

**Gustavo Scapini**

**Efeito da solução salina hipertônica associada à pentoxifilina sobre a lesão renal aguda após obstrução e isquemia intestinal em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Doutor em Ciências

Programa de Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Samir Rasslan

**São Paulo**

**2016**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Scapini, Gustavo

Efeito da solução salina hipertônica associada à pentoxifilina sobre a lesão renal aguda após obstrução e isquemia intestinal em ratos / Gustavo Scapini. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Clínica cirúrgica.

Orientador: Samir Rasslan.

Descritores: 1.Solução salina hipertônica 2.Pentoxifilina 3.Obstrução intestinal  
4.Inflamação 5.Lesão renal aguda 6.Ratos

USP/FM/DBD-107/16

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Cordeiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

## Dedicatória

---

Aos meus pais, **Eloi e Naracy** (*in memoriam*) pelo maior legado que se pode deixar aos filhos – a educação e os exemplos diários dos preceitos morais e éticos.

À minha esposa **Andréa**, que, ao final de cada ano, ouve esperançosamente a mesma frase – “O próximo ano será mais tranquilo.” O seu amor me fortalece e me estimula a melhorar sempre.

Aos meus filhos, **Matheus e Aimée**, que iluminam cada amanhecer e me motivam a enfrentar todos os desafios.

Aos meus irmãos, **Annarosa e Cassiano**, pelo carinho, apoio e amor que sempre transmitiram, mesmo à distância.

## Agradecimientos

---

### **Agradecimentos especiais**

Ao **Prof. Dr. Samir Rasslan**, Professor Titular Sênior do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Há doze anos tenho o privilégio de aprender e compartilhar da sua experiência e ensinamentos. A todos que perguntam como foi minha formação, tenho profundo orgulho de dizer que sou seguidor do Professor Samir, uma vez que o acompanhei nas andanças dos últimos anos. Muito obrigado pelas aulas, discussões, cirurgias, críticas e elogios.

Com certeza, nossa relação ajudou a moldar meu caráter pessoal e profissional.

Ao colega e amigo **Doutor Roberto Rasslan**, por compartilhar sua linha de pesquisa e trabalho experimental, para o desenvolvimento deste estudo. Seu entusiasmo e dedicação acadêmica são um exemplo para todos os jovens pesquisadores, que desempenham o árduo trabalho de construir e disseminar a pesquisa científica.

À **Divisão de Clínica Cirúrgica III do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, pelo acolhimento e por uma formação especializada de excelência. Sinto-me honrado em fazer parte deste Serviço, construído por cirurgiões de grande prestígio.

Ao **Prof. Dr. Edivaldo Massazo Utiyama**, Professor Titular da Disciplina de Cirurgia Geral e Trauma do Departamento de Cirúrgica da FMUSP, por ser o exemplo de Médico, líder e gestor. Suas interrogações sempre me fizeram pensar se estava explorando ao máximo minhas qualidades.

À **Profa. Dra. Edna Frasson de Souza Montero**, Professora Associada da FMUSP e Coordenadora do Programa de Pós-graduação da Clínica Cirúrgica, por ter sempre uma palavra de incentivo e muitas boas ideias. Certamente este trabalho não teria seguimento se não fosse por sua assertividade.

Ao **Dr. Celso de Oliveira Bernini**, Diretor Técnico do Serviço de Cirurgia de Emergência da Divisão de Clínica Cirúrgica III do Hospital das Clínicas da FMUSP, pelo modelo de Médico e pessoa na relação com os pacientes e colegas de profissão.

Ao **Dr. Fernando da Costa Ferreira Novo**, pelas críticas e sugestões feitas na prova de qualificação e revisão desta tese, e também pelos belos fados cantados durante as longas cirurgias.



Ao **Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva**, docente da Disciplina de Patologia, pela análise histológica deste estudo.

Ao **Prof. Dr. Miguel Ângelo de Góes Junior**, Professor Afiliado da Disciplina de Nefrologia da Escola Paulista de Medicina, pela orientação e direcionamento nas discussões e sua vital relação com a pesquisa experimental e clínica.

Aos funcionários do LIM-62, **Mario Itinoshi, Marco de Luna, Luci Takasaka, Ana Maria Heimbecker e Elisabete Minami**, pela disponibilidade e dedicação no trabalho de laboratório e nos assuntos do LIM 62.

À **Sra. Eliane Falconi Monico Gazzetto**, secretária da pós-graduação do Programa de Clínica Cirúrgica, sempre zelosa e prestativa nos assuntos administrativos.

