



**Revista Portuguesa  
de**

# **irurgia**

II Série • N.º 3 • Dezembro 2007

ISSN 1646-6918

Órgão Oficial da Sociedade Portuguesa de Cirurgia

# Colheita de rins em paragem cardíaca – efeito do pré-tratamento do dador com eritropoietina (estudo experimental)

## Donation after cardiac death – pre-treatment of the donor with erythropoietin (experimental study)

*Manuel Fraga Martins Maio<sup>1</sup>, Nuno Filipe Leitão Figueiredo<sup>2</sup>,  
Isa Maria Dias Fernandes dos Santos<sup>3</sup>, Hélder Mota Filipe<sup>4</sup>,  
Afonso Fernandes<sup>5</sup>, Paulo Sérgio Matos da Costa<sup>6</sup>*

<sup>1</sup> Assistente Hospitalar de Cirurgia Geral, Director-Adjunto do Gabinete de Coordenação de Colheitas e Transplantação do Hospital de Santa Maria, “Certified European Transplant Coordinator”, Conselheiro da European Transplant Coordinators Organization – Clínica Universitária de Cirurgia I – Hospital Santa Maria; Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa

<sup>2</sup> Interno do Internato Complementar de Cirurgia Geral, Coordenador de Transplantes do Gabinete de Coordenação de Colheitas e Transplantação do Hospital de Santa Maria – Clínica Universitária de Cirurgia I – Hospital Santa Maria; Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa

<sup>3</sup> Interna do Internato Complementar de Cirurgia Geral – Clínica Universitária de Cirurgia I – Hospital Santa Maria; Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa

<sup>4</sup> Professor Associado de Farmacologia da Universidade de Lisboa – Unidade de Farmacologia e Farmacotoxicologia, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa

<sup>5</sup> Director de Serviço, Chefe de Serviço, Professor Agregado da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa – Serviço de Anatomia Patológica – Hospital de Santa Maria; Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa

<sup>6</sup> Director de Serviço, Chefe de Serviço, Professor Agregado da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Fellow of the Royal College of Surgeons, Fellow of the American College of Surgeons – Clínica Universitária de Cirurgia I – Hospital Santa Maria; Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa

### Contribuições:

Concepção e desenho do trabalho – 1

Aquisição de dados – 1, 2, 3

Análise e Interpretação dos dados – 1, 2, 3, 5

Elaboração do Manuscrito – 1, 2

Revisão Científica – 1, 4, 6

Revisão Crítica – 4, 5, 6

Análise e Revisão dos dados Estatísticos – 1

Pesquisas Bibliográficas – 1, 2, 3



## RESUMO

**Introdução** – Os dadores de coração parado podem reduzir a carência crónica de órgãos para transplante, no entanto, os órgãos provenientes destes dadores estão sujeitos a lesão de isquémia/reperfusão mais intensa, o que vai condicionar os resultados imediatos e à distância do transplante. Demonstrámos recentemente, num modelo de isquémia/reperfusão no rato, o efeito protector da eritropoietina (EPO). O objectivo deste trabalho foi avaliar, num modelo animal de transplantação renal com rins colhidos em paragem circulatória, o efeito sobre o enxerto e o receptor da administração de eritropoietina no dador.

**Material e Métodos** – Num modelo animal (porco) simulámos as condições de colheita renal em paragem cardíaca. Após paragem cardíaca os rins foram submetidos a 30 min de isquémia quente sendo posteriormente colhidos e preservados com Celsior® a 4°C durante 24 horas sendo depois transplantados utilizando um modelo de alo-transplantação renal heterotópica. A um grupo de dadores foi administrado, 30 min antes da paragem cardíaca, 1000 UI/kg/ev de EPO. Colheita de sangue e urina para análise bioquímica e de tecido renal para avaliação histológica. Análise dos dados pelo software Graph Pad Prism Statistical Package (versão 3.0).  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

**Resultados** – A transplantação de rins colhidos em paragem cardíaca resultou num aumento nos níveis de creatinina, N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG), glutatião-S-transferase (GST), AST, LDH, ALT, fracção de excreção de  $\text{Na}^+$ , interleucina 1 e 6, níveis de malondialdeído (MDA) e actividade da mieloperoxidase (MPO), redução significativa do débito urinário e do clearance da creatinina e ainda alterações histológicas ( $p < 0,05$ ). A administração de EPO, 30 min antes da isquémia, reduziu significativamente as alterações bioquímicas e histológicas resultantes da disfunção glomerular e lesão tubular. A EPO também reduziu a lesão sistémica, a resposta inflamatória e o stress oxidativo ( $p < 0,05$ ).

**Conclusões** – Este estudo demonstrou pela 1ª vez que o pré-tratamento do dador com uma dose única de EPO provoca uma redução significativa da disfunção e lesão renal e sistémicas associadas à transplantação de rins colhidos em paragem cardíaca

**PALAVRAS-CHAVE:** Dadores em paragem cardíaca, Transplantação Renal, Lesão de Isquémia-Reperfusão, Eritropoietina.

## ABSTRACT

**Introduction** – Donation after cardiac death offers an interesting alternative to reduce organ shortage. Nevertheless these organs are subjected to a greater ischemia-reperfusion injury which impairs immediate and long term transplant results. We have recently demonstrated an important renal protective effect of erythropoietin (EPO), in a rat ischemia-reperfusion model.

**Material and Methods** – In a pig model we simulated the conditions of donation after cardiac death (DCD) followed by kidney transplant. Cardiac arrest was induced and the kidneys extracted after 30 minutes of warm ischemia, then preserved with Celsior™ at 4°C. Twenty four hours later they were transplanted using a heterotopic technique. In the pre-treated group, 1000 units of EPO/kg were administered 30 minutes before cardiac death. At the end of the experiment, blood, urine and renal tissue samples were collected for analysis. Graph Pad Prism Statistical Package (version 3.0) was used for statistical analysis and  $p < 0,05$  considered statistically significant.

**Results** – Transplantation of DCD kidneys resulted in elevation of serum levels of creatinine, N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG), glutathione-S-transferase (GST), AST, LDH, ALT, sodium excretion fraction, interleukin 1 and 6, malondialdehyde (MDA) and myeloperoxidase activity (MPO). There was also a significant reduction in urinary flow and creatinine clearance ( $p < 0,05$ ). Histological evaluation demonstrated architectural damage and necrosis. EPO administration 30 minutes before ischemia reduced significantly the biochemical and histological changes from glomerular dysfunction and tubular lesion. It also diminished systemic injury, inflammatory response and oxidative stress ( $p < 0,05$ ).

**Conclusion:** Our study demonstrated that donor pre-treatment with a single dose of EPO induces a considerable reduction in kidney dysfunction and systemic injury associated with renal transplantation from DCD donors.

**KEYWORDS:** Donation after cardiac death, Erythropoietin, Renal Transplant, Ischemia-Reperfusion Injury



## INTRODUÇÃO

A transplantação é a melhor e por vezes a única terapêutica para a falência terminal de órgãos. Enquanto o número de candidatas aumenta de uma forma sustentada, o número de dadores permanece sensivelmente constante. Como resultado desta discrepância, actualmente, a maior limitação para a transplantação reside na escassez de órgãos.

A colheita de órgãos em dadores com coração parado, ou seja naqueles que sofreram uma paragem cardíaca irreversível, pode reduzir significativamente esta crítica carência de órgãos. No entanto, o tempo de isquémia a que estes órgãos inevitavelmente estão sujeitos condiciona os resultados imediatos e à distância do transplante, contribuindo para a disfunção precoce do enxerto, para o seu não funcionamento ou para a disfunção crónica, pelo que a utilização dos órgãos destes dadores deve estar associada a estratégias que visem minimizar estas consequências.

