



Effect of infusion of M&G solution for protection of renal tissue in Wistar rats subjected to programmed ischemia-reperfusion

Efeito da infusão da solução M&G na proteção do tecido renal de ratos Wistar submetidos a isquemia e reperfusão programada

Leandro Pablos Rossetti¹ , Larissa Bastos Eloy da Costa², Ana Terezinha Guillaumon¹

Abstract

Background: Renal ischemia-reperfusion (I/R) is directly associated with acute renal failure and can occur in conditions such as infarction caused by embolization or thrombosis, septicemia, and kidney transplantation. The process is complex, involving innate and adaptive immune responses, presence of cellular infiltrate, and production and release of cytokines and chemokines. It also triggers cell responses and release of reactive oxygen species, in addition to causing apoptosis and, in some cases, cell necrosis. Against this background, evaluation of renal tissue protection mechanisms is essential. **Objectives:** The objective of this study was to test the M&G solution, developed in prior research, evaluating its capacity to protect the kidneys using morphometric analysis and by assaying the presence and expression of inflammatory cytokines (TNF-alpha, VEGF, HIF, and IL-8). **Methods:** Eighteen Wistar rats were divided into three groups: Sham (S), Control (C), and Experimental (E). The S group underwent the surgical operation, but without arterial clamping. In group C, the aorta was clamped above and below the left renal artery, without infusion of the preservation solution. In group E, in addition to clamping, the aorta was punctured and M&G solution was infused continuously for 20 minutes at 15°C. Morphological analysis and immunohistochemical assessment of markers were then conducted. **Results:** Morphological differences were identified in group S compared with groups C and E. Analysis of markers revealed reduced intensity of expression of TNF and of VEGF in group E. There were no differences in HIF or IL-8 between groups. **Conclusions:** The M&G solution was associated with a reduction in presence and expression of TNF-alpha and a trend to reduced VEGF.

Keywords: ischemia-reperfusion; renal failure; preservation solution.

Resumo

Contexto: A isquemia e reperfusão (I/R) renal está envolvida diretamente com insuficiência renal aguda, ocorrendo em casos como infarto por embolização ou trombose, quadros de septicemia e transplante renal. Esse processo é complexo, envolvendo respostas imunes inatas e adaptativas, presença de infiltrado celular, produção e liberação de citocinas e quimiocinas. Também desencadeia respostas celulares e liberação de espécies reativas de oxigênio, além de resultar em apoptose e, em alguns casos, necrose celular. Nesse contexto, é imprescindível a avaliação dos mecanismos de proteção ao tecido renal. **Objetivos:** O objetivo foi testar a solução desenvolvida M&G, avaliando sua capacidade protetora no rim por meio de análise morfométrica e presença e expressão de citocinas inflamatórias (TNF-alfa, VEGF, HIF e IL-8). **Métodos:** Foram selecionados 18 ratos Wistar, divididos em três grupos: Sham (S), Controle (C) e Estudo (E). O grupo S foi submetido ao processo cirúrgico sem o clameamento arterial. No grupo C, foi clameada a aorta acima e abaixo da artéria renal esquerda, sem a infusão de solução preservadora. No grupo E, além do clameamento, realizou-se a punção da aorta e a infusão contínua da solução M&G por 20 minutos a 15°C. Realizou-se a avaliação morfológica e imuno-histoquímica com os marcadores. **Resultados:** Identificaram-se diferenças morfológicas entre o grupo S comparado aos grupos C e E. Na análise dos marcadores, houve redução na intensidade de expressão do TNF e na expressão do VEGF no grupo E. Não houve diferenças com HIF e IL-8 entre os grupos. **Conclusões:** A solução M&G apresentou redução da presença e expressão de TNF-alfa e tendência de redução do VEGF.

Palavras-chave: isquemia e reperfusão; insuficiência renal; solução preservadora.

How to cite: Rossetti LP, Costa LBE, Guillaumon AT. Effect of infusion of M&G solution for protection of renal tissue in Wistar rats subjected to programmed ischemia-reperfusion. *J Vasc Bras.* 2020;19:e20190010. <https://doi.org/10.1590/1677-5449.190010>

¹ Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Departamento de Cirurgia Vascular, Campinas, SP, Brasil.

² Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Departamento de Anatomia Patológica, Campinas, SP, Brasil.

Financial support: None.

Conflicts of interest: No conflicts of interest declared concerning the publication of this article.

Submitted: September 19, 2019. Accepted: March 25, 2020.

The study was carried out at Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE), Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

■ INTRODUCTION

The kidneys are the organs responsible for homeostasis of the body, regulating tubular reabsorption of water, ions, glucose, and nutrients and removing metabolic products by glomerular filtration. The process of renal ischemia-reperfusion (I/R) is directly associated with acute renal failure and can occur in conditions such as infarction caused by embolization or thrombosis, septicemia, and kidney transplantation. It is characterized by restriction of the blood flow available to the organ, followed by reestablishment of the blood supply. During this process, many compensatory and harmful mechanisms are triggered. These changes are associated with high rates of morbidity and mortality.^{1,2}

The changes provoked by the lack of blood and, consequently, of oxygen supply to cells, produce an inflammatory cascade, resulting in reduced production of adenosine triphosphate (ATP) by mitochondrial oxidative phosphorylation and increased glycolysis, which is the anaerobic process for releasing energy.³ This involves complex vascular and cellular changes, triggering structural and functional changes in renal tissues. Proximal tubule cells are more sensitive to ATP privation than the cells in Henle's loop or distal tubules, because of the high metabolic rate needed for ion transport and the limited capacity to work in an anaerobic state.^{4,5}

Cytokines are molecules that have the capacity to regulate growth, death, and differentiation and function of cells. Thus, metabolic activity of renal tissues can be evaluated through inflammatory mediators, identifying the intensity of reactions and, therefore, the proportions of the changes present in tissues as a result of the ischemia-reperfusion process.⁶

Against this background, it is important to evaluate the activity of preservation solutions that are capable of reducing the degree of injury caused by this process. There are several solutions that can reduce tissue damage, such as Collins Solution, University of Wisconsin Solution, and Custodiol, combined or not with hypothermia.^{7,8} In an attempt to improve on these, M&G solution was developed with extracellular characteristics, and therefore a lower potassium (K⁺) content, aiming to reduce injury. This solution was developed at the Vascular Research and Microprocedure Laboratory at the Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), in Brazil.⁹

The objectives were to evaluate the possible protective effects of M&G solution (Figure 1) at low temperatures (15 °C) in the renal tissues of Wistar rats subjected to programmed ischemia-reperfusion, by analyzing the following cytokines: tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), hypoxia-induced factor (HIF), vascular endothelial growth factor (VEGF), and interleukin 8 (IL-8).

Sodium bicarbonate	0.84 g
Potassium chloride	1.12 g
Sodium chloride	7.4 g
Monobasic phosphate	2.05 g
Glucose	38.5 g
Distilled water	1000 mL

Figure 1. Composition of M&G solution.

■ MATERIALS AND METHODS

Experiment

M&G solution was developed to have extracellular characteristics, with a higher quantity of Na⁺ and a lower quantity of K⁺, as electrolytes. Phosphate buffer was used, with glucose as the membrane-impermeable agent, achieving a pH of 7.74 (Figure 1).