## Sumário

---

## Sumário

Lista de Figuras

Lista de Gráficos

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1. Introdução .....	01
2. Objetivo .....	10
3. Métodos .....	11
3.1 Amostra .....	12
3.2 Anestesia e preparo dos animais .....	12
3.3 Procedimentos operatórios .....	13
3.4 Preparo para histopatologia do tecido renal .....	15
3.5 Preparo para imuno-histoquímica .....	16
3.5.1 Anticorpos anti-Bax e anti-Bcl-2 .....	16
3.5.2 Reação de TUNEL .....	17
3.5.3 Quantificação do malondialdeído (MDA) no tecido renal .	18
3.5.4 Quantificação do nitrito no tecido renal .....	19
3.6 Análise estatística .....	20
4. Resultados .....	21
4.1 Graduação histopatológica .....	22
4.2 Bax - eventos de apoptose no tecido renal .....	23
4.3 Bcl-2 - eventos de apoptose no tecido renal .....	24
4.4 Índice Bax / Bcl-2 .....	26
4.5 TUNEL - eventos de apoptose no tecido renal .....	27
4.6 MDA no tecido renal .....	29
4.7 Nitrito no tecido renal .....	30
4.8 Estatística aplicada aos grupos de tratamento .....	31
5. Discussão .....	42
6. Conclusão .....	52
7. Anexos .....	54
8. Referências .....	62

## Lista de Gráficos

---

**Lista de Gráficos**

<b>Gráfico 1</b> – Box-plot da graduação histopatológica do tecido renal .....	22
<b>Gráfico 2</b> – Box-plot dos valores do marcador Bax no tecido renal .....	24
<b>Gráfico 3</b> – Box-plot dos valores do marcador Bcl-2 no tecido renal .....	25
<b>Gráfico 4</b> – Box-plot dos valores do índice Bax / Bcl-2.....	27
<b>Gráfico 5</b> – Box-plot dos valores do marcador TUNEL no tecido renal	28
<b>Gráfico 6</b> – Box-plot dos valores do malondialdeído no tecido renal .....	29
<b>Gráfico 7</b> – Box-plot dos valores do nitrito no tecido renal .....	30

## Lista de Tabelas

---

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Graduação histopatológica de lesão renal considerando a porcentagem da área lesada no parênquima renal .....	16
<b>Tabela 2</b> – Valores da graduação histopatológica expressos pelo escore de lesão renal .....	22
<b>Tabela 3</b> – Valores de apoptose no tecido renal para os grupos de estudo analisados pelo Bax .....	23
<b>Tabela 4</b> – Valores de apoptose no tecido renal para os grupos de estudo analisados pelo Bcl-2 .....	25
<b>Tabela 5</b> – Valores do Índice Bax / Bcl-2 para os grupos de estudo .....	26
<b>Tabela 6</b> – Valores de apoptose no tecido renal para os grupos de estudo analisados pelo TUNEL .....	28
<b>Tabela 7</b> – Valores do malondialdeído no tecido renal para os grupos de estudo analisados pelo TBARS .....	29
<b>Tabela 8</b> – Valores do nitrito no tecido renal para os grupos de estudo ...	30
<b>Tabela 9</b> – Coeficiente de correlação de postos de Spearman considerando todos os animais .....	31
<b>Tabela 10</b> – Análise de variância de classificação e postos de Kruskal-Wallis entre o grupo SHPTX versus outros grupos .....	32
<b>Tabela 11</b> – Análise de variância de classificação e postos de Kruskal-Wallis entre os grupos SH ± PTX versus outros grupos .....	33

<b>Tabela 12</b> – Análise de variância de classificação e postos de Kruskal-Wallis entre o grupo SHPTX versus SH .....	34
<b>Tabela 13</b> – Análise de variância de classificação e postos de Kruskal-Wallis entre o grupo SHPTX versus RLPTX .....	35
<b>Tabela 14</b> – Análise de variância de classificação e postos de Kruskal-Wallis entre o grupo SHPTX versus PTX .....	36
<b>Tabela 15</b> – Análise da taxa de comparação e amostras independentes de Mann-Whitney entre os grupos RL + RLPTX versus outros grupos .....	37
<b>Tabela 16</b> – Análise da taxa de comparação e amostras independentes de Mann-Whitney entre o grupo RL versus SH .....	38
<b>Tabela 17</b> – Análise da taxa de comparação e amostras independentes de Mann-Whitney entre o grupo SH versus PTX .....	39
<b>Tabela 18</b> – Análise da taxa de comparação e amostras independentes de Mann-Whitney entre o grupo RL versus PTX .....	40
<b>Tabela 19</b> – Análise da taxa de comparação e amostras independentes de Mann-Whitney entre o grupo Controle versus outros grupos .....	41