Recentemente demonstrou-se que a eritropoietina (EPO), para além do seu bem conhecido efeito eritropoiético, exerce um importante papel citoprotector e anti-apoptótico. Vários estudos *in vivo*, em modelos animais de isquémia cerebral, medular e retiniana, demonstraram o importante efeito neuroprotector da EPO<sup>(1,2)</sup>. A descoberta por Westenfelder e colaboradores da existência do receptor da EPO no rim, particularmente nas células tubulares, mesangiais e nos glomérulos, levou vários grupos a proporem para a EPO um papel protector da lesão de isquémia reperfusão renal. Desde 2003 vários trabalhos mostraram que o tratamento com EPO pode proteger o rim contra este tipo de lesão<sup>(2)</sup>. De facto, em modelos animais de isquémia reperfusão renal a EPO parece inibir a morte celular por apoptose, favorece a regeneração do epitélio tubular e promove a recuperação funcional do rim. Quando administrada em pré-tratamento e em doses elevadas preserva a função tubular e reduz o stress oxidativo<sup>(3,4)</sup>. Num trabalho recentemente publicado, o nosso grupo demonstrou também o efeito protector da EPO num modelo animal (rato) de lesão de isquémia reperfusão hepática<sup>(5)</sup>.

O objectivo deste trabalho foi avaliar, num modelo animal de transplantação renal com rins colhidos em paragem cardíaca, o efeito sobre o enxerto e o receptor da administração de eritropoietina no dador.

## MATERIAL E METODOS:

### • *Animais e protocolo experimental*

Foram utilizados porcos *Landrace*, com peso compreendido entre 40 e 50 kg, os quais foram sujeitos a um esquema de aclimação de duração mínima de duas semanas – realizado à temperatura de 25°C e com ciclos de luz de 14 horas diárias, tendo sido fornecida aos animais alimentação *standard* e água *ad libitum* até às 24 horas anteriores à data da experiência, momento a partir do qual se suspendeu a dieta e se manteve apenas a água. Todos os animais foram manuseados em concordância com a *Guidance in the Operation of the Animals (Scientific Procedures) Act 1986*, publicada pelo *Her Majesty's Stationery Office*, bem como com as regulamentações da Comunidade Europeia (Jornal Oficial da Comunidade Europeia L 358/1 de 18/12/1986).

Os animais foram divididos de forma aleatória em quatro grupos experimentais distintos: (1) Grupo *Valores de Referência* (n=9), (2) Grupo *Tx Controlo* (n=4), (3) Grupo *Tx DPC* (n=4), (4) Grupo *EPO + Tx DPC* (n=4). No grupo de *Valores de Referência*, os animais não sofreram qualquer tipo de procedimento cirúrgico. No grupo de *Tx Controlo*, os porcos foram sujeitos a transplantação renal convencional com rins preservados a 4°C durante 24 horas. No grupo de *Tx DPC* (Dadores em Paragem Cardíaca), os porcos foram sujeitos a transplantação renal com rins colhidos após 30 minutos de paragem cardíaca e preservados a 4°C durante 24 horas. No grupo *EPO + Tx DPC* o transplante renal realizou-se com rins colhidos após 30 minutos de paragem cardíaca e preservados a 4°C durante 24 horas. Neste último grupo administrou-se ao dador, 30 minutos antes da paragem cardíaca, EPO na dose de 1000UI/kg ev. (Fig. 1)



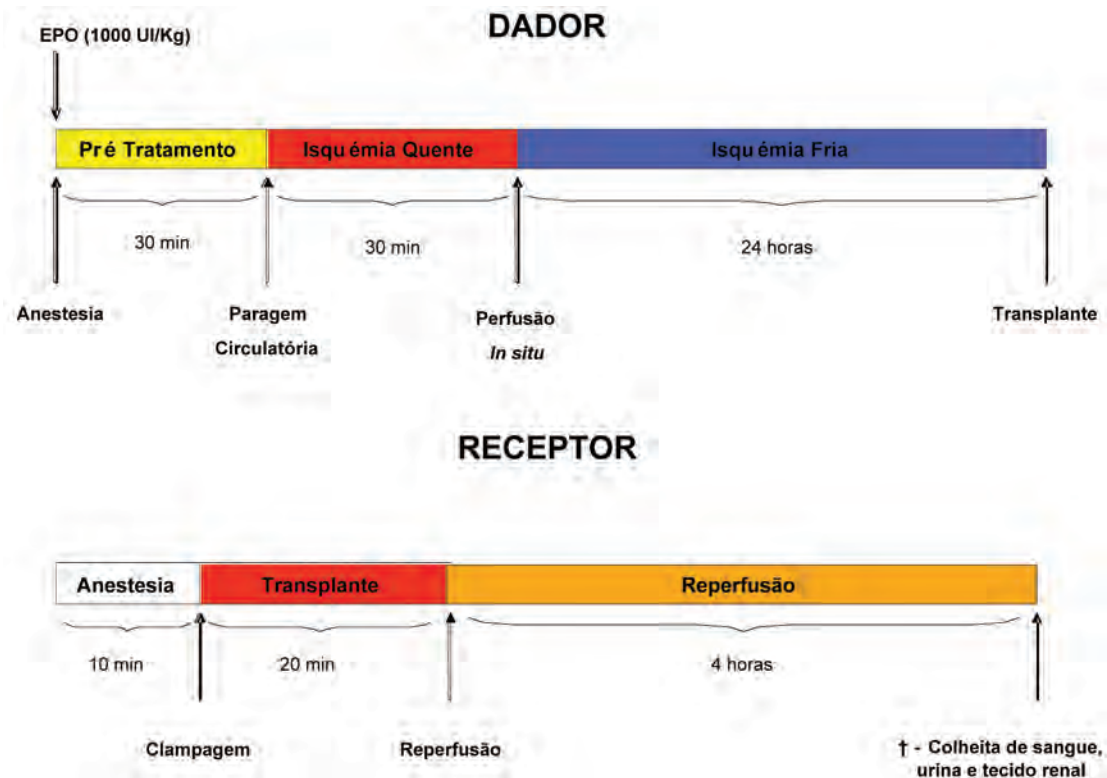


Fig. 1 – Protocolo Experimental

#### • *Procedimentos cirúrgicos*

Os animais incluídos neste estudo foram submetidos a anestesia geral. A indução anestésica foi realizada com ketamina e xylazina e a anestesia geral mantida, após entubação traqueal, com isoflurano numa mistura de ar/oxigénio de (2/1), para que todos os procedimentos cirúrgicos fossem desenvolvidos sob total relaxamento muscular e ausência de sensibilidade. Os porcos anestesiados foram colocados numa marquesa cirúrgica. A temperatura corporal foi mantida a  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  e controlada através de sonda rectal. Foram canuladas duas veias do dorso da orelha para administração de soros e/ou fármacos. A pressão arterial e a frequência cardíaca foram monitorizadas durante toda a experiência e registadas a intervalos de 15 minutos. O preenchimento vascular realizou-se com Lactato de Ringer e soro fisiológico. Administrou-se ainda, a todos os animais, dopamina numa dose de  $10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ .

#### – Colheita renal

Após laparotomia mediana para exposição da cavidade abdominal, procedeu-se à exposição cuidadosa dos órgãos abdominais. A aorta imediatamente abaixo do diafragma, a aorta terminal e a veia cava inferior foram identificadas, isoladas e referenciadas. Após administração sistémica de 10.000 UI de heparina inseriu-se uma canula na aorta terminal e induziu-se a paragem cardíaca através da administração de uma dose letal de pentobarbital de sódio e procedeu-se à clampagem da aorta imediatamente abaixo do diafragma de forma a garantir de forma a assegurar um período de isquémia quente constante para todos os animais. Após 30 minutos de paragem cardíaca iniciou-se a perfusão dos órgãos abdominais, através da canula aórtica, com 4 litros de Lactato de Ringer a  $4^\circ\text{C}$ . A drenagem do efluente efectuou-se para a cavidade peritoneal através de incisão na veia cava inferior.



Para melhor arrefecimento corporal preencheu-se a cavidade peritoneal com gelo. No final da perfusão os rins foram cuidadosamente isolados e o hilo e o uretero expostos. A artéria renal foi colhida com *patch* aórtico e a veia renal seccionada junto à sua inserção na veia cava. Em seguida os rins foram perfundidos, cada um, com ½ litro de solução de preservação de órgãos (Celsior) e preservados no frio, a 4° C, durante 24 horas.