In order to evaluate the protective function of the solution, 18 male Wistar rats bred under conventional conditions were obtained from the university's Central Animal House after approval by the Animal Usage Ethics Committee (CEUA - no. 4077-1). The animals were divided into three groups: Sham (S), Control (C), and Experimental (E). They were anesthetized with intraperitoneal ketamine/xylazine, not exceeding the maximum dose of 80/10 milligrams per kilogram respectively. The experiment was conducted under controlled temperature conditions (23 °C). After anesthesia, the rats underwent abdominal shaving followed by antisepsis with alcoholic 2% iodine solution.

Surgery initiated with a midline laparotomy and then the animal was randomized into one of the groups. In group S, structures were dissected without clamping and without infusion of the solution. In group C, the aorta was clamped above and below the left renal artery, without infusion of the solution. In group E, clamping was performed, followed by infusion of 1 milliliter of M&G solution at 15 °C, continually for 20 minutes, via puncture of the aorta. After removal of the catheter, it was necessary to suture the aorta with 10.0 nylon monofilament. The abdominal wall was then closed with 4.0 nylon monofilament.

The rats were kept under observation for 7 days, during which time their diet was reintroduced and they were offered oral analgesic. They were kept in an artificial 12-hour light/dark cycle until euthanasia in a carbon dioxide chamber.

Analysis of renal tissues

The left kidneys were harvested from the animals in each group and processed to produce histological slides. The examiner was unaware of which group each animal belonged to and slides were analyzed in random order. The tissues were first analyzed for morphology using Hematoxylin-Eosin staining. The objective was to

detect morphological changes caused by I/R, observing changes such as pyknotic nuclei, karyolysis, acidophilia, and loss of the tubule framework. This analysis was performed using images captured with a Nikon 995 digital camera fitted to the microscope (Axio Lab.A1, Zeiss). Histomorphometric analysis was conducted with the aid of IMAGEJ® software.

Next, slides were stained with immunohistochemical reactions with the following reagents: tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), hypoxia-induced factor (HIF), vascular endothelial growth factor (VEGF), and interleukin 8 (IL-8). The same software was used for

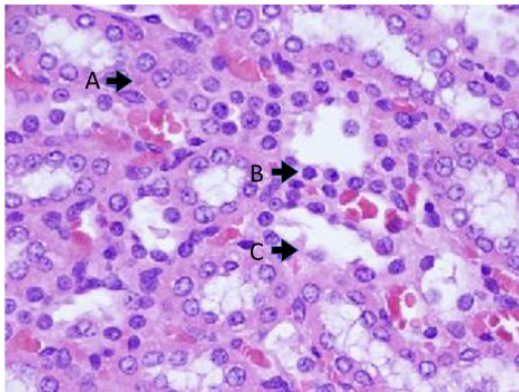


Figure 2. Presence of morphological changes providing evidence of the acute tubular necrosis process in group C. (A) acidophilia; (B) pyknotic nucleus; (C) loss of tubular framework.

these analyses. The initial analysis was to determine expression of markers, deriving an index of positivity for the fields evaluated. This was then converted to an 8-bit grayscale. After these steps, semiautomatic segmentation was conducted using the Threshold tool, correcting marking of interest and reducing background marking. The quantity of pixels in each image could then be determined, providing a numerical value corresponding to the intensity of marking.¹⁰

The Kruskal-Wallis test was used to compare inflammatory markers and intensity of reactions between the three groups of rats (S, C, and E), because the variables were not normally distributed and the groups were small. The significance level adopted for the statistical tests was 5%, i.e., $p < 0.05$. Statistical analyses were conducted using SAS for Windows, version 9.2, (SAS Institute Inc., 2002-2008, Cary, NC, United States).

RESULTS

Morphological assessment

Optical microscopy analysis of slides stained with H&E from groups S, C, and E detected structural changes, primarily in the region of the renal cortex, where there is significant metabolic activity of tubules (Figures 1 and 2). This analysis identified statistically significant differences between group S and groups C and E ($p = 0.006$). No differences were detected between groups C and E.

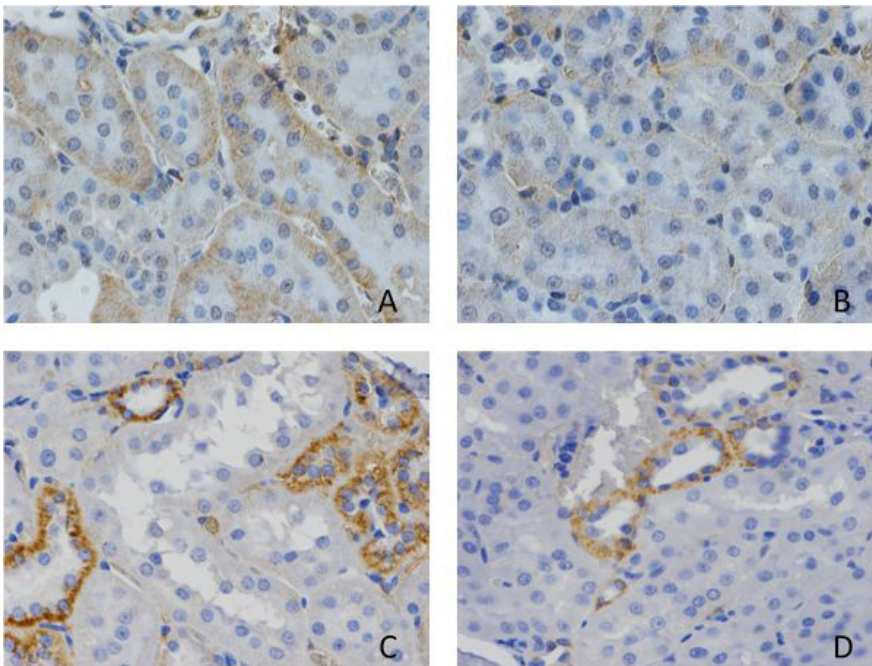


Figure 3. Immunohistochemical study of renal tissues. (A) control group marked with tumor necrosis factor (TNF); (B) Experimental group marked with TNF (there were differences in intensity of TNF expression, which was lower with the preservation solution); (C) Control group marked with vascular endothelial growth factor (VEGF); (D) Experimental group marked with VEGF (a trend was observed for reduced expression with use of the preservation solution).

Table 1. Comparison of inflammatory markers and reaction intensity in three groups of rats: Sham (S), Control (C), and Experimental (E).