## Lista de Abreviaturas e Símbolos

---

<b>Bad</b>	Bcl-2-associated death promoter
<b>Bak</b>	Bcl-2 homologous antagonist/killer
<b>Bax</b>	bcl-2-like protein 4
<b>Bcl-2</b>	B-cell lymphoma protein 2
<b>Bcl-B</b>	Bcl-2-like protein 10
<b>Bcl-W</b>	Bcl-2-like protein 2
<b>Bcl-X</b>	Bcl-2-like protein 1
<b>Bid</b>	BH3 interacting-domain death agonist
<b>Bim</b>	Bcl-2-like protein 11
<b>Bok</b>	Bcl-2-interacting killer
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>FAS</b>	Tumor necrosis factor receptor
<b>HE</b>	Coloração de hematoxilina-eosina
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>LIM-62</b>	Laboratório de Fisiopatologia Cirúrgica
<b>LRA</b>	Lesão renal aguda
<b>Mcl-1</b>	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>NF-K<math>\beta</math></b>	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
<b>p</b>	Nível descritivo do valor
<b>PTX</b>	Pentoxifilina
<b>RL</b>	Ringer lactato
<b>RLPTX</b>	Ringer lactato + Pentoxifilina
<b>SH</b>	Solução salina hipertônica
<b>SHPTX</b>	Solução salina hipertônica + Pentoxifilina
<b>SIRS</b>	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
<b>TBARS</b>	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral
<b>TUNEL</b>	Terminal deoxinucleotidil transferase Uracil Nick End Labelling
<b>X<sup>2</sup></b>	Valor da tabela de probabilidades
<b>Z</b>	Valor da tabela da distribuição normal
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitros
<b><math>\mu</math>m</b>	Micrômetros
<b><math>\mu</math>mol</b>	Micromoles
<b>cm</b>	Centímetros
<b>g</b>	Gramas
<b>kg</b>	Quilogramas
<b>L</b>	Litros
<b>M</b>	Massa molar
<b>mg</b>	Miligramas
<b>mL</b>	Mililitros
<b>n</b>	Número de elementos do conjunto
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>nmol</b>	Nanomoles

## Resumo

---

## Resumo

Scapini G. *Efeito da solução salina hipertônica associada à pentoxifilina sobre a lesão renal aguda após obstrução e isquemia intestinal em ratos* [Tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

**Introdução:** O tratamento da lesão renal aguda decorrente do processo inflamatório sistêmico e sepse é um desafio à prática clínica. A reanimação volêmica promove o aumento da sobrevida e menos complicações sistêmicas. Entretanto, persiste a controvérsia sobre qual o melhor fluido para a reposição e outras medicações que possam auxiliar nessa terapêutica. O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos do Ringer lactato, da solução salina hipertônica e da pentoxifilina sobre a lesão renal aguda decorrente da obstrução e isquemia intestinal, em um modelo experimental.

**Métodos:** Foram utilizados 48 ratos Wistar machos, com peso entre 250 e 300 g. Os animais foram submetidos a laparotomia mediana para obstrução em alça fechada do íleo terminal associada a oclusão do pedículo vascular deste segmento. Após 24 horas, os animais foram reoperados e distribuídos em grupos (n = 8), conforme o tratamento: sem reanimação volêmica (Controle); Ringer lactato - 32 mL / kg (RL); solução salina hipertônica 7,5% - 4 mL / kg (SH); pentoxifilina 25 mg / kg (PTX); Ringer lactato e pentoxifilina (RLPTX); solução salina hipertônica e pentoxifilina (SHPTX). Ao término do tratamento, o segmento intestinal obstruído e isquêmico foi ressecado e o trânsito intestinal foi reconstruído por anastomose primária. Após três horas, os animais foram sacrificados. Amostras de tecido renal foram coletadas para análise histológica

com hematoxilina-eosina, imuno-histoquímica com Bcl-2, Bax e TUNEL e dosagem de malondialdeído e nitrito.

**Resultados:** Em relação aos achados histológicos, não houve diferença significativa entre os grupos. A avaliação imuno-histoquímica demonstrou que o grupo SHPTX apresentou menos eventos de apoptose e produção de óxido nítrico do que os demais grupos ( $p < 0,01$ ). Já os grupos com reposição volêmica (RL e SH) também apresentaram menos eventos de apoptose ( $p < 0,05$ ) do que os grupos Controle e PTX.

**Conclusão:** A pentoxifilina associada à solução salina hipertônica 7,5%, em modelo de obstrução e isquemia intestinal em ratos, atenua a lesão renal, especialmente aquela relacionada a apoptose das células renais.

**Descritores:** solução salina hipertônica; pentoxifilina; obstrução intestinal; Inflamação; lesão renal; ratos.

## Abstract

---

**Abstract**

Scapini G. *Effect of hypertonic saline solution associated to pentoxifylline on acute renal failure after obstruction and intestinal ischemia in rats* [Thesis] São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

**Background:** Treatment of acute kidney injury due to systemic inflammatory response syndrome and sepsis is a challenge in clinical practice. Fluid resuscitation promotes increased survival and lower systemic complications, though some discussions related to best fluid and medications that should be used persist. This study aims to evaluate the effects of Ringer lactate, hypertonic saline solution and pentoxifylline on acute kidney injury due to intestinal obstruction and ischemia in an experimental model.

**Methods:** 48 male Wistar rats weighing between 250 and 300 g were used. The animals underwent laparotomy for closed loop obstruction of the terminal ileum associated with occlusion of the vascular pedicle of this segment. After 24 hours, the animals were re-operated and divided in six groups (n = 8), according to treatment: no fluid resuscitation (Control); Ringer lactate - 32 mL / kg (RL); hypertonic saline solution 7,5% - 4 mL / kg (SH); pentoxifylline 25 mg / kg (PTX); Ringer lactate and pentoxifylline (RLPTX); hypertonic saline solution and pentoxifylline (SHPTX). After treatment, the obstructed and ischemic intestinal segment was resected and intestinal transit was reestablished by primary anastomosis. After three hours, the animals were euthanized. Kidney tissue samples were collected for histological analysis with hematoxylin-eosin, immunohistochemistry with Bcl-2, Bax and TUNEL and malondialdehyde and nitrite dosage.