#### – Transplante renal

O modelo experimental utilizado foi o de alotransplantação renal heterotópica. Após laparotomia mediana a aorta terminal e a veia cava infra-renal foram identificadas, isoladas e referenciadas. Depois do isolamento do rim e da laqueação da artéria e veias renais, realizou-se nefrectomia bilateral. Restabelecida a estabilidade hemodinâmica iniciou-se o transplante renal heterotópico do rim colhido no dia anterior (preservado com Celsior a 4°C durante 24 horas) utilizando uma técnica convencional. Foram aplicados clamps vasculares na aorta e na veia cava inferior procedendo-se de seguida a anastomoses termino-laterais com Prolene 5/0 entre a veia renal e a veia cava inferior e entre a artéria renal e a aorta.

Este procedimento demorou  $20 \pm 4$  minutos. Depois da desclampagem e da revisão da hemostase, o uretero foi canulado e a urina colectada. Após 4 horas de reperfusão o enxerto foi removido e colhidos fragmentos para conservação em azoto líquido e formol. No final de cada protocolo experimental foram colhidos cerca de 15 ml de sangue venoso por punção da veia cava para tubos adequados e os animais foram sacrificados recorrendo a uma sobredosagem de pentobarbital de sódio.

#### • *Materiais*

A EPO (Epoetina beta) foi cedida pela Roche (Sintra, Portugal). O Celsior foi cedido pela Genzime (Oeiras, Portugal). Para veículo de administração endovenosa e para preparação de todas as soluções utilizou-se soro fisiológico apirogénico (0.9% NaCl; B. Braun Medical Lda., Queluz, Portugal). O Pentobar-

bital de sódio (Eutasil) foi adquirido a Sanofi Veterinária (Algés, Portugal). Desde que não haja qualquer referência em contrário, todos os outros compostos foram adquiridos a Sigma-Aldrich S.A. (Sintra, Portugal).

#### • *Análise bioquímica dos marcadores de disfunção e lesão renal*

Após livre retracção do coágulo, centrifugaram-se as amostras (3000 rpm, 10 minutos, 25°C), o soro obtido por separação do coágulo foi dividido em alíquotas de amostragem para análise e consequente caracterização bioquímica da disfunção e lesão renais. A urina colectada foi quantificada e colheu-se igualmente amostras para análise. Para calcular a fracção de excreção de  $\text{Na}^+$  ( $\text{FeNa}^+$ ) utilizou-se a fórmula  $\text{Na}^+$  urinário x creatinina plasmática /  $\text{Na}^+$  plasmático x creatinina urinária x 100. Para calcular a clearance da creatinina (ClCr) utilizou-se a fórmula  $\text{creatinina urinária} \times \text{volume urinário} / \text{creatinina plasmática} \times 240$  minutos. As amostras de soro foram enviadas para um laboratório de análises clínicas certificado e qualificado—Laboratório de Química Clínica do Hospital de Santa Maria. Para avaliação da disfunção e/ou lesão renal quantificaram-se os níveis séricos de ureia (indicador da função excretora), creatinina (indicador da taxa de filtração glomerular), aspartato aminotransferase (AST) e gamma-glutamil transferase ( $\gamma$ -GT) enzimas localizados no túbulo contornado proximal, como marcadores de lesão tubular, desidrogenase láctica (LDH, marcador não específico de lesão celular). Determinaram-se ainda os níveis séricos de glicose, sódio, potássio, cloro, cálcio, fósforo e proteínas totais. Para avaliação da resposta inflamatória procedeu-se ao doseamento da interleucina  $1\beta$  ( $\text{IL}_{1\beta}$ ), da interleucina 6 ( $\text{IL}_6$ ) e do Factor de Necrose Tumoral  $\alpha$  ( $\text{TNF-}\alpha$ ).

Na urina determinou-se a concentração de  $\text{Na}^+$ , o que em conjunto com a concentração plasmática de  $\text{Na}^+$  e utilizando a fórmula standard, serviu para calcular a fracção de excreção de  $\text{Na}^+$  ( $\text{FeNa}^+$ ) utilizada como indicador da função tubular. A concentração de creatinina na urina foi quantificada, o que em conjunto com a concentração sérica de creatinina e utili-



zando a fórmula standard serviu para calcular a clearance da creatinina (ClCr), que constitui um indicador da função glomerular. Determinou-se ainda a actividade da N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) e da glutatíão-S-transferase (GST) marcadores muito sensíveis da lesão tubular. Os níveis de ureia, potássio, cloro, glicose e proteínas na urina também foram quantificados.

- **Determinação da actividade da mieloperoxidase (MPO)**

A actividade da mieloperoxidase (MPO) foi utilizada como indicadora da infiltração por polimorfonucleares (PMN) e determinada de acordo com um método previamente descrito<sup>(6)</sup>. No final da experiência, o tecido renal foi pesado e homogeneizado numa solução contendo 0,5% (peso/volume) de brometo de hexadeciltrimetilamónio dissolvido em 10mmol/L de tampão de fosfato de potássio (pH 7,4) e centrifugado durante 30 minutos a 20.000 g a 4°C.

Removeu-se uma alíquota do sobrenadante e adicionou-se uma mistura de reagente contendo 1,6 mmol/L de tetrametilbenzidina e 0,1 mmol/L de peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A taxa de mudança de absorvância foi medida por espectrofotometria a 650nm.

A actividade da MPO foi definida como a quantidade enzima necessária para degradar 1mmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 37°C e foi expressa em mU/100mg de tecido.

- **Determinação dos níveis de malonildialdeído (MDA)**

Os níveis de malonildialdeído (MDA) foram utilizados como indicador da peroxidação lipídica e determinados de acordo com um método previamente descrito<sup>(7)</sup>. O tecido renal colhido foi pesado e homogeneizado numa solução de KCl a 1,15% (peso/volume). Removeu-se uma alíquota de 100 mL que se adicionou a uma mistura contendo 200 mL de lauril sulfato a 8,1% (peso/volume), 1,5 mL de ácido acético (pH 3,5) a 20% (volume/volume), 1,5 mL de ácido tio-barbitúrico a 0,8% (peso/volume) e 700 mL de água destilada.

As amostras foram fervidas durante 1 hora a 95°C e centrifugadas a 3000 g durante 10 minutos. A absor-

vância do sobrenadante foi medida por espectrofotometria a 650nm.

Os níveis de MDA foram expressos em mmol/L MDA/100mg de tecido.

- **Avaliação histológica**

As amostras de rim colhidas no final da experiência foram fixadas durante uma semana numa solução de formaldeído a 10% com tampão PBS. Foram mantidas à temperatura ambiente, desidratadas com etanol, embebidas em Paraplast (Sherwood Medical, Mahwah, NJ, USA) e cortadas em fragmentos com 5 mm de espessura. Os fragmentos foram desparafinados com xilene e corados com hematoxilina – eosina. As lâminas foram observadas por microscopia óptica (Dialux 22 Leitz).

- **Tratamento estatístico**

Para efeito de tratamento estatístico, os dados foram apresentados na forma de média afectada do respectivo erro padrão associado de *n* observações (média  $\pm$  erro padrão), em que *n* corresponde ao número de animais ou amostras de sangue em estudo. No caso de medições repetidas (parâmetros hemodinâmicos) foi efectuada uma análise de variância ANOVA de duas entradas. Resultados, sem medições repetidas associadas, foram tratados através de uma análise de variância ANOVA de uma entrada, seguida de um pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas, utilizando o software Graph Pad Prism Statistical Package (versão 3.0). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para um valor de *p* <0,05.

