepatic ischemia-reperfusion induced renal disturbance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006;74:379–383.
13. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory Mechanisms and Therapeutic Strategies for Warm Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury. *Hepatology* 2000;32(2):169-73.
14. Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Piña E, Geller DA. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 2008;147(1):153-9.
15. Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18(8):891-902.
16. Cutrn JC, Perrelli MG, Cavalieri B, Peralta C, Rosell Catafau J, Poli G. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1200–8.
17. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2002;105:248–58.

18. Fong Y, Moldawer LL, Shires GT, Lowry SF. The biologic characteristics of cytokines and their implication in surgical injury. *Surg Gynecol Obstet* 1990;170:363–78.
19. Pober JS. Warner-Lambert/Parke-Davis award lecture. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. *Physiology and pathology Am J Pathol* 1988;133:426–33.
20. Ildefonso JA, Arias-Díaz J. Pathophysiology of liver ischemia-reperfusion injury. *Cir Esp* 2010;87(4):202-9.
21. Qin X, Gao B. The complement system in liver diseases. *Cell Mol Immunol* 2006;3:333–40.
22. Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh DB, Miller D, Butterfield A. The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury. *Ann Surg* 1991;213:137–42.
23. Ward PA, Cunningham TW, McCulloch KK, Johnson KJ. Regulatory effects of adenosine and adenine nucleotides on oxygen radical responses of neutrophils. *Lab Invest* 1988;58:438–47.
24. Westphal M, James MF, Kozek-Langenecker S, Stocker R, Guidet B, Van Aken H. Hydroxyethyl starches: different products—different effects. *Anesthesiology* 2009;111:187-202.
25. Lang K, Boldt J, Suttner S, Haisch G. Colloids versus crystalloids and tissue oxygen tension in patients undergoing major abdominal surgery. *Anesth Analg* 2001;93:405–9.
26. Nohé B, Johannes T, Reutershan J, Rothmund A, Haerberle H, Ploppa A, Schroeder T, Dieterich H-J. Synthetic colloids attenuate leukocyte-endothelial interactions by inhibition of integrin function. *Anesthesiology* 2005;103:759–67.

27. Lang K, Suttner S, Boldt J, Kumle B, Nagel D. Volume replacement with HES 130/0.4 may reduce the inflammatory response in patients undergoing major abdominal surgery. *Can J Anaesth* 2003; 50:1009–16.
28. Boldt J, Scho'lhorn T, Mayer J, Piper S, Suttner S. The value of an albumin-based intravascular volume replacement strategy in elderly patients undergoing major abdominal surgery. *Anesth Analg* 2006;103:191–9.
29. Collis RE, Collins PW, Gutteridge CN, Kaul A, Newland AC, Williams DM, Webb AR. The effect of hydroxyethyl starch and other plasma volume substitutes on endothelial cell activation: An in vitro study. *Intensive Care Med* 1994;20:37–41.
30. Tian J, Lin X, Zhou W, Xu J. Hydroxyethyl starch inhibits NF-kB activation and prevents the expression of inflammatory mediators in endotoxic rats. *Ann Clin Lab Sci* 2003;33:451–458.
31. Lappas CM, Day YJ, Marshall MA, Engelhard VH, Linden J. Adenosine A2A receptor activation reduces hepatic ischemia reperfusion injury by inhibiting CD1d-dependent NKT cell activation. *J Exp Med* 2006;203:2639–2648.
32. Day YJ, Marshall MA, Huang L, McDuffie MJ, Okusa MD, Linden J. Protection from ischemic liver injury by activation of A2A adenosine receptors during reperfusion: inhibition of chemokine induction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G285–G293.
33. Spiegel HU, Bahde R. Experimental models of temporary normothermic liver ischemia. *J Invest Surg* 2006;19(2):113-23.
34. Kumagai T, Nangaku M, Kojima I, et al. Glyoxalase I overexpression ameliorates renal ischemia-reperfusion injury in rats. *American Journal of Physiology* 2009;296(4):F912–F921.