**Results:** Regarding histological findings, there was no significant difference between groups. In Immunohistochemical evaluation, the group SHPTX had less apoptosis events and nitric oxide production than the other groups ( $p < 0,01$ ). The groups that received fluid resuscitation (RL and SH) also had fewer apoptotic events ( $p < 0,05$ ) than the group Control and the group PTX.

**Conclusion:** Pentoxifylline associated with hypertonic saline 7,5%, in an experimental rat model of obstruction and intestinal ischemia, attenuates renal injury, especially as evaluated by apoptosis of renal cell.

**Descriptors:** saline solution, hypertonic; pentoxifylline; intestinal obstruction; inflammation; acute kidney injury; rats.



## 1. Introdução

---

Das urgências abdominais não traumáticas, o abdômen agudo obstrutivo é a segunda condição mais frequente. Quando ocorrem obstrução e isquemia intestinal, segue-se uma plêiade de complicações relacionadas com a inflamação e a sepse <sup>1</sup>. Nesse contexto, a lesão renal aguda (LRA) é uma das alterações mais precoces e insidiosas. A melhor maneira de tratá-la ainda é motivo de ampla discussão, especialmente no que se refere às soluções de reposição hidroeletrólítica <sup>2</sup>.

Na etiopatogenia do abdômen agudo, a obstrução e a isquemia intestinal estão associadas com alta morbidade e letalidade. Considerando-se a repercussão para o organismo, inicia-se uma intensa síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS), contribuindo para uma série de complicações <sup>3</sup>.

Na fisiopatogenia da obstrução intestinal, os movimentos peristálticos diminuem, ocasionando náusea, vômito e distensão intestinal. Esse quadro, por um lado, limita a reposição de água e nutrientes por via enteral e, por outro, ocasiona grande perda de líquidos do espaço intravascular para a luz do intestino e para os espaços intersticial e extracelular <sup>4</sup>.

Do ponto de vista bioquímico e microbiológico, diversos mediadores químicos são produzidos e liberados, contribuindo para a disfunção da homeostase <sup>5, 6</sup>.

A translocação bacteriana é facilitada pela diminuição dos mecanismos de defesa locais e sistêmicos e a sepse apresenta-se já como um fator complicador em 20-30%, dos casos no momento do diagnóstico <sup>7, 8</sup>.

No contexto clínico do tratamento, Rivers e cols. <sup>9</sup> já demonstraram a importância da reanimação volêmica agressiva, associada ao uso adequado e precoce dos antibióticos. A fase inicial, denominada “hora de ouro”, baseia-se na restauração do estado hemodinâmico com reposição do volume

intravascular e ajuste da oferta e demanda do oxigênio <sup>10, 11</sup>. O tratamento operatório, preferencialmente após a compensação clínica inicial, visa ressecar o segmento intestinal doente, a limpeza da cavidade abdominal e a reconstrução do trânsito <sup>1, 12</sup>.

Neste cenário de inflamação sistêmica e reposição volêmica, o rim é um dos primeiros órgãos a sofrer com as alterações sistêmicas, e precisa adaptar-se rapidamente em resposta aos mediadores químicos circulantes e às alterações de perfusão associadas com a diminuição da pressão arterial média e a vasodilatação sistêmica <sup>13</sup>. Precocemente, ocorre a ativação do sistema nervoso simpático, renina-angiotensina-aldosterona e vasopressina, pela diminuição da perfusão renal. Esses sistemas modificam a regulação da pressão das arteríolas glomerulares, levando a retenção de água e eletrólitos no organismo, tendendo a preservar a circulação sistêmica. Entretanto, ocorre sério prejuízo da perfusão renal, ocasionando diminuição da taxa de filtração glomerular, oligúria e alterações hidroeletrólíticas e metabólicas que, caracterizam clinicamente a LRA <sup>14,15,16</sup>.

Além das alterações funcionais, na fase precoce, ocorrem alterações histopatológicas, caracterizadas por lesões nas células glomerulares e tubulares, enquanto que, na fase tardia, há proliferação e migração dos fibroblastos para a matriz extracelular com formação de fibrose e perda de néfrons, achados característicos da necrose tubular aguda <sup>17, 18</sup>. Até recentemente, acreditava-se que esse conjunto de lesões era resultado exclusivamente da necrose celular. Nas últimas décadas, outro padrão de lesão foi reconhecido e tem sido mais amplamente estudado – a apoptose <sup>19</sup>.

No mecanismo de apoptose, termo cunhado por Kerr, Wyllie e Currie em 1972<sup>19</sup>, existe uma redução do tamanho da célula, com perda das microvilosidades e junções celulares. A célula fragmenta-se em uma série de corpúsculos condensados em membrana, estimulando a fagocitose pelas células vizinhas e produzindo pouca ou nenhuma inflamação. É um mecanismo mais brando de destruição celular do que a necrose, na qual há edema das organelas, perda da integridade da membrana plasmática e ruptura da célula, provocando uma resposta inflamatória bem mais intensa<sup>19, 20</sup>.