## RESULTADOS

- **Efeito da EPO nos parâmetros hemodinâmicos**

No grupo Tx DPC, verificou-se uma descida acentuada da pressão arterial média (PAM) nos 30 minutos iniciais da reperfusão, período a partir do qual a PAM mostrou uma ligeira tendência de subida permanecendo depois relativamente estável ao longo da experiência. Estes valores médios são, no entanto, sig-



nificativamente inferiores aos do grupo Tx Controlo ( $p < 0,05$ ). Não ocorreram diferenças estatisticamente significativas da PAM e frequência cardíaca (dados não representados) entre o grupo pré-tratado com EPO e o grupo Tx DPC (Fig. 2).

- *Efeito da EPO na disfunção e lesão renal associada à transplantação de rins colhidos em paragem circulatória*

A transplantação com rins colhidos sem isquémia quente (Tx controlo) resultou no aumento significativo da creatinina, demonstrando o desenvolvimento de lesão glomerular. Não ocorreram contudo, alterações significativas nos marcadores de lesão tubular ou sistémica.

A transplantação com rins colhidos em paragem circulatória (Tx DPC) resultou no aumento muito marcado dos níveis séricos de creatinina, AST, ALT, LDH, fracção de excreção de sódio, NAG, GST e proteinúria e numa diminuição do débito urinário, clearance da creatinina, valores que correspondem ao desenvolvimento de disfunção e lesão glomerular, tubular e sistémica (Figs. 3 a 12).

Nos porcos transplantados com rins colhidos em paragem circulatória, que receberam um pré-tratamento com EPO, não foram detectados aumentos significativos nos níveis séricos de creatinina, AST, fracção de excreção de sódio, NAG, GST, proteinúria, LDH,

ALT, valores que correspondem à existência de protecção no desenvolvimento de disfunção e lesão renal e atenuação da resposta inflamatória (Figs. 3 a 12). A subida de creatinina verificada no grupo em que se transplantaram rins colhidos em paragem circulatória foi atenuada com a administração de EPO ( $p < 0,01$ ) – Fig 3. A subida da fracção de excreção de sódio, da NAG, da GST, da proteinúria e da AST verificada no grupo de Tx com rins colhidos em paragem circulatória foi anulada pela administração de EPO ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$ ;  $p < 0,001$  e  $p < 0,01$  respectivamente) – Figs. 6 a 10. A subida de LDH verificada no grupo de Tx com rins colhidos em paragem circulatória foi anulada com a administração de EPO ( $p < 0,001$ ) – Fig.11. Os valores de ALT no grupo Tx DPC subiram significativamente em relação ao grupo Referência ( $p < 0,001$ ), ao contrário do ocorrido no grupo Tx Controlo. A subida de ALT verificada no grupo dos transplantes com rins colhidos em paragem circulatória foi anulada com a administração de EPO ( $p < 0,001$ ) – Fig.12

Não se observaram diferenças significativas nos níveis séricos de ureia, glicémia, ionograma e hemograma para qualquer um dos grupos experimentais (resultados não apresentados). No grupo a que foi administrado EPO verificaram-se duas trombozes da artéria renal que motivaram, reintervenção para remoção do coágulo e restabelecimento do fluxo sanguíneo. Esta complicação não foi detectada para qualquer um dos restantes grupos experimentais.

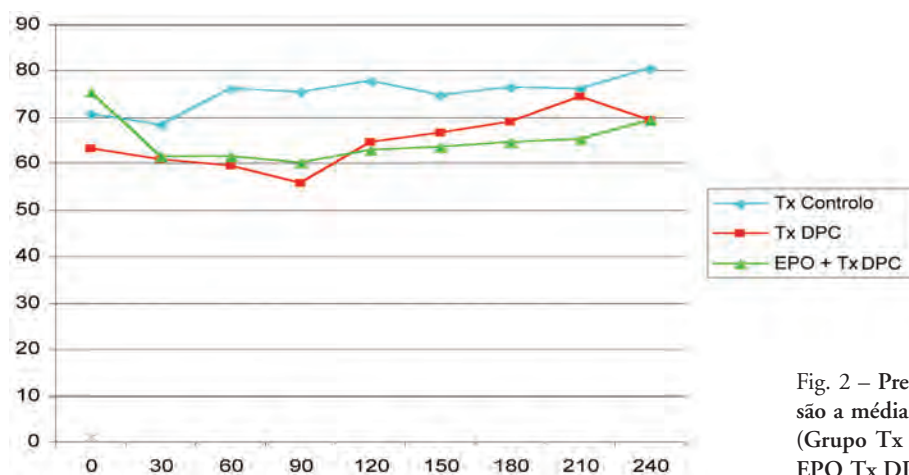


Fig. 2 – Pressão arterial média – Os valores representados são a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) para  $n$  animais (Grupo Tx controlo  $n = 4$ ; Grupo Tx DPC  $n = 4$ ; Grupo EPO Tx DPC  $n = 4$ )





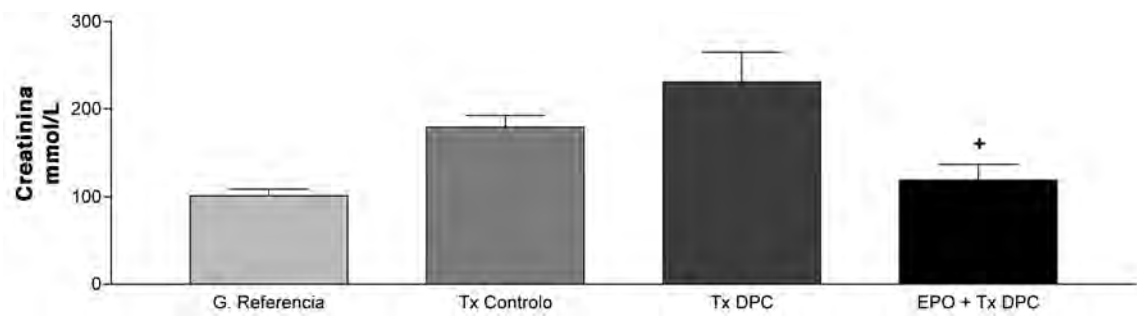


Fig. 3 – Níveis séricos de creatinina. (\* vs Tx Controlo; + vs Tx DPC)

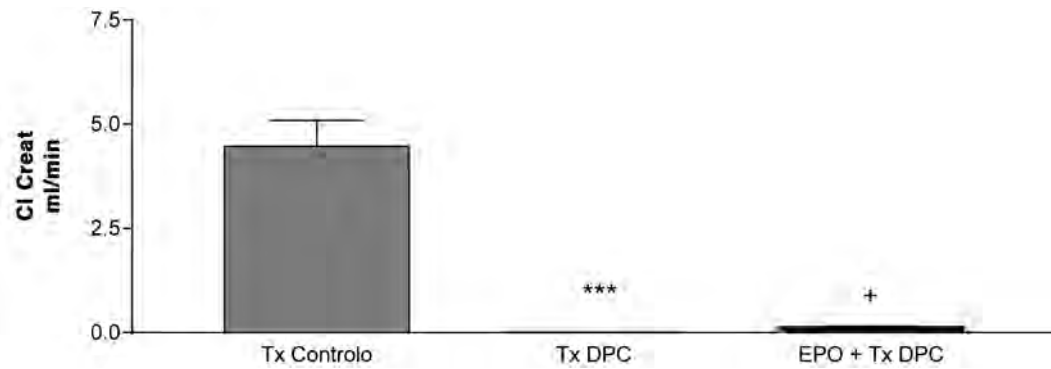


Fig. 4 – Clearance da creatinina. (\* vs Tx Controlo; + vs Tx DPC)