GROUP	Variable	N	Mean	SD	Min	Q1	Median	Q3	Max	p*	
S	TNF	6	11.05	12.19	0.00	0.00	9.75	13.70	33.10	p = 0.002 → S≠E, S≠C	
	IL-8	6	59.78	29.05	22.80	34.20	64.45	85.00	87.80	p = 0.268	
	VEGF	6	29.82	13.19	12.40	18.90	30.15	39.50	47.80	p = 0.038 → S≠C	
	HIF	6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	p = 0.006 → S≠E, S≠C	
	IntensTNF	6	52.74	7.28	41.19	46.91	55.09	58.40	59.73	p < 0.001 → S≠E, S≠C, E≠C	
	IntensIL-8	6	52.20	7.84	41.92	47.95	51.02	56.70	64.60	p = 0.003 → S≠E, S≠C	
	IntensVEGF	6	55.96	13.65	32.10	50.63	57.83	67.67	69.73	p = 0.751	
	IntensHIF	6	47.49	7.01	40.23	40.84	46.70	51.63	58.85	p = 0.128	
	C	TNF	6	94.55	9.58	76.50	90.80	100.00	100.00	100.00	
		IL-8	6	82.32	23.01	37.70	84.50	85.85	100.00	100.00	
VEGF		6	47.25	10.66	37.10	39.60	42.90	60.10	60.90		
HIF		6	15.97	8.90	0.90	10.70	19.05	22.50	23.60		
IntensTNF		6	78.55	5.83	68.90	74.83	80.32	82.39	84.56		
IntensIL-8		6	76.50	5.18	69.48	72.18	77.28	80.24	82.56		
IntensVEGF		6	54.85	7.93	42.81	48.18	56.57	61.51	63.48		
IntensHIF		6	45.06	5.32	40.67	40.71	42.92	50.70	52.44		
E		TNF	6	81.98	16.14	53.40	74.70	87.45	88.90	100.00	
		IL-8	6	82.63	14.93	67.00	70.00	79.40	100.00	100.00	
	VEGF	6	33.90	6.94	21.70	29.60	32.95	35.40	50.80		
	HIF	6	9.67	9.41	0.00	0.00	2.97	11.68	24.00		
	IntensTNF	6	67.46	4.12	60.37	65.35	68.29	71.08	71.36		
	IntensIL-8	6	73.28	7.05	65.50	65.89	72.73	80.76	82.06		
	IntensVEGF	6	57.12	9.76	44.20	46.87	59.72	64.45	67.78		
	IntensHIF	6	53.87	6.96	48.60	49.71	51.08	55.51	67.23		

SD = standard deviation; HIF = hypoxia-induced factor; IL-8 = interleukin 8; TNF = tumor necrosis factor; VEGF = vascular endothelial growth factor; IntensHIF = HIF Reaction intensity; IntensIL-8 = IL-8 Reaction intensity; IntensTNF = TNF Reaction intensity; IntensVEGF = VEGF Reaction intensity; N = number of rats in each group; Q1 = 25th percentile; Q3 = 75th percentile; Min = minimum value; Max = maximum value. *p values according to Kruskal-Wallis test to compare variables between the three groups.

Immunohistochemical analysis

The immunohistochemical analysis identified presence of staining and identified antibodies that are primarily located in cytoplasm (Figures 2 and 3). Table 1, below, shows comparisons of the results for inflammatory markers and the intensities of the reactions of markers in each of the three groups of rats.

The statistical tests showed that there were differences between the three groups for TNF-alpha, with $p < 0.05$. There were no differences between the three groups when total values for IL-8 were compared, but there was a difference in the intensity of the reaction for this cytokine between group S and groups C and E.

For VEGF, there was a difference between group S and group C, with a higher result for the second. There were no differences between groups S and E or between groups C and E, but there was a trend for reduced expression of VEGF in group E compared

with group C. There were no differences in intensity of reaction to expression of VEGF.

HIF was not identified in group S. Therefore, when compared with groups C and E, there were significant increases in expression of the marker when subjected to warm or cold ischemia with protection.

DISCUSSION

The mechanisms of renal ischemia-reperfusion are complex and involve several pathways such as hypoxia, release of reactive oxygen species, build up of neutrophils, and release of oxygen free radicals and lytic enzymes. The morphofunctional changes that result from this process are related to the duration of ischemia and the tissue's capacity to tolerate anaerobiosis.^{3,5}

The analyses of renal tissue conducted primarily focus on changes observed in the cortex, where there

is a concentration of proximal tubules, which have considerable metabolic activity for hydroelectrolytic regulation. Efforts to improve techniques and reduce injury have been concentrated on the I/R process. Hypothermia has been widely employed with this objective, because it slows cellular metabolism and reduces oxidative stress and inflammation of tissues.¹⁰ In addition to hypothermia, there are also preservation solutions that can be used with the objective of improving environments with intracellular or extracellular characteristics.⁸

The morphometric analysis was able to identify significant differences between group S (not subjected to I/R) and groups C and E. The injuries provoked in these renal segments provide evidence of acute tubular necrosis using optical microscopy criteria: pyknotic nuclei, karyorrhexis, and/or cell membrane rupture. These changes have been widely confirmed in the literature and are evidence of the injuries caused by the I/R process. In this model, which is considered acute because of the short duration of ischemia (20 min), using the M&G protective solution in cold ischemia was not capable of preventing structural changes to the renal tissues, when compared with group C. This duration of ischemia is reaffirmed, with evidence of relatively discrete injuries in renal tissues after warm ischemia.¹¹

The ideal characteristics of a preservation solution are linked with reduced cellular activity in the renal parenchyma, lower antigenicity, nontoxic osmotic agents, and energetic substrates that incorporate peroxides, which maintain the cell membranes more stable. In addition to these factors, the composition, pressure, and duration of perfusion are extremely important for conservation of the renal tissues.¹²

Production of TNF- α is related to bursts produced by reactive oxygen species, caused by I/R. The effects of this molecule on the kidneys are related to reduction of glomerular blood flow and filtration rate and induction of synthesis of other proinflammatory mediators, such as IL-1. Glomerular permeability is also increased, provoking fibrin deposition and stimulating cellular infiltration by activation of adhesion molecules, such as ICAM-1 and selectin, promoting apoptosis.^{13,14}

When immunohistochemical results were assessed, in the form of counts of cells positive for the TNF- α marker, it was observed that there was a difference between group S and groups C and E. No difference was observed between groups C and E, but when the intensity of the reaction was evaluated by analysis of pixels, the intensity was greater in group C than in group E. This is evidence that the inflammatory process had lower intensity in the group with M&G

preservation solution. Studies evaluating use of allopurinol in renal I/R also found evidence of lower TNF- α levels, similar to what was observed with M&G solution.¹⁵

VEGF is released during the ischemia-reperfusion process. This factor has a function in neovascularization, with endothelial proliferation, migration, and remodeling.¹⁶ This process has been confirmed by Hao,¹⁷ who assessed expression using messenger RNA tests for VEGF production, which was elevated after I/R. In the experiment conducted, this elevation of VEGF expression was identified in the comparison between groups S and C. There was no statistically significant difference when group E was compared with the other groups. There is therefore a tendency for the inflammatory process to be reduced and for lower expression of angiogenesis when the preservation solution is used. Under normal conditions, the endothelium does not exhibit exacerbated mitotic activity, but in response to the stimuli caused by ischemia and increased production of HIF, stimulating VEGF production, angiogenesis occurs and permeability of blood vessels is increased, regulating vasculogenesis.¹⁸

In view of the known importance of the process of the response to ischemia, HIF was analyzed, since it has a protein regulation function, as part of tissue adaptation. Inhibition of HIF during I/R indicates intensification of the harmful response, whereas accumulation is protective.¹⁹ When the three groups were compared, there were no differences in HIF expression or reaction intensity. In previous evaluations of M&G solution, infused during the I/R process in limbs subjected to varying durations of ischemia (180 min), the solution exhibited a certain degree of protection of perfused tissues, comparing longer periods of exposure to ischemia when HIF was analyzed and an absence of differences between groups when VEGF was analyzed.⁹

The principal function of IL-8 is its capacity to activate the leukocytic activation process, making injuries provoked during I/R more likely. It normally has low expression in the body, but, in response to minimal stimulation it tends to increase during this process.²⁰ No differences were found between the groups in the results for expression, but differences were observed in intensity of staining, confirming the low expression in periods without I/R aggression and higher expression in periods of metabolic stress.