Pesquisas recentes sugerem que um mesmo tipo de agressão pode ativar a cascata relacionada à morte celular tanto por necrose como por apoptose, seguindo caminhos comuns<sup>21, 22</sup>, pois essas alterações celulares são controladas por genes específicos que ativam duas grandes vias – os receptores de morte celular (FAS) e a via mitocondrial<sup>23, 24</sup>.

Os receptores FAS estão localizados na superfície das células e desencadeiam a via extrínseca de morte celular. A via mitocondrial é controlada pela família das proteínas Bcl-2 (B-cell lymphoma protein 2) e é responsável pela via intrínseca da morte celular, embora possa participar também secundariamente da via extrínseca<sup>25, 26</sup>.

O Bcl-2 é um protooncogene, descoberto no linfoma não Hodgkin humano, cuja função biológica é suprimir a morte celular programada e a sua eficácia é proporcional ao nível de expressão proteica. Foram identificadas mais de vinte proteínas da família Bcl-2, agrupadas em subfamílias relacionadas à similaridade da sequência de aminoácidos e função<sup>26</sup>:

- Pró-apoptose – **Bax**, Bak, Bok, Bim, Bid e Bad
- Anti-apoptose – **Bcl-2**, Bcl-X, Bcl-W, Bcl-B e Mcl-1

Uma vez que a célula recebe o estímulo para apoptose, algumas enzimas proteolíticas passam a ser produzidas e ativadas <sup>21</sup>.

A melhor compreensão desses mecanismos demonstrou que a condensação da cromatina e a fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA) são as marcas morfológicas de apoptose em modelos de LRA <sup>27</sup>.

Os primeiros a descrever esse fenômeno foram Schumer e cols. <sup>28</sup>, que detectaram a fragmentação do DNA no córtex renal 12 horas após a reperfusão do órgão. Da mesma forma, vários estudos usando técnicas de imunohistoquímica têm relatado esse padrão típico de lesão, depois de submeter os rins a diferentes mecanismos de lesão <sup>28, 29</sup>.

Esse complexo mecanismo de morte celular, no qual vários fatores influenciam o equilíbrio entre mediadores pró e anti-apoptóticos é fundamental para compreender o tipo de lesão que a célula está sofrendo. Com o estudo dos genes Bcl-2 e Bax, associado aos marcadores de fragmentação da cromatina nuclear como o TUNEL (Terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labelling), é possível identificar e diferenciar o tipo de lesão renal mais prevalente <sup>30, 31</sup>.

Além de melhorar a compreensão do tipo de lesão celular renal associada ao quadro inflamatório, é preciso também entender como as soluções de reposição volêmica afetam o funcionamento do rim <sup>24, 25</sup>. Das soluções mais amplamente usadas, destacam-se o Ringer lactato (RL), o soro fisiológico e a solução salina hipertônica 7,5% (SH) <sup>32, 33</sup>.

O Ringer lactato, apesar de ter seu uso bastante difundido, está associado com a exacerbação da resposta inflamatória nos modelos de choque hipovolêmico, ativação de neutrófilos, aumento de morte celular por apoptose e disfunção

endotelial <sup>34, 35</sup>. Mesmo após a estabilização da condição hemodinâmica do doente, persiste a disfunção da microcirculação e suas consequências, como a isquemia tecidual <sup>34</sup>.

Em virtude dos efeitos deletérios do RL, principalmente na ativação da resposta inflamatória, tem sido estimulado o estudo de novas soluções na reanimação volêmica <sup>36, 37, 38</sup>.

Velasco e cols. <sup>39</sup> foram os pioneiros no estudo da SH associado aos coloides no choque hipovolêmico. Eles observaram que a infusão intravenosa de 10% do volume sanguíneo perdido promovia a restauração das condições hemodinâmicas. Na mesma ocasião, esse grupo de pesquisadores testou a SH em doze doentes com choque de etiologia distinta, refratário a volume e droga vasoativa, e constataram reversão instantânea do choque em onze deles.

Tais observações desencadearam o interesse pelo tema, estimulando vários estudos experimentais e clínicos, desde traumatizados até doentes sépticos.

As alterações hemodinâmicas observadas com o uso da SH são decorrentes da melhora da contratilidade miocárdica e débito cardíaco, aumento da pré-carga, diminuição do pós-carga e restauração da microcirculação <sup>40, 41</sup>.

A solução salina hipertônica tem a propriedade de modular a resposta imune e inflamatória. Esta característica é atribuída à inibição da interação leucócito-endotélio e atenuação da infiltração de neutrófilos nos tecidos <sup>42, 43</sup>, além da inibição da fosforilação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) que é um regulador pleiotrópico de muitos genes envolvidos na resposta imune e inflamatória de fase aguda <sup>44, 45</sup>.

Em virtude dos efeitos da SH no cenário experimental, Hannemann e cols. <sup>46</sup> estudaram essa solução em doentes com sepse, e obtiveram aumento na

oferta de oxigênio e débito cardíaco. Porém, as alterações hemodinâmicas tiveram curta duração.