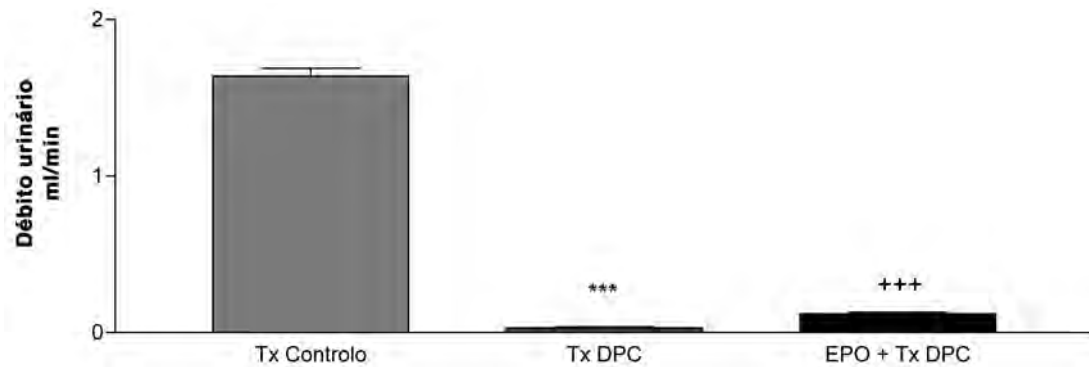


Fig. 5 – Débito urinário (\* vs Tx Controlo; + vs Tx DPC)

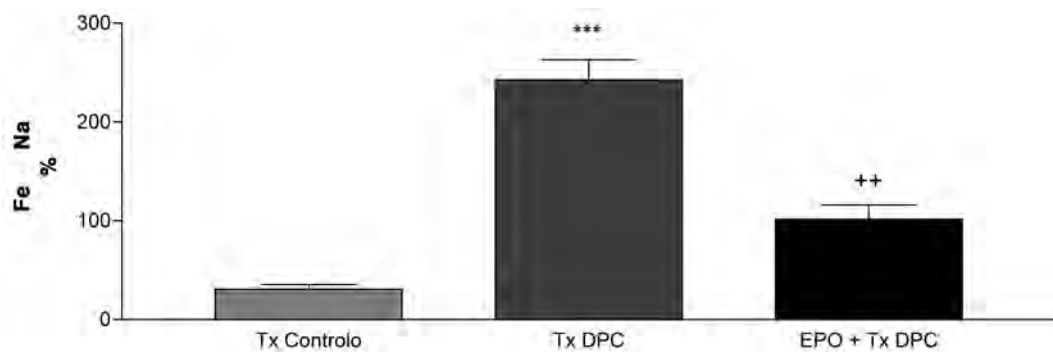


Fig. 6 – Fração de excreção de sódio (\* vs Tx Controlo; + vs Tx DPC)



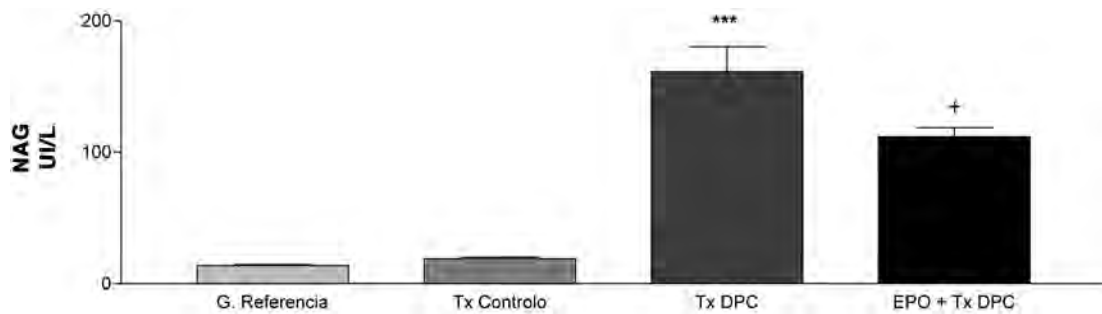


Fig. 7 – Níveis urinários da N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) (\* vs Tx Controlo; + vs Tx DPC)

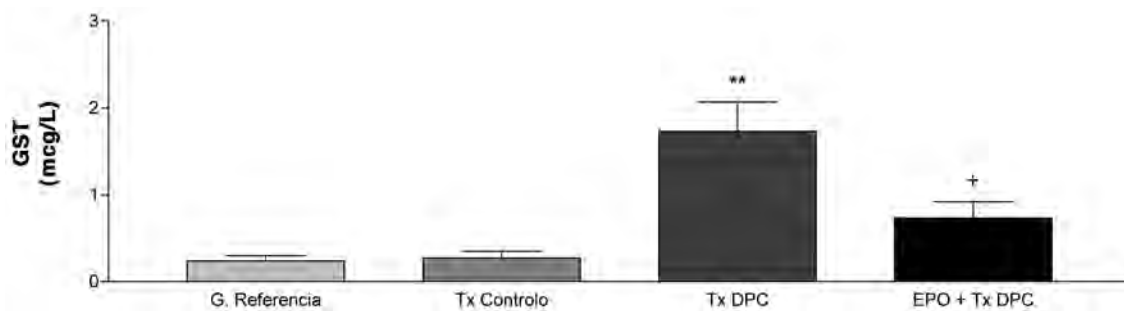


Fig. 8 – Níveis urinários da glutatião-S-transferase (GST) (\* vs Tx Controlo; + vs Tx DPC)

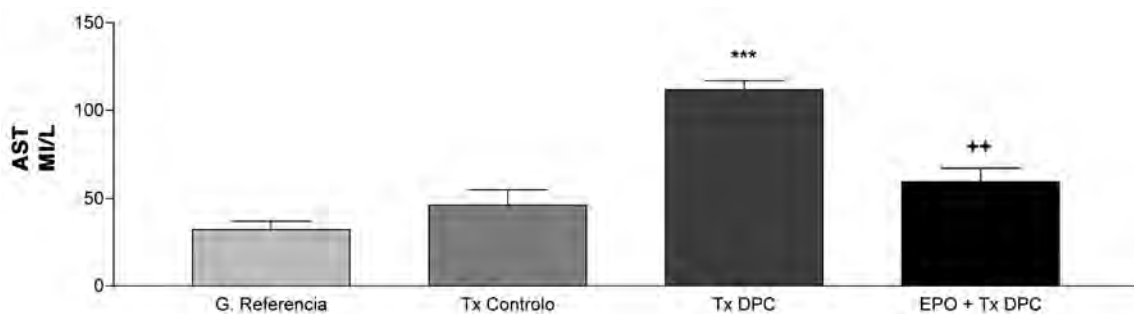


Fig. 9 – Níveis séricos de AST. (\* vs Tx Controlo; + vs Tx DPC)

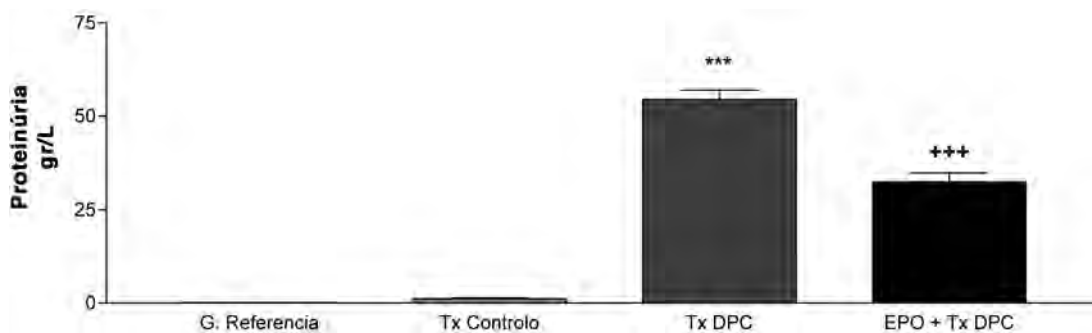


Fig. 10 – Proteinúria (\* vs Tx Controlo; + vs Tx DPC)