The limitations of this study are linked to the low number of organisms in each group, to the 20-minute ischemia period, and to the lack of a comparative analysis with other preservation solutions. There is a need to validate the renal protection process in further studies.

CONCLUSIONS

The process of renal ischemia-reperfusion is a complex chain of reactions that can trigger molecular and structural changes. In this context, a protective effect of M&G solution at 15 °C was identified in comparison with the effect of ischemia without infusion of the preservation solution. There was evidence of reductions in the presence and expression of TNF-alpha, in addition to a trend for reduced VEGF. No differences were detected in the analyses of IL-8 or HIF.

REFERENCES

- Macedo E, Mehta RL. Renal recovery after acute kidney injury. *Contrib Nephrol.* 2016;187:24-35. PMID:26882035.
- Jun C, Qingshu L, Ke W, et al. Protective effect of CXCR3 CD4 CD25 Foxp3 regulatory T cells in renal ischemia-reperfusion injury. *Med of Inf.* 2015;2015:1-8. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/360973>.
- Pere LAB, Mocelin AJ, Delfino VDA. Injúria da isquemia/reperfusão: implicações no transplante renal. *J Bras Nefrol.* 2005;27:207-14.
- Molitoris BA. Cellular basis of ischemic acute tubular failure. In Lazarus JM, Brenner BM, editors. *Acute renal failure.* 3rd ed. London: Churchill Livingstone; 1993. p. 1-32.
- Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7(4):189-200. <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2011.16>. PMID:21364518.
- Jang HR, Rabb H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *Clin Immunol.* 2009;130(1):41-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2008.08.016>. PMID:18922742.
- Guibert EE, Petrenko AY, Balaban CL, Somov AY, Rodriguez JV, Fuller BJ. Organ preservation: current concepts and new strategies for the next decade. *Transfus Med Hemother.* 2011;38(2):125-42. <http://dx.doi.org/10.1159/000327033>. PMID:21566713.
- Rosa SD, Antonelli M, Ronco C. Hypothermia and kidney: a focus on ischaemia-reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2017;32(2):241-7. PMID:28186567.
- Guillaumon AT. *Proteção tecidual: conceito e perspectivas [tese].* Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2005.
- Mota MVB, Rogério F. Análise da expressão tecidual de ATPase da Bomba sódio/potássio (subunidade alfa-3) e ATP sinatase mitocondrial (subunidade beta) em espécimes cirúrgicos de pacientes com esclerose hipocampal [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2018.
- Park Y, Hirose R, Dang K, et al. Increased severity of renal ischemia-reperfusion injury with venous clamping compared to arterial clamping in a rat model. *Surgery.* 2008;143(2):243-51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.surg.2007.07.041>. PMID:18242341.
- Guillaumon AT, Figueiredo JF. Estudo experimental em ratos da conservação renal após perfusão e auto transplante. *J Bras Nefrol.* 1995;17(2):115-21.
- Kothari N, Bogra J, Abbas H, et al. Tumor Necrosis Factor gene polymorphism results in high TNF level in sepsis and septic shock. *Cytokine.* 2013;61(2):676-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyt.2012.11.016>. PMID:23317877.
- Donnahoo KK, Shames BD, Harken AH, Meldrum DR. Review article: the role of tumor necrosis factor in renal ischemia-reperfusion injury. *J Urol.* 1999;162(1):196-203. <http://dx.doi.org/10.1097/00005392-199907000-00068>. PMID:10379787.
- Prieto-Moure B, Lloris-Carsí JM, Belda-Antolí N, Toledo-Pereyra LH, Cejalvo-Lapeña D. Allopurinol protective effect of renal ischemia by downregulating TNF- α , IL-1 β , and IL-6 response. *J Invest Surg.* 2017;30(3):143-51. <http://dx.doi.org/10.1080/08941939.2016.1230658>. PMID:27690698.
- Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med.* 2008;358(19):2039-49. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra0706596>. PMID:18463380.
- Hao P. Monitoring of renal ischemia reperfusion injury in rabbits by ultrasonic contrast and its relationship with expression of VEGF in renal tissue. *Asian Pac J Trop Med.* 2016;9(2):188-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.01.006>. PMID:26919954.
- Joško J, Gwózdź B, Jedrzejowska-Szypułka H, Hendryk S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med Sci Monit.* 2000;6(5):1047-52. PMID:11208453.
- Qiu S, Chen X, Pang Y, Zhang Z. Lipocalin-2 protects against renal ischemia/reperfusion injury in mice through autophagy activation mediated by HIF1 α and NF- κ B crosstalk. *Biomed Pharmacother.* 2018;108:244-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.023>. PMID:30219682.
- Araki M, Fahmy N, Zhou L, et al. Expression of IL-8 during reperfusion of renal allografts is dependent on ischemic time. *Transplantation.* 2006;81(5):783-8. <http://dx.doi.org/10.1097/01.tp.0000198736.69527.32>. PMID:16534483.

Correspondence

Leandro Pablos Rossetti
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Departamento de
Cirurgia Vasculard
Rua São Salvador, 220/154, Celeste - Jardim Belo Horizonte
CEP 13076-540 – Campinas (SP), Brasil
Tel: +55 (19) 97144-4428
E-mail: dr.leandrorossetti@gmail.com

Author information

LPR - MSC in Cirurgia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
LBEC - MSC and PhD in Patologia Clínica, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
ATG - Full professor of Cirurgia Vasculard, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Author contributions

Conception and design: LPR, LBEC, ATG
Analysis and interpretation: LPR, LBEC, ATG
Data collection: LPR, LBEC
Writing the article: LPR, LBEC, ATG
Critical revision of the article: LPR, LBEC, ATG
Final approval of the article*: LPR, LBEC, ATG
Statistical analysis: LPR
Overall responsibility: LPR, LBEC, ATG

*All authors have read and approved of the final version of the article submitted to J Vasc Bras.

Efeito da infusão da solução M&G na proteção do tecido renal de ratos Wistar submetidos a isquemia e reperfusão programada

Effect of infusion of M&G solution for protection of renal tissue in Wistar rats subjected to programmed ischemia-reperfusion

Leandro Pablos Rossetti¹ , Larissa Bastos Eloy da Costa², Ana Terezinha Guillaumon¹ 

Resumo

Contexto: A isquemia e reperfusão (I/R) renal está envolvida diretamente com insuficiência renal aguda, ocorrendo em casos como infarto por embolização ou trombose, quadros de septicemia e transplante renal. Esse processo é complexo, envolvendo respostas imunes inatas e adaptativas, presença de infiltrado celular, produção e liberação de citocinas e quimiocinas. Também desencadeia respostas celulares e liberação de espécies reativas de oxigênio, além de resultar em apoptose e, em alguns casos, necrose celular. Nesse contexto, é imprescindível a avaliação dos mecanismos de proteção ao tecido renal. **Objetivos:** O objetivo foi testar a solução desenvolvida M&G, avaliando sua capacidade protetora no rim por meio de análise morfométrica e presença e expressão de citocinas inflamatórias (TNF-alfa, VEGF, HIF e IL-8). **Métodos:** Foram selecionados 18 ratos Wistar, divididos em três grupos: Sham (S), Controle (C) e Estudo (E). O grupo S foi submetido ao processo cirúrgico sem o clameamento arterial. No grupo C, foi clameada a aorta acima e abaixo da artéria renal esquerda, sem a infusão de solução preservadora. No grupo E, além do clameamento, realizou-se a punção da aorta e a infusão contínua da solução M&G por 20 minutos a 15 °C. Realizou-se a avaliação morfológica e imuno-histoquímica com os marcadores. **Resultados:** Identificaram-se diferenças morfológicas entre o grupo S comparado aos grupos C e E. Na análise dos marcadores, houve redução na intensidade de expressão do TNF e na expressão do VEGF no grupo E. Não houve diferenças com HIF e IL-8 entre os grupos. **Conclusões:** A solução M&G apresentou redução da presença e expressão de TNF-alfa e tendência de redução do VEGF.