Em 2012, um estudo prospectivo randomizado proposto por van Haren e cols.<sup>47</sup> analisou o uso da SH em doentes com choque séptico. Os autores constataram a melhora dos parâmetros hemodinâmicos envolvendo a contratilidade cardíaca e o tônus vascular, porém sem alteração da microcirculação.

Tendo em vista a relevância da resposta inflamatória tanto local quanto sistêmica, tem-se desenvolvido pesquisas associando a terapêutica farmacológica às soluções de reanimação<sup>48, 49</sup>.

Nesse contexto, a pentoxifilina (PTX) aparece em destaque por suas propriedades de modificar a conformação das hemácias, promover a melhora do fluxo sanguíneo na microcirculação e diminuir a atividade inflamatória pela menor ativação de neutrófilos e produção do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ )<sup>50, 51</sup>. Por essas propriedades a PTX já tem o uso clínico preconizado na insuficiência arterial crônica<sup>52</sup> e hepatite alcoólica<sup>53</sup>.

Ainda, a translocação bacteriana induzida pelo choque hipovolêmico foi reduzida em animais tratados com este fármaco, conforme relato de Koyluoglu e cols.<sup>54</sup>. Em modelo de obstrução intestinal, com ligadura do íleo distal, o uso da PTX também diminuiu a translocação bacteriana, apesar de não haver diferença nos níveis do TNF- $\alpha$ <sup>55</sup>.

Alguns estudos clínicos propuseram o uso da pentoxifilina na sepse grave e choque séptico. Staubach e cols.<sup>56</sup>, em estudo duplo cego randomizado, não constataram diferença de mortalidade entre o grupo PTX e o placebo, porém descreveram melhora nos parâmetros cardiorrespiratórios.

Em virtude dos efeitos benéficos isolados encontrados com o uso da SH e da PTX, alguns autores passaram a estudar o uso combinado dessas substâncias<sup>57</sup>. O racional dessa associação é a modulação da atividade inflamatória, adaptação das hemácias às alterações da microcirculação e a restrição de volume administrado<sup>58</sup>.

Assim, propusemos este estudo para avaliar e mensurar os resultados obtidos com o uso das diferentes soluções de reanimação volêmica, associados ou não à pentoxifilina, nos processos de lesão renal aguda decorrentes da obstrução e isquemia intestinal em ratos.



## 2. Objetivo

---

Avaliar o efeito da reanimação volêmica com Ringer lactato, solução salina hipertônica 7,5% e pentoxifilina, isolados ou em combinação, sobre a lesão renal aguda em um modelo de abdômen agudo por obstrução e isquemia intestinal em ratos.

### 3. Métodos

---

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número 239/13 proveniente do protocolo 172/11<sup>59</sup>. Todos os animais foram manipulados segundo os princípios do National Institute of Health (1985) e The American Physiological Society (1995) para o cuidado, manipulação e utilização dos animais de laboratório.

A conservação das amostras e coleta de dados foi realizada no Laboratório de Fisiopatologia Cirúrgica (LIM-62) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

### **3.1. Amostra**

Foram utilizados 48 ratos Wistar, machos, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com peso de 250 a 300 g. Os animais foram mantidos em ambiente controlado para temperatura (23 °C), umidade e exposição à luz artificial, com ciclo claro-escuro de doze horas e com livre acesso a ração e água na fase pré-operatória e água no pós-operatório.

### **3.2. Anestesia e preparo dos animais**

Os animais foram manipulados sob anestesia geral com injeção intraperitoneal de solução de cetamina (50 mg / kg) associada a xilazina (10 mg / kg). Logo após o efeito do anestésico, foi realizada tricotomia cervical e abdominal, com

antisepsia local. Para a manutenção do plano anestésico, doses complementares da solução foram administradas pela mesma via.

### **3.3. Procedimentos operatórios**

Os animais anestesiados foram submetidos a laparotomia mediana de 3 a 4 cm, com exposição do ceco e identificação da válvula íleocecal. Foi realizada a ligadura do íleo terminal em dois pontos com fio de algodão 4-0, a aproximadamente 1,5 cm e 10 cm da válvula ileocecal, determinando a obstrução intestinal em alça fechada do segmento. Em seguida, foi feita a ligadura vascular dos ramos mesentéricos nutridores desse segmento, provocando isquemia do segmento obstruído.

O fechamento da parede abdominal foi feito com sutura contínua do plano peritônio-aponeurótico e a pele foi suturada com pontos simples de mononylon 4-0. A duração do procedimento foi de aproximadamente  $11 \pm 3$  minutos.

Os animais foram mantidos em ambiente controlado para temperatura e umidade, com livre acesso a água e jejum para sólidos.

Após 24 horas de obstrução e isquemia intestinal segmentar, os animais foram novamente anestesiados, conforme o protocolo descrito acima. Iniciou-se o procedimento por um acesso cervical à direita, para cateterização da veia jugular e artéria carótida com Intracath 22 gauges (Becton–Dickson, EUA), para a infusão das soluções em estudo.