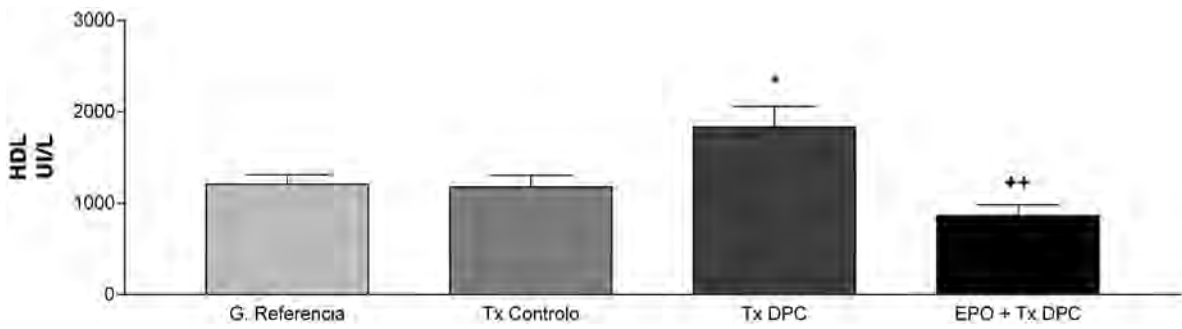


Fig. 11 – Níveis séricos de LDH (\* vs Tx Controlo; + vs Tx DPC)

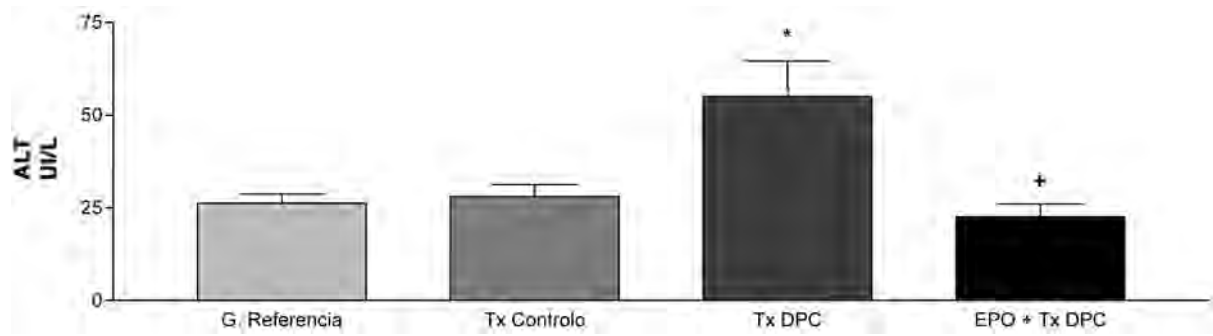


Fig. 12 – Níveis séricos de ALT (\* vs Tx Controlo; + vs Tx DPC)

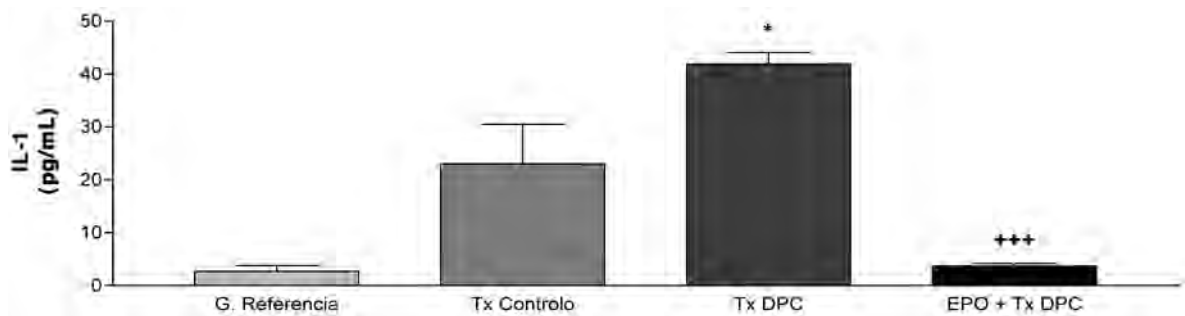


Fig. 13 – Níveis séricos de IL<sub>1</sub> (\* vs Tx Controlo; + vs Tx DPC)

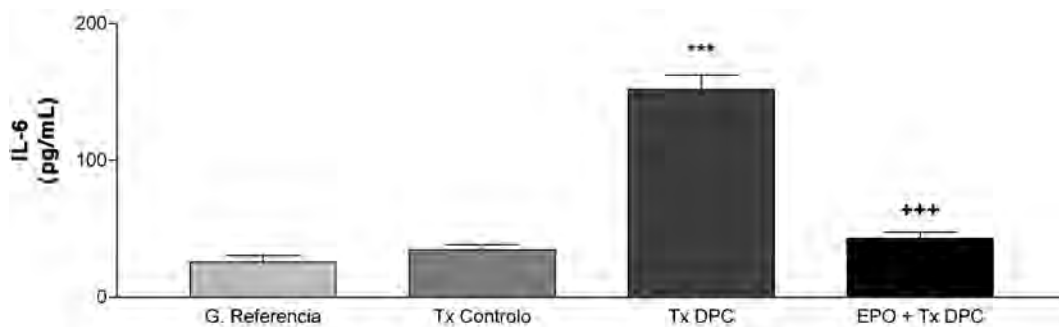


Fig. 14 – Níveis séricos de IL<sub>6</sub> (\* vs Tx Controlo; + vs Tx DPC)



- *Efeito da EPO na resposta inflamatória associada à transplantação de rins colhidos em paragem circulatória*

A transplantação com rins colhidos em paragem circulatória (Tx DPC) resultou no aumento muito marcado dos mediadores inflamatórios IL<sub>1</sub>β, IL<sub>6</sub> e TNFα, da lipoperoxidação (MDA) e da infiltração por polimorfo-

nucleares (MPO) no tecido renal. A forte subida de IL<sub>1</sub>β e IL<sub>6</sub> verificada no grupo Tx DPC comparativamente ao grupo de referência foi anulada com a administração de EPO (p<0,001) – Fig. 13 e 14. A EPO não teve qualquer efeito sobre os níveis de TNFα – Fig.15. O pré-tratamento com EPO reduziu significativamente os níveis de MDA (p<0,0001) e MPO (p<0,05) Fig. 16 e 17.

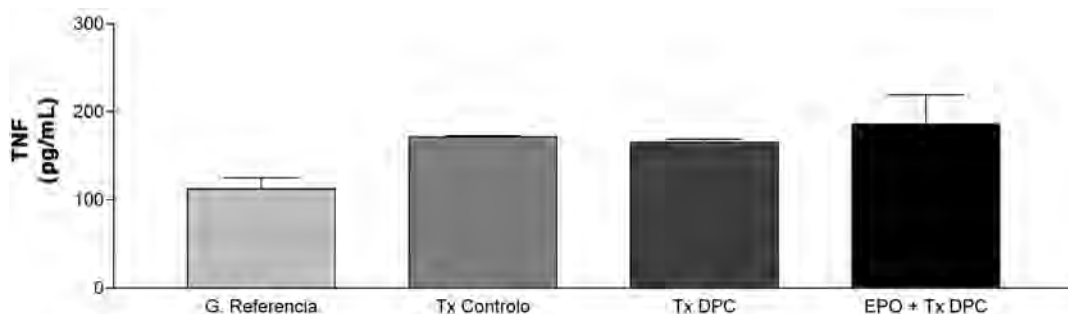


Fig. 15 – Níveis séricos de TNF a (\* vs Tx Controlo; + vs Tx DPC)

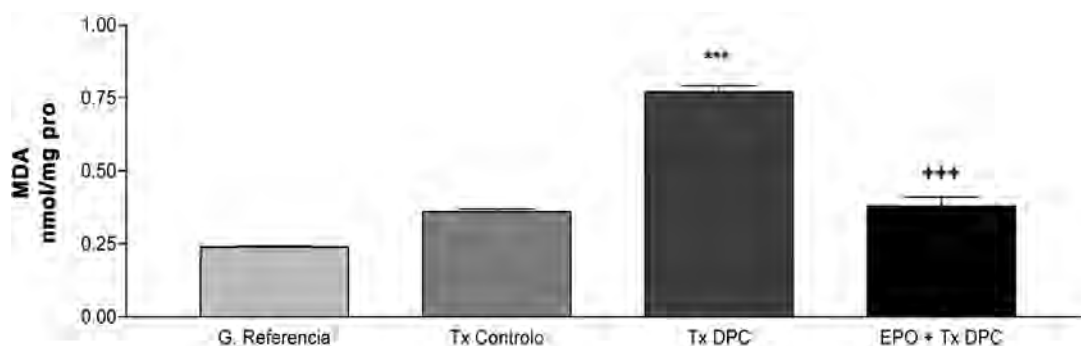


Fig. 16 – Níveis tecidulares de MDA (\* vs Tx Controlo; + vs Tx DPC)