Palavras-chave: isquemia e reperfusão; insuficiência renal; solução preservadora.

Abstract

Background: Renal ischemia-reperfusion (I/R) is directly associated with acute renal failure and can occur in conditions such as infarction caused by embolization or thrombosis, septicemia, and kidney transplantation. The process is complex, involving innate and adaptive immune responses, presence of cellular infiltrate, and production and release of cytokines and chemokines. It also triggers cell responses and release of reactive oxygen species, in addition to causing apoptosis and, in some cases, cell necrosis. Against this background, evaluation of renal tissue protection mechanisms is essential. **Objectives:** The objective of this study was to test the M&G solution, developed in prior research, evaluating its capacity to protect the kidneys using morphometric analysis and by assaying the presence and expression of inflammatory cytokines (TNF-alpha, VEGF, HIF, and IL-8). **Methods:** Eighteen Wistar rats were divided into three groups: Sham (S), Control (C), and Experimental (E). The S group underwent the surgical operation, but without arterial clamping. In group C, the aorta was clamped above and below the left renal artery, without infusion of the preservation solution. In group E, in addition to clamping, the aorta was punctured and M&G solution was infused continuously for 20 minutes at 15° C. Morphological analysis and immunohistochemical assessment of markers were then conducted. **Results:** Morphological differences were identified in group S compared with groups C and E. Analysis of markers revealed reduced intensity of expression of TNF and of VEGF in group E. There were no differences in HIF or IL-8 between groups. **Conclusions:** The M&G solution was associated with a reduction in presence and expression of TNF-alpha and a trend to reduced VEGF.

Keywords: ischemia-reperfusion; renal failure; preservation solution.

Como citar: Rossetti LP, Costa LBE, Guillaumon AT. Efeito da infusão da solução M&G na proteção do tecido renal de ratos Wistar submetidos a isquemia e reperfusão programada. *J Vasc Bras.* 2020;19:e20190010. <https://doi.org/10.1590/1677-5449.190010>

¹ Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Departamento de Cirurgia Vascular, Campinas, SP, Brasil.

² Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Departamento de Anatomia Patológica, Campinas, SP, Brasil.

Fonte de financiamento: Nenhuma.

Conflito de interesse: Os autores declararam não haver conflitos de interesse que precisam ser informados.

Submetido em: Setembro 19, 2019. Aceito em: Março 25, 2020.

O estudo foi realizado no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE), Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

■ INTRODUÇÃO

O rim é o órgão responsável pela homeostasia do organismo, regulando a reabsorção tubular de água, íons, glicose e nutrientes e removendo produtos metabólicos por meio da filtração glomerular. O processo de isquemia e reperfusão (I/R) renal está envolvido diretamente com a insuficiência renal aguda, ocorrendo em casos como infartos por embolização ou trombose, quadros de septicemia e transplantes renais. Caracteriza-se por restrição no fluxo sanguíneo disponível ao órgão e um posterior restabelecimento do fornecimento de sangue. Durante o processo, ocorre o disparo de diversos mecanismos compensatórios e lesivos. Essas alterações estão associadas a elevadas taxas de morbimortalidade^{1,2}.

As alterações provocadas pela falta de sangue e, conseqüentemente, de fornecimento de oxigênio para as células produzem uma cascata de inflamação, resultando na diminuição da produção de adenosina trifosfato (ATP) por meio de fosforilação oxidativa mitocondrial e aumento da glicólise, o que caracteriza o processo anaeróbio de obtenção de energia³. Isso envolve complexas alterações vasculares e celulares, desencadeando mudanças estruturais e funcionais para o tecido renal. As células tubulares proximais são mais sensíveis à privação de ATP do que as células da alça de Henle e dos túbulos distais, por causa da alta taxa de metabolismo requerido no transporte de íons e limitada capacidade de trabalho em meio anaeróbio^{4,5}.

As citocinas são moléculas capazes de regular o crescimento, a morte, a diferenciação e a função das células. Assim, a atividade metabólica dos tecidos renais pode ser avaliada por mediadores inflamatórios, identificando a intensidade das reações e, portanto, as proporções das alterações encontradas no tecido em decorrência do processo de isquemia e reperfusão⁶.

Neste contexto, é importante a avaliação das soluções preservadoras capazes de diminuir o grau de lesão provocada por esse processo. Há diversas soluções que resultam em menores danos teciduais, como a Solução de Collins, *University of Wisconsin* (UW), Custodiol, associada ou não a hipotermia^{7,8}. Na tentativa de aprimoramento, foi desenvolvida a solução M&G, com características extracelular [ou seja, menor quantidade de potássio (K⁺)], buscando ser menos lesiva. A solução foi desenvolvida no laboratório de Microprocedimento e Pesquisa Vascular da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)⁹.

Os objetivos foram avaliar os possíveis efeitos protetores da solução M&G (Figura 1) à baixa temperatura (15 °C) no tecido renal de ratos Wistar submetidos a isquemia e reperfusão programada, através da análise das seguintes citocinas: fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), fator induzido pela hipóxia (HIF), fator endotelial de crescimento vascular (VEGF) e interleucina 8 (IL-8).

Bicarbonato de sódio	0,84 g
Cloreto de potássio	1,12 g
Cloreto de sódio	7,4 g
Fosfato monobásico	2,05 g
Glicose	38,5 g
Água destilada	1000 mL

Figura 1. Composição da solução M&G.

■ MATERIAL E MÉTODOS

Experimento

A solução M&G foi desenvolvida com características extracelulares, contendo maior quantidade de Na⁺ e menor quantidade de K⁺, como eletrólitos. Utilizou-se do fosfato com tampão e da glicose como impermeabilizante, apresentando um pH de 7,74 (Figura 1).

Para a avaliação da função protetora da solução, foram selecionados 18 ratos machos Wistar, criados sob condições convencionais, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade por meio de aprovação no Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA – nº. 4077-1). Eles foram divididos em três grupos: Sham (S), Controle (C) e Estudo (E). Os animais foram submetidos a anestesia com quetamina/xilazina por via intraperitoneal, não ultrapassando a dose máxima de 80/10 miligramas por quilograma, respectivamente. O experimento foi realizado em condições de temperatura ambiente controlada (23 °C). Seguiu-se com a tricotomia abdominal do rato e antisepsia com álcool iodado a 2%.