35. Hagiwara M, Shen B, Chao L, Chao J. Kallikrein-modified mesenchymal stem cell implantation provides enhanced protection against acute ischemic kidney injury by inhibiting apoptosis and inflammation. *Human Gene Therapy* 2008;19(8):807–819.
36. Marôco J. *Análise Estatística com o PASW Statistics*. Pêro Pinheiro: Report number; 2010.
37. Catré D, Viana JS, Cabrita AM, Oliveira M, Felizes A, Lopes MF. Hydroxyethyl starch 130/0.4 attenuates early hepatic damage in ischemia/reperfusion injury. *Can J Anaesth* 2010;57(5):439-45.
38. Park SW, Chen SW, Kim M, D'Agati VD, Lee HT. Selective intrarenal human A₁ adenosine receptor overexpression reduces acute liver and kidney injury after hepatic ischemia reperfusion in mice. *Laboratory Investigation* 2010;90: 476-495.
39. Park SW, Chen SW, Kim M, Brown K, D'Agati VD, Lee HT. Protection against acute kidney injury via A₁ adenosine receptor-mediated Akt activation reduces liver injury after liver ischemia and reperfusion in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;333(3):736-47.
40. Suzuki S, Nakamura S, Sakaguchi T, Mitsuoka H, Tsuchiya Y, Kojima Y, Konno H, Baba S. Pathophysiological appraisal of a rat model of total hepatic ischemia with an extracorporeal portosystemic shunt. *J Surg Res* 1998;80(1):22-7.
41. Hayashi H, Chaudry IH, Clemens MG, Baue AE. Hepatic ischemia models for determining the effects of ATP-MgCl₂ treatment. *J Surg Res* 1986;40(2):167-75.
42. Suzuki S, Serizawa A, Sakaguchi T, Tsuchiya Y, Kojima Y, Okamoto K, Kurachi K, Konno H, Fujise Y, Baba S, Nakamura S. The roles of platelet-activating factor and endothelin-1 in renal damage after total hepatic ischemia and reperfusion. *Transplantation* 2000;69(11):2267-73.

43. Xiong L, Lei C, Wang Q, Li W. Acute normovolaemic haemodilution with a novel hydroxyethyl starch (130/0.4) reduces focal cerebral ischaemic injury in rats. *Eur J Anaesthesiol* 2008;25:581-8.
44. Inan N, Iltar S, Surer H, Yilmaz G, Alemdaroglu KB, Yazar MA, Basar H. Effect of hydroxyethyl starch 130/0.4 on ischaemia/reperfusion in rabbit skeletal muscle. *Eur J Anaesthesiol* 2009;26(2):160-5.
45. Ertmer C, Kampmeier TG, Rehberg S, Morelli A, Köhler G, Lange M, Bollen Pinto B, Höhn C, Hahnenkamp K, Van Aken H, Westphal M. Effects of balanced crystalloid vs. 0.9% saline-based vs. balanced 6% tetrastarch infusion on renal function and tubular integrity in ovine endotoxemic shock. *Crit Care Med* 2011. [Epub ahead of print]
46. Wu Y, Wu AS, Wang J, Tian M, Jia XY, Rui Y, Yue Y. Effects of the novel 6% hydroxyethyl starch 130/0.4 on renal function of recipients in living-related kidney transplantation. *Chin Med J* 2010;123:3079-83.
47. Dart AB, Mutter TC, Ruth CA, Taback SP. Hydroxyethyl starch (HES) versus other fluid therapies: effects on kidney function. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;20(1):CD007594.

AGRADECIMENTO

À Prof. Doutora Maria Francelina Lopes, orientadora, pela ajuda incansável, disponibilidade, cordialidade, e, principalmente, por tudo o que me ensinou durante este projecto, para o qual teve a amabilidade de me convidar.

...à Prof. Doutora Maria Esmeralda Elvas Gonçalves, do Departamento de Matemática da FCTUC, pelo rigor que teve na revisão da metodologia do trabalho e pela simpatia e clareza com que respondeu às minhas questões e me fez aprofundar a área da Bioestatística.

...ao Prof. Doutor António Manuel Silvério Cabrita, pela ajuda preciosa na análise histopatológica das peças.

...à Dr^a Dora Lopes Castelo Branco Catré, pelo desenho de base desta investigação experimental e pela excelente integração que me proporcionou durante o trabalho laboratorial.

...à Dr^a Andreia Vaz Felizes, participante neste projecto como aluna, pelo companheirismo e amizade demonstrados.

Por último, agradecimento à minha Família e Amigos, pelo amor e carinho, sem os quais este trabalho não era possível.