Os 48 animais foram sorteados para distribuição em seis grupos de oito animais cada:

- Grupo sem infusão de solução – Lesão máxima – **Controle**;
- Grupo com infusão de Ringer lactato (32 mL / kg) – **RL**;
- Grupo com infusão de solução salina hipertônica 7,5% (4 mL / kg) – **SH**;
- Grupo com infusão de pentoxifilina (25 mg / kg) – **PTX\***;
- Grupo com infusão de Ringer lactato (32 mL / kg) associado com pentoxifilina (25 mg / kg) – **RLPTX**;
- Grupo com infusão de solução salina hipertônica 7,5% (4 mL / kg) associado com pentoxifilina (25 mg / kg) – **SHPTX**.

\* PTX apresentação: 20 mg / mL. Volume administrado: 0,3 a 0,4 mL

A administração das soluções, conforme a descrição dos grupos acima, foi feita por injeção lenta, em seringa, através do acesso venoso cervical. Após 30 minutos da administração, procedeu-se a laparotomia pela incisão da véspera, observando-se a isquemia do segmento ileal e distensão do intestino delgado.

O intestino isquêmico foi ressecado e o trânsito intestinal foi reconstruído por anastomose término-terminal do íleo em plano único total com pontos separados com fio de polipropileno 6-0. O fechamento da cavidade abdominal foi por sutura contínua com fio mononylon 4-0. O tempo de manipulação dos animais foi de  $27 \pm 6$  minutos.

Após três horas do fechamento da cavidade, os animais anestesiados foram sacrificados por exsanguinação. Em seguida, foi feita a remoção cirúrgica dos

pulmões, segmento ileal remanescente, rins e baço. Um dos rins foi conservado em solução de formaldeído por menos de 24 horas e emblocado em parafina para análise posterior. O outro rim foi conservado por congelamento em nitrogênio líquido.

Os animais foram descartados conforme o protocolo do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

#### **3.4. Preparo para histologia do tecido renal**

Os rins removidos foram dissecados ao longo do eixo não hilar e fixados em formalina com fosfato tamponado a 10% (Erviagas, São Paulo, Brasil). Em seguida, foram embebidos em parafina (Erviagas, São Paulo, Brasil) e preparados com cortes de 4 µm de espessura corados com hematoxilina e eosina (HE; Erviagas, São Paulo, Brasil).

As alterações histológicas foram examinadas em microscopia ótica, sem identificação dos casos, por um único patologista experiente. Para fins de análise quantitativa de padrão histológico, as alterações do tecido foram classificadas por notas que variaram de 0 a 4<sup>60</sup>, como mostrado na Tabela 1. Foram quantificadas três observações independentes: necrose tubular (vacuolização das células tubulares, dilatação do lúmen e presença de cilindros intratubulares), necrose das células parenquimatosas e inflamação, gerando um escore final pela média ponderada das notas de cada uma das três observações descritas.

**Tabela 1** - Graduação histopatológica de lesão renal considerando a porcentagem de área lesada no parênquima renal <sup>60</sup>.

Escore de lesão renal	Padrão histopatológico
0	Normal
0,5	Pequenas áreas de lesão focal
1	< 10% de lesão
2	10 a 25% de lesão
3	25 a 75% de lesão
4	> 75% de lesão

### 3.5 Preparo para imuno-histoquímica

#### 3.5.1 Anticorpos anti-Bax e anti-Bcl-2

Para a reação com os anticorpos anti-Bax e anti-Bcl-2 seguiu-se o seguinte protocolo:

Cortes de tecido renal de 4 µm de espessura foram colocados em lâminas silanizadas (Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, EUA) em suporte adequado. O processo de desparafinização foi feito com xilol quente, em estufa com temperatura aproximada de 65 °C, durante 10 minutos, e passadas rapidamente em três banhos de xilol frio. Para hidratação, as lâminas foram lavadas em concentrações decrescentes de álcool absoluto, 95% e 70%. Em seguida, foram lavadas em água corrente e água deionizada e mantidas em tampão fosfato de pH 7,4 (Synth, São Paulo, Brasil). Para a recuperação dos sítios antigênicos, utilizou-se solução de ácido cítrico 10 mM e pH 6,0 em banho úmido, sob pressão, a 125 °C por um minuto (Pascal<sup>®</sup>, Dakocytomation,



Model: 2800, USA). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com água oxigenada 10 volumes e o bloqueio das proteínas inespecíficas por imersão das lâminas em caseína diluída no tampão fosfato de pH 7,4 por cinco minutos, em temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários específicos (anti-Bax e anti-Bcl-2) diluídos em 1% de albumina de soro bovino por 24 horas, a 4°C. Posteriormente foram incubadas com o anticorpo secundário (Novolink Polymer, Leica Biosystems) e coradas com diaminobenzidina (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha) e hematoxilina de Harris (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha).

A análise das lâminas foi feita de forma cega, em microscopia ótica, com a avaliação de 10 campos com aumento de 40 vezes. Os campos foram fotografados e as células marcadas foram contadas como eventos de apoptose e tabuladas caso a caso.

O índice Bax / Bcl-2 foi calculado pela divisão simples dos valores obtidos pela contagem da lâmina de cada animal, de forma pareada, representando a relação entre os componentes anti e pró-apoptose presentes nas células renais de cada um dos animais estudados.