A cirurgia teve início com laparotomia mediana e, então, foi sorteado a qual grupo o animal participaria. No grupo S, realizou-se dissecação das estruturas sem o clampeamento e sem a infusão da solução. No grupo C, realizou-se o clampeamento da aorta acima e abaixo da artéria renal esquerda, sem a infusão da solução. No grupo E, realizou-se o clampeamento e a infusão de 1 mililitro da solução M&G a 15 °C, continuamente, por um período de 20 minutos, através de punção da aorta. Após a retirada da cateterização, foi necessária a sutura da aorta com mononylon 10.0. Procedeu-se o fechamento da parede abdominal com mononylon 4.0.

Os ratos ficaram em observação por 7 dias, durante os quais foi reintroduzida a dieta e oferecido analgésico via oral, e eles foram mantidos em um ciclo artificial claro/escuro de 12 horas até a eutanásia em câmara de gás carbônico.

Avaliação do tecido renal

Foram coletados os rins esquerdos dos referidos grupos, após eutanásia, e, então, foi feito o processamento com a produção de lâminas histológicas. O avaliador não tinha conhecimento prévio do grupo ao qual estava analisando, examinando de forma aleatorizada as lâminas do estudo. Os tecidos

inicialmente foram avaliados em morfologia com a coloração de Hematoxilina e Eosina. O objetivo foi verificar as alterações morfológicas produzidas pela I/R, observando mudanças como núcleos picnóticos, cariólise, acidofilia e perda do arcabouço tubular. Para isso, foram coletadas as imagens com câmera digital Nikon, modelo 995, acoplada ao microscópio (Axio Lab.A1, Zeiss). A análise histomorfométrica foi realizada com ajuda do *software* IMAGEJ®.

Na sequência, foram corados com reações imuno-histoquímicas os seguintes reagentes: fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), fator induzido pela hipóxia (HIF), fator endotelial de crescimento vascular (VEGF) e interleucina 8 (IL-8). Utilizou-se o mesmo

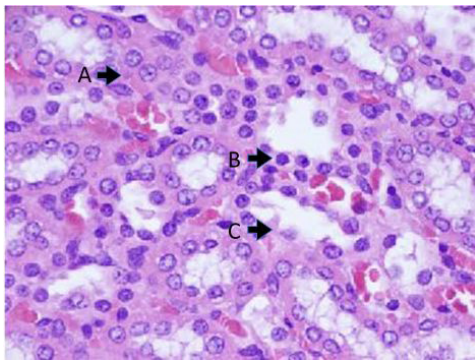


Figura 2. Presença de alterações morfológicas evidenciando processo de necrose tubular aguda no grupo C. (A) acidofilia; (B) núcleo picnótico; (C) perda do arcabouço tubular.

software nessa avaliação. A análise inicialmente foi da expressão dos marcadores, sinalizando uma razão de positividade nos campos avaliados. Realizou-se a conversão para a escala de cinza de 8 bits. Após esses passos, foi realizada uma segmentação semiautomática através da ferramenta Threshold, corrigindo a marcação de interesse e diminuindo a marcação de fundo. Assim, pode-se avaliar a quantidade de *pixels* de cada imagem, fornecendo um valor numérico correspondente à intensidade da marcação¹⁰.

Para a comparação dos marcadores inflamatórios e intensidade de reação entre os três grupos de ratos (S, C e E), foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis devido à ausência de distribuição Normal das variáveis e do tamanho reduzido dos grupos. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $p < 0,05$. Para a análise estatística, foi utilizado o programa computacional SAS para Windows (SAS Institute Inc., 2002-2008, Cary, NC, EUA), versão 9.2.

RESULTADOS

Avaliação morfológica

A análise em microscopia óptica das lâminas coradas com H&E dos grupos S, C e E evidenciou alterações estruturais principalmente na região do córtex renal, pela ampla atividade metabólica dos túbulos (Figuras 1 e 2). Nessa análise, identificou-se diferenças estatisticamente significantes comparando o grupo S com os grupos C e E ($p = 0,006$). Não se evidenciou diferenças entre os grupos C e E.

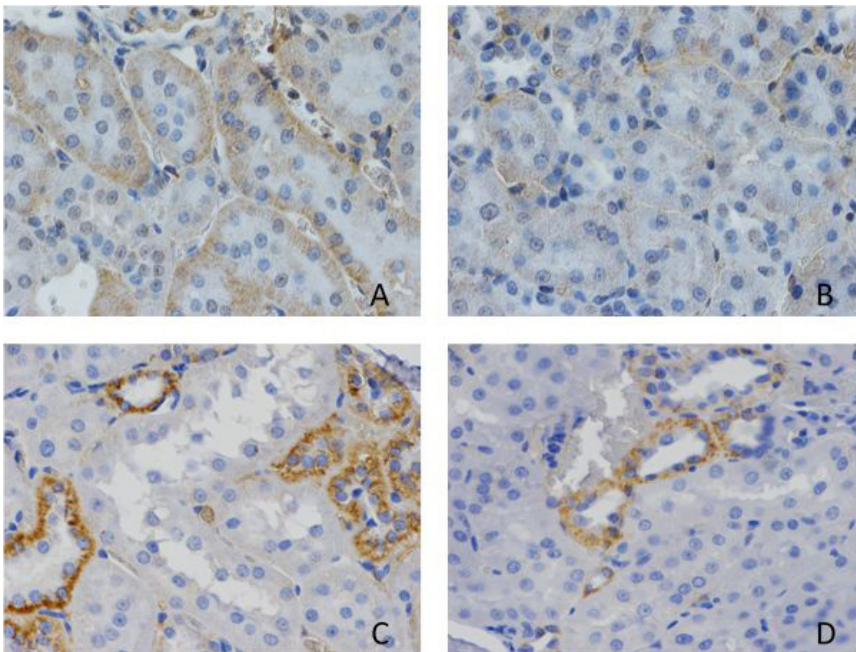


Figura 3. Estudo da imuno-histoquímica do tecido renal. (A) grupo Controle marcado com fator de necrose tumoral (TNF); (B) grupo Estudo marcado com TNF (houve diferenças na intensidade de expressão do TNF, menor com a solução preservadora); (C) grupo Controle marcado com fator endotelial de crescimento vascular (VEGF); (D) grupo Estudo marcado com VEGF (evidenciou-se tendência de diminuição da expressão com o uso da solução preservadora).

Tabela 1. Comparação dos marcadores inflamatórios e da intensidade de reação entre os três grupos de ratos: Sham (S), Controle (C) e Estudo (E).