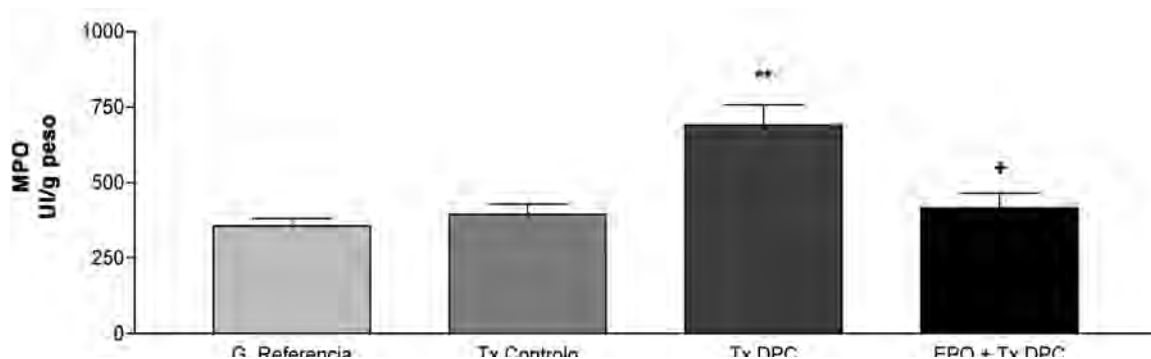


Fig. 17 – Níveis tecidulares de MPO (\* vs Tx Controlo; + vs Tx DPC)



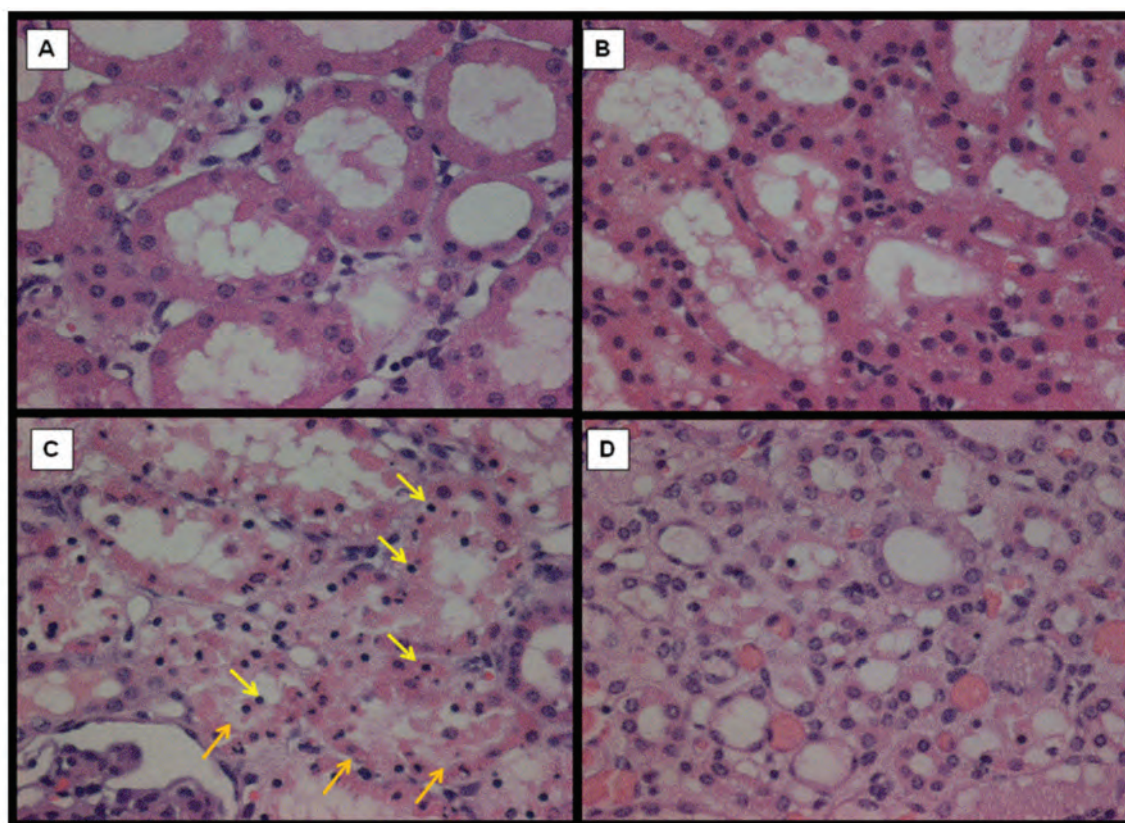


Fig. 18 – Histologia renal (H-E) x400: A – Grupo de Referência; B – Grupo *Tx Control*; C – Grupo *Tx DPC*; D – Grupo *EPO + Tx DPC*; Nos fragmentos de rins transplantados após colheita em paragem cardíaca verificou-se a existência de picnose nuclear, cariórrexis (setas amarelas) e desorganização da arquitetura tubular (setas laranjas).

- *Efeito da EPO nas alterações histológicas resultantes da transplantação de rins colhidos em paragem circulatória*

A transplantação com rins colhidos em paragem circulatória (*Tx DPC*) resultou em alterações muito marcadas nas células tubulares, com morte e descamação celular para o interior dos túbulos. O pré-tratamento do dador reduziu consideravelmente estas alterações. De facto neste grupo, assistiu-se a uma marcada redução das alterações nucleares, da descamação celular e do edema e infiltrado inflamatório intersticial o que é indicativo de menor inflamação e morte celular – Fig.18.

## DISCUSSÃO:

Na transplantação de órgãos, factores intervenientes na doação, preservação e colocação do enxerto contribuem cumulativamente para a lesão isquémica do

órgão. Os efeitos desta lesão são determinantes para o resultado final da transplantação contribuindo para a disfunção aguda e crónica do enxerto, pelo que o controle deste fenómeno inflamatório multifactorial é essencial para o sucesso da transplantação.

Demonstrámos recentemente que: a inibição da poli-ADP-ribose polimerase (PARP) <sup>(9)</sup>, o uso de pequenas moléculas com elevada permeabilidade celular e elevado potencial antioxidante como o 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-*N*-oxil (TEMPOL) <sup>(10)</sup> e a inibição da activação do NF-κB com ditiocarbamatos (DETC) <sup>(11)</sup> reduzem a lesão hepática associada à isquémia reperusão (I/R) no rato.

Neste estudo demonstrámos, no nosso conhecimento pela primeira vez, que num modelo experimental o pré-tratamento do dador com EPO reduz a lesão glomerular, tubular e sistémica resultante da transplantação de rins colhidos em paragem circulató-



ria. Este resultado obteve-se com a administração, no dador, de uma dose única de 1000 UI/kg de EPO 30 minutos antes da paragem circulatória.

O pré-tratamento do dador com doses elevadas de EPO diminuiu significativamente os níveis séricos de creatinina, mantendo o débito urinário e a clearance da creatinina. Obteve-se ainda uma redução significativa da actividade da NAG urinária, da fracção de excreção de sódio, da proteinúria e dos níveis séricos de AST, do GST, da IL<sub>1β</sub> e da IL<sub>6</sub>. Estes resultados apontam para uma marcada redução da disfunção e lesão renais e da resposta inflamatória.

Considerando o aumento nos níveis séricos de LDH e sendo este um marcador de lesão celular inespecífico de órgão, procedeu-se à determinação de marcadores bioquímicos de lesão/disfunção noutra órgão (ALT – como marcador de lesão hepática). Os resultados obtidos apontam para uma marcada disfunção hepática que provavelmente traduz as repercussões sistémicas da lesão por I/R. A transplantação de rins pré-tratados com EPO parece ter minimizado a lesão sistémica já que neste grupo os níveis de ALT são sobreponíveis aos valores de referência.

Analisando a ocorrência de peroxidação lipídica e infiltração por polimorfonucleares (avaliada pelos níveis de MDA e MPO do tecido renal), o pré-tratamento com EPO reduziu os níveis de MDA e de MPO nos rins transplantados provenientes de dadores em paragem circulatória, sugerindo que os efeitos benéficos da EPO poderão estar relacionados com uma diminuição da lesão oxidativa.

A apoptose e a necrose têm sido propostas como os mecanismos que produzem lesão celular em rins submetidos a isquémia<sup>(12)</sup> e qualquer um dos mecanismos pode ser o alvo das acções da EPO.

No que concerne à lesão por I-R do rim, alguns trabalhos têm demonstrado que a apoptose, assim como a necrose, estão associadas a morte celular no rim de ratos submetidos a I-R<sup>(13, 14)</sup> e que a EPO exerce os seus efeitos anti-apoptóticos por indução da proteína bcl-2 no rim e por redução da actividade da caspase-3, tal como já foi observado em células microgliais pré-tratadas com EPO<sup>(15)</sup>.

Os mecanismos de protecção propostos em modelos de I-R do rim, utilizando a mesma dose de EPO (1000 UI/kg) incluem a redução no stress oxidativo<sup>(3)</sup> e em experiências utilizando doses inferiores (300 UI/kg) foi verificada a redução da actividade da caspase-3<sup>(4, 16)</sup> e da morte celular por apoptose<sup>(4)</sup>.

Doses mais elevadas (entre 3000-5000 UI/kg) demonstraram ter a capacidade de aumentar a expressão do Bcl2 e HSP70, também reduzindo a apoptose<sup>(17)</sup>. Mais recentemente tem sido demonstrado que, em culturas de células do túbulo proximal humanas, a EPO reduziu, de forma dependente da concentração, a morte celular e o aumento na actividade da caspase-3 causada pela depleção do ATP (simulação de isquémia) ou peróxido de hidrogénio (stress oxidativo)<sup>(16)</sup>

Os nossos resultados no modelo de Tx renal, com rins colhidos em paragem circulatória, apoiam a teoria de que a EPO é uma citocina com funções de protecção tecidual e esta função parece ser constante para todos os órgãos que expressem o receptor para a EPO.

A possibilidade de utilização de EPO para indução de tolerância a um fenómeno isquémico sugere que este fármaco poderá apresentar vantagem clínica na transplantação de órgãos. Em primeiro lugar, a EPO é um fármaco seguro na prática clínica. Em segundo lugar, a indução de tolerância isquémica parece ser relativamente rápida após a administração única de EPO. Em terceiro lugar, não é necessária a existência de equipamento adicional ou especial para a indução de tolerância no doente.

Contudo, a EPO parece aumentar significativamente o risco de trombose. A administração crónica (3x semana) a adultos jovens saudáveis de 500 UI/kg aumentou a reactividade plaquetária, os níveis plasmáticos de E-selectina e a activação endotelial<sup>(18)</sup>. Apesar deste efeito não estar descrito para administração aguda, devemos destacar que no nosso estudo ocorreram duas tromboses arteriais no grupo pré-tratado com EPO. Na transplantação renal vários factores podem contribuir para a trombose arterial, no entanto, o seu aparecimento apenas no grupo pré-tratado levamos a suspeitar que a administração aguda de doses ele-



vadas de EPO possa também ter tido um efeito pró-coagulante.

## CONCLUSÃO

Este estudo demonstra pela 1ª vez que o pré-tratamento do dador com uma dose única de EPO provo-

cou uma redução significativa da disfunção e lesão renais e sistêmicas associadas à transplantação de rins colhidos em paragem circulatória.

Será necessária a realização de mais ensaios quer experimentais quer clínicos para avaliar as propriedades terapêuticas da EPO na prevenção de lesão por I/R, não apenas no rim, mas também na transplantação de outros órgãos sólidos.

## BIBLIOGRAFIA

1. Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, et al. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:4802-4806
2. Yang C, Li C, Jung J, Shin SJ, Choi BS, Lim SW, et al. Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *FASEB J* 2003; 17:1754-1755
3. Patel NS, Sharples EJ, Cuzzocrea S, Chatterjee PK, Britti D, Yaqoob MM, et al. Pretreatment with EPO reduces the injury and dysfunction caused by ischemia-reperfusion in the mouse kidney in vivo. *Kidney Int* 2004; 66:983-989.
4. Sharples EJ, Patel N, Brown P, Stewart K, Mota-Filipe H, Sheaff M, et al. Erythropoietin protects the kidney against the injury and dysfunction caused by ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:2115-2124.
5. Sepodes B, Maio R, Sharples E, McDonald M, Yaqoob M, Thiernemann C, Mota-Filipe H. Recombinant human erythropoietin protects the liver from hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplant International* 2006
6. Mullane KM, Kraemer R, Smith B: Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Methods* 14:157-167, 1985
7. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-358, 1979
8. McWhinnie DL, Thompson JF, Taylor HM: Morphometric analysis of cellular infiltration assessed by monoclonal antibody labelling in sequential human renal allograft biopsies. *Transplantation* 42:352-358, 1986
9. Mota-Filipe H, Sepodes B, McDonald M, Cuzzocrea S, Pinto R, Thiernemann C. The novel PARP inhibitor 5-aminoisoquinolinone reduces the liver injury caused by ischemia and reperfusion in the rat. *Med Sci Monit* 2002; 8:444-453
10. Sepodes B, Maio R, Pinto R, Marques C, Mendes-do-Vale J, McDonald MC et al. Tempol, an intracellular free radical scavenger, reduces the liver injury in hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Transplant Proc* 2004; 36:849-853
11. R Maio, B Sepodes, N Figueiredo, M McDonald, C Thiernemann, P Costa, H Mota-Filipe: Effects of Diethylthiocarbamate (DETC) on liver injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Transplantation Proceedings*, 2007.
12. Vesey DA et al. Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19:348-355.
13. Yamamoto K, Wilson DR, Baumal R. Outer medullary circulatory defect in ischemic acute renal failure. *Am J Pathol.* 1984 Aug;116(2):253-61
14. Kaushal GP, Singh AB, Shah SV. Identification of gene family of caspases in rat kidney and altered expression in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1998 Mar;274(3 Pt 2):F587-95
15. Vairano M, Dello Russo C, Pozzoli G, Battaglia A, Scambia G, Tringali G, Aloe-Spiriti MA, Preziosi P, Navarra P. Erythropoietin exerts anti-apoptotic effects on rat microglial cells in vitro. *Eur J Neurosci.* 2002 Aug;16(4):584-92
16. Abdelrahman M, Sharples EJ, McDonald MC, Collin M, Patel NS, Yaqoob MM, et al. Erythropoietin attenuates the tissue injury associated with hemorrhagic shock and myocardial ischemia. *Shock* 2004; 22:63
17. Yang C, Li C, Jung J, Shin SJ, Choi BS, Lim SW, et al. Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *FASEB J* 2003; 17:1754-1755
18. Stohlawetz PJ, Dzirilo L, Hergovich N, Lackner E, Mensik C, Eichler HG, Kabrna E, Geissler K, Jilma B. Effects of erythropoietin on platelet reactivity and thrombopoiesis in humans. *Blood.* 2000 May 1;95(9):2983-9

### Correspondência:

RUI MAIO

Cirurgia I – Hospital Santa Maria; Faculdade de Medicina de Lisboa

1600-158 Lisboa – Portugal

Tel.: + 351 – 21 – 780 50 00

Fax: + 351 – 21 – 795 74 72

e-mail: maio.rui@netcabo.pt