GRUPO	Variável	N	Média	DP	Mín	Q1	Mediana	Q3	Máx	Valor de p*
S	TNF	6	11,05	12,19	0,00	0,00	9,75	13,70	33,10	p = 0,002 → S≠E, S≠C
	IL-8	6	59,78	29,05	22,80	34,20	64,45	85,00	87,80	p = 0,268
	VEGF	6	29,82	13,19	12,40	18,90	30,15	39,50	47,80	p = 0,038 → S≠C
	HIF	6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	p = 0,006 → S≠E, S≠C
	IntensTNF	6	52,74	7,28	41,19	46,91	55,09	58,40	59,73	p < 0,001 → S≠E, S≠C, E≠C
	IntensIL-8	6	52,20	7,84	41,92	47,95	51,02	56,70	64,60	p = 0,003 → S≠E, S≠C
	IntensVEGF	6	55,96	13,65	32,10	50,63	57,83	67,67	69,73	p = 0,751
	IntensHIF	6	47,49	7,01	40,23	40,84	46,70	51,63	58,85	p = 0,128
C	TNF	6	94,55	9,58	76,50	90,80	100,00	100,00	100,00	
	IL-8	6	82,32	23,01	37,70	84,50	85,85	100,00	100,00	
	VEGF	6	47,25	10,66	37,10	39,60	42,90	60,10	60,90	
	HIF	6	15,97	8,90	0,90	10,70	19,05	22,50	23,60	
	IntensTNF	6	78,55	5,83	68,90	74,83	80,32	82,39	84,56	
	IntensIL-8	6	76,50	5,18	69,48	72,18	77,28	80,24	82,56	
	IntensVEGF	6	54,85	7,93	42,81	48,18	56,57	61,51	63,48	
	IntensHIF	6	45,06	5,32	40,67	40,71	42,92	50,70	52,44	
E	TNF	6	81,98	16,14	53,40	74,70	87,45	88,90	100,00	
	IL-8	6	82,63	14,93	67,00	70,00	79,40	100,00	100,00	
	VEGF	6	33,90	6,94	21,70	29,60	32,95	35,40	50,80	
	HIF	6	9,67	9,41	0,00	0,00	2,97	11,68	24,00	
	IntensTNF	6	67,46	4,12	60,37	65,35	68,29	71,08	71,36	
	IntensIL-8	6	73,28	7,05	65,50	65,89	72,73	80,76	82,06	
	IntensVEGF	6	57,12	9,76	44,20	46,87	59,72	64,45	67,78	
	IntensHIF	6	53,87	6,96	48,60	49,71	51,08	55,51	67,23	

DP = desvio padrão; HIF = fator induzido pela hipóxia; IL-8 = interleucina 8; TNF = fator de necrose tumoral; VEGF = fator endotelial de crescimento vascular; IntensHIF = Intensidade do HIF; IntensIL-8 = Intensidade da IL-8; IntensTNF = Intensidade do TNF; IntensVEGF = Intensidade do VEGF; N = número de ratos de cada grupo; Q1 = percentil 25; Q3 = percentil 75; Min = valor mínimo; Máx = valor máximo. *Valor de p referente ao teste de Kruskal-Wallis para comparação das variáveis entre os três grupos.

Avaliação imuno-histoquímica

Na avaliação imuno-histoquímica, buscou-se as presenças de coloração e identificação dos anticorpos que se localizam principalmente no citoplasma (Figuras 2 e 3). A Tabela 1, a seguir, apresenta as comparações dos marcadores inflamatórios e das intensidades de reação dos marcadores entre os três grupos de ratos.

Verificou-se, pelos resultados estatísticos, que para o TNF-alfa houve diferenças entre os três grupos com $p < 0,05$. Não houve diferença entre os três grupos quando comparados pela IL-8 nos valores totais, mas houve diferença no grupo S em comparação aos grupos C e E na intensidade da citocina.

O VEGF evidenciou diferença entre o grupo S e o grupo C, estando mais presente no último. Não houve diferenças entre os grupos S e E e os grupos C e E,

mas houve tendência de diminuição da expressão dos valores de VEGF no grupo E quando confrontado com o grupo C. Nas intensidades de reação à expressão do VEGF, não houve diferença.

O HIF não foi identificado no grupo S. Portanto, quando comparado aos grupos C e E, houve aumento significativo na expressão do marcador quando submetido a isquemia quente ou fria com proteção.

DISCUSSÃO

Os mecanismos de isquemia e reperfusão renal são complexos e envolvem diversas vias como hipóxia, liberação de espécies reativas de oxigênio, acúmulo de neutrófilos, liberação de radicais livres de oxigênio e enzimas líticas. As alterações morfofuncionais resultantes desse processo estão relacionadas ao

tempo de isquemia e à capacidade do tecido de tolerar a anaerobiose^{3,5}.

As análises realizadas do tecido renal concentraram-se principalmente nas alterações do córtex por lá encontrarem-se os túbulos proximais, que apresentam ampla atividade metabólica para a regulação hidroeletrólítica. No processo de I/R, foram concentrados esforços para melhorar as técnicas e diminuir as lesões provocadas. A hipotermia, por sua ação de lentificação do metabolismo celular e redução do estresse oxidativo e da inflamação dos tecidos, tem sido amplamente utilizada com esse fim¹⁰. Ademais, existem soluções preservadoras que também têm por objetivo melhorar os ambientes com características intra ou extracelulares⁸.

Na análise morfométrica, foi possível identificar diferenças significativas entre o grupo S (não submetido a I/R) e os grupos C e E. Nas lesões provocadas nesse segmento renal, ficam evidentes alterações que representam necrose tubular aguda com critérios de microscopia óptica: núcleo picnótico, cariorréxis e/ou ruptura da membrana celular. Essas alterações são amplamente corroboradas pela literatura e evidenciaram a presença de lesões decorrentes do processo de I/R. A isquemia fria associada à solução protetora M&G, nesse quadro que é considerado agudo pelo tempo curto de isquemia (20 min), não foi capaz de impedir alterações estruturais no tecido renal quando comparado ao grupo C. Esse tempo de isquemia é reafirmado evidenciando injúrias relativamente discretas no tecido renal com a isquemia quente¹¹.

As características ideais para a solução preservadora estão vinculadas a menor atividade celular do parênquima renal, menor antigenicidade, agentes osmóticos não tóxicos, substratos energéticos e incorporadores de peróxidos, os quais mantêm mais estável a membrana celular. Além disso, a composição, a pressão e o tempo de perfusão são de extrema importância para a conservação do tecido renal¹².

A produção do TNF-alfa está relacionada a disparos produzidos pelas espécies reativas de oxigênio, decorrentes da I/R. Os efeitos dessa molécula sobre o rim estão relacionados à diminuição do fluxo de sangue glomerular e da taxa de filtração, além de induzir a síntese de outros mediadores pró-inflamatórios, como IL-1. Também aumenta a permeabilidade glomerular, provocando o depósito de fibrina e estimulando a infiltração celular por ativação de moléculas de adesão, como ICAM-1 e selectina, e promove a apoptose^{13,14}.

Quando se avaliou a imuno-histoquímica e, portanto, a contagem de células positivas para o marcador TNF-alfa, identificou-se alterações entre o grupo S e os grupos C e E. Não se observou diferenças entre os grupos C e E, mas, quando se avaliou a intensidade de

reação obtida pela análise dos *pixels*, a intensidade foi maior no grupo C comparado ao grupo E. Isso evidencia uma menor intensidade do processo inflamatório com a solução preservadora M&G. Estudos avaliando o uso de alopurinol na I/R renal também evidenciam diminuição dos níveis de TNF-alfa, semelhante ao observado com a solução M&G¹⁵.

Durante o processo de isquemia e reperfusão, ocorre a liberação de VEGF que tem função de neovascularização, com proliferação, migração e remodelamento endotelial¹⁶. Esse processo é reafirmado por Hao¹⁷, que avaliou a expressão por testes de RNA mensageiro da produção de VEGF, elevada após I/R. No experimento realizado, essa elevação da expressão do VEGF foi identificada comparando os grupos S e C. Na avaliação do grupo E com os demais grupos, não houve diferença estatisticamente significativa. Assim, há uma tendência de diminuição do processo inflamatório e uma menor expressão da angiogênese com o uso da solução preservadora. Normalmente, o endotélio não tem atividade mitótica exacerbada, mas, em decorrência do estímulo produzido pela isquemia e pela maior produção de HIF, estimulando a produção de VEGF, decorre a angiogênese e o aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, regulando a vasculogênese¹⁸.

Sabendo da importância do processo de resposta para a isquemia, foi avaliado o HIF que tem função de regulação proteica, como adaptação tecidual. A inibição do HIF durante a I/R mostra a intensificação da resposta deletéria, enquanto o acúmulo é protetor¹⁹. Não houve diferenças na expressão e intensidade da reação do HIF quando comparados os três grupos. Em avaliações anteriores da solução M&G na infusão durante processo de I/R de membros com variações de tempo de isquemia (180 min), a solução apresentou certa proteção aos tecidos perfundidos comparando períodos maiores de exposição a isquemia na avaliação do HIF e ausência de diferenças entre os grupos quanto ao VEGF⁹.

A IL-8 tem como principal função a capacidade de ativar o processo de ativação leucocitária, favorecendo as lesões provocadas durante a I/R. Normalmente, tem baixa expressão no organismo, mas, ao mínimo estímulo, tende a se elevar durante esse processo²⁰. Nos resultados, não foram encontradas diferenças na expressão entre os grupos, mas evidenciaram-se diferenças na intensidade de coloração, corroborando a expressão baixa em períodos sem a agressão da I/R e mais elevadas em períodos de estresse metabólico.

As limitações do trabalho são vinculadas ao número reduzido de organismos em cada grupo, ao tempo de 20 minutos de isquemia e à não análise comparativa

com outras soluções preservadoras. O processo de proteção renal necessita de mais estudos para ser validado.

■ CONCLUSÃO

O processo de isquemia e reperfusão renal é uma complexa cadeia de reações que podem desencadear alterações moleculares e estruturais. Nesse contexto, identificou-se o efeito protetor da solução M&G a 15 °C comparado com o efeito da isquemia sem infusão da solução preservadora. Verificou-se uma redução da presença e expressão do TNF-alfa, além de tendência de diminuição do VEGF. Não se verificou diferenças nas avaliações de IL-8 e HIF.

■ REFERÊNCIAS

- Macedo E, Mehta RL. Renal recovery after acute kidney injury. *Contrib Nephrol.* 2016;187:24-35. PMID:26882035.
- Jun C, Qingshu L, Ke W, et al. Protective effect of CXCR3 CD4 CD25 Foxp3 regulatory T cells in renal ischemia-reperfusion injury. *Med of Inf.* 2015;2015:1-8. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/360973>.
- Pere LAB, Mocelin AJ, Delfino VDA. Injúria da isquemia/reperfusão: implicações no transplante renal. *J Bras Nefrol.* 2005;27:207-14.
- Molitoris BA. Cellular basis of ischemic acute tubular failure. In Lazarus JM, Brenner BM, editors. *Acute renal failure.* 3rd ed. London: Churchill Livingstone; 1993. p. 1-32.
- Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7(4):189-200. <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2011.16>. PMID:21364518.
- Jang HR, Rabb H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *Clin Immunol.* 2009;130(1):41-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2008.08.016>. PMID:18922742.
- Guibert EE, Petrenko AY, Balaban CL, Somov AY, Rodriguez JV, Fuller BJ. Organ preservation: current concepts and new strategies for the next decade. *Transfus Med Hemother.* 2011;38(2):125-42. <http://dx.doi.org/10.1159/000327033>. PMID:21566713.
- Rosa SD, Antonelli M, Ronco C. Hypothermia and kidney: a focus on ischaemia-reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2017;32(2):241-7. PMID:28186567.
- Guillaumon AT. Proteção tecidual: conceito e perspectivas [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2005.
- Mota MVB, Rogério F. Análise da expressão tecidual de ATPase da Bomba sódio/potássio (subunidade alfa-3) e ATP sinatase mitocondrial (subunidade beta) em espécimes cirúrgicos de pacientes com esclerose hipocampal [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2018.
- Park Y, Hirose R, Dang K, et al. Increased severity of renal ischemia-reperfusion injury with venous clamping compared to arterial clamping in a rat model. *Surgery.* 2008;143(2):243-51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.surg.2007.07.041>. PMID:18242341.
- Guillaumon AT, Figueiredo JF. Estudo experimental em ratos da conservação renal após perfusão e auto transplante. *J Bras Nefrol.* 1995;17(2):115-21.
- Kothari N, Bogra J, Abbas H, et al. Tumor Necrosis Factor gene polymorphism results in high TNF level in sepsis and septic shock. *Cytokine.* 2013;61(2):676-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyt.2012.11.016>. PMID:23317877.
- Donnahoo KK, Shames BD, Harken AH, Meldrum DR. Review article: the role of tumor necrosis factor in renal ischemia-reperfusion injury. *J Urol.* 1999;162(1):196-203. <http://dx.doi.org/10.1097/00005392-199907000-00068>. PMID:10379787.
- Prieto-Moure B, Lloris-Carsí JM, Belda-Antolí N, Toledo-Pereyra LH, Cejalvo-Lapeña D. Allopurinol protective effect of renal ischemia by downregulating TNF- α , IL-1 β , and IL-6 response. *J Invest Surg.* 2017;30(3):143-51. <http://dx.doi.org/10.1080/08941939.2016.1230658>. PMID:27690698.
- Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med.* 2008;358(19):2039-49. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra0706596>. PMID:18463380.
- Hao P. Monitoring of renal ischemia reperfusion injury in rabbits by ultrasonic contrast and its relationship with expression of VEGF in renal tissue. *Asian Pac J Trop Med.* 2016;9(2):188-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.01.006>. PMID:26919954.
- Joško J, Gwózdź B, Jedrzejowska-Szypułka H, Hendryk S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med Sci Monit.* 2000;6(5):1047-52. PMID:11208453.
- Qiu S, Chen X, Pang Y, Zhang Z. Lipocalin-2 protects against renal ischemia/reperfusion injury in mice through autophagy activation mediated by HIF1 α and NF- κ B crosstalk. *Biomed Pharmacother.* 2018;108:244-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.023>. PMID:30219682.
- Araki M, Fahmy N, Zhou L, et al. Expression of IL-8 during reperfusion of renal allografts is dependent on ischemic time. *Transplantation.* 2006;81(5):783-8. <http://dx.doi.org/10.1097/01.tp.0000198736.69527.32>. PMID:16534483.

Correspondência

Leandro Pablos Rossetti
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Departamento de
Cirurgia Vasculard
Rua São Salvador, 220/154, Celeste - Jardim Belo Horizonte
CEP 13076-540 - Campinas (SP), Brasil
Tel: (19) 97144-4428
E-mail: dr.leandrorossetti@gmail.com

Informações sobre os autores

LPR - Mestre em Cirurgia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
LBEC - Mestre e doutora em Patologia Clínica, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
ATG - Professora titular de Cirurgia Vasculard, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Contribuições dos autores

Concepção e desenho do estudo: LPR, LBEC, ATG
Análise e interpretação dos dados: LPR, LBEC, ATG
Coleta de dados: LPR, LBEC
Redação do artigo: LPR, LBEC, ATG
Revisão crítica do texto: LPR, LBEC, ATG
Aprovação final do artigo*: LPR, LBEC, ATG
Análise estatística: LPR
Responsabilidade geral pelo estudo: LPR, LBEC, ATG

*Todos os autores leram e aprovaram a versão final submetida ao
J Vasc Bras.