### **3.5.2 Reação de TUNEL**

Cortes de tecido renal de 4 µm de espessura foram colocados em lâminas silanizadas (Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, EUA) em suporte adequado. O processo de desparafinização foi feito com xilol quente, em estufa com temperatura aproximada de 65 °C, durante 10 minutos, e passadas rapidamente em três banhos de xilol frio. Para hidratação, as lâminas foram

lavadas em concentrações decrescentes de álcool absoluto, 95% e 70%. Em seguida, foram lavadas em água corrente e água deionizada e mantidas em tampão fosfato de pH 7,4 (Synth<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil). Para a recuperação dos sítios antigênicos, utilizou-se a proteinase K em temperatura ambiente por 30 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com água oxigenada 10 volumes em metanol por 30 minutos a temperatura ambiente, sendo lavado em seguida com água corrente, água destilada e tampão fosfato de pH 7,4. As lâminas foram incubadas com 50 µL da solução para reação de TUNEL (5 µL da solução enzimática + 45 µL da solução tampão) por amostra, em câmara úmida, a 37 °C, por 60 minutos. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em solução tampão fosfato de pH 7,4 e incubadas em câmara úmida a 37 °C, por 30 minutos, com 50 µL do conversor de peroxidase. Posteriormente, foram para mais três banhos de três minutos na solução tampão. A coloração foi feita com diaminobenzidina e a contracoloração com verde de metila.

A análise das lâminas preparadas com a reação de TUNEL foi feita de forma cega, em microscopia ótica, com a avaliação de 10 campos com aumento de 40 vezes. Os campos foram fotografados e as células marcadas foram contadas como eventos de apoptose e tabuladas caso a caso.

### **3.5.3 Quantificação do malondialdeído (MDA) no tecido renal**

Amostras de tecido renal conservadas em nitrogênio líquido foram homogeneizadas em um mL de cloreto de potássio (KCl) 1,15% com sonicador (Polytron<sup>®</sup> PT3100). Determinou-se a lipoperoxidação das membranas celulares causada pela formação de radicais livres através do método de

substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), sendo o valor expresso em nanomoles por miligrama de proteína (nmol / mg de proteína). Após a homogeneização, as alíquotas foram centrifugadas a 10.000 giros por minuto durante 20 minutos, a 4 °C (Centrifuge 5804<sup>®</sup> Eppendorf, Hamburg, Germany). Para reação, adicionou-se 100 µL do sobrenadante a 100 µL de duodecilsulfato de sódio a 8,1%, 750 µL de ácido acético a 20% e 750 µL de ácido tiobarbitúrico a 0,8%. A mistura foi aquecida a temperatura de 95 °C, por 50 minutos. Após o período estabelecido, amostras de 200 µL foram analisadas no espectrofotômetro, utilizando-se filtro de comprimento de onda de 532 nm. Os resultados foram expressos em nmol / mg de proteína (Bradford, 1976). Todas as análises foram feitas em duplicata.

#### **3.5.4 Quantificação do nitrito no tecido renal**

Amostras do tecido renal conservadas em nitrogênio líquido foram homogeneizadas na proporção de 50 mg de tecido macerado para 500 µL de KCl 1,15% com sonicador (Polytron<sup>®</sup> PT3100). A solução foi centrifugada em tubos a 5.000 giros por minuto durante 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e submetido a análise. A dosagem do nitrito foi feita pelo método calorimétrico baseado na reação de Griess<sup>61</sup>. O limite de detecção é de um micromoles por litro (µmol / L) de nitrito. Para o ensaio, 50 µL da solução foram incubadas em uma placa de 96 poços com as soluções de diluição previstas no kit tampão, apropriadas para produzir a curva padrão. Em seguida, nos poços que continham as amostras biológicas e as diluições seriadas da curva padrão, foram adicionados 50 µL do reagente de Griess, anteriormente preparado com

volumes iguais de N-(1-naftil)etilenodiamina a 0,1% e ácido ortofosfórico, incubando a placa por uma hora na temperatura ambiente. A amostra de referência fotométrica foi preparada misturando-se 50 µL do reagente de Griess e 50 µL de água deionizada. Após incubação, a absorbância das amostras foi medida no espectrofotômetro, utilizando-se filtro de comprimento de onda de 548 nm. A concentração do nitrito foi determinada a partir de uma curva padrão e expressa em µmol / mg de tecido.

### **3.6. Análise estatística**

Foram utilizados testes não paramétricos para análise de correlação de postos de Spearman e para análise de variância da classificação por postos de Kruskal-Wallis. Uma análise posterior (post hoc) com o teste de comparação de amostras independentes de Mann-Whitney foi sugerida em algumas análises pelo programa Sigma-Stat versão 3.1 (Systat Software<sup>®</sup>, San Diego, CA).

Foram realizadas análises pareadas dois a dois e diferentes combinações entre os grupos, para efeito de comparação.

Adotou-se o nível de significância de 0,05 para rejeição da hipótese de nulidade, e níveis descritivos (p) iguais ou inferiores a esse valor foram considerados significantes.

## 4. Resultados

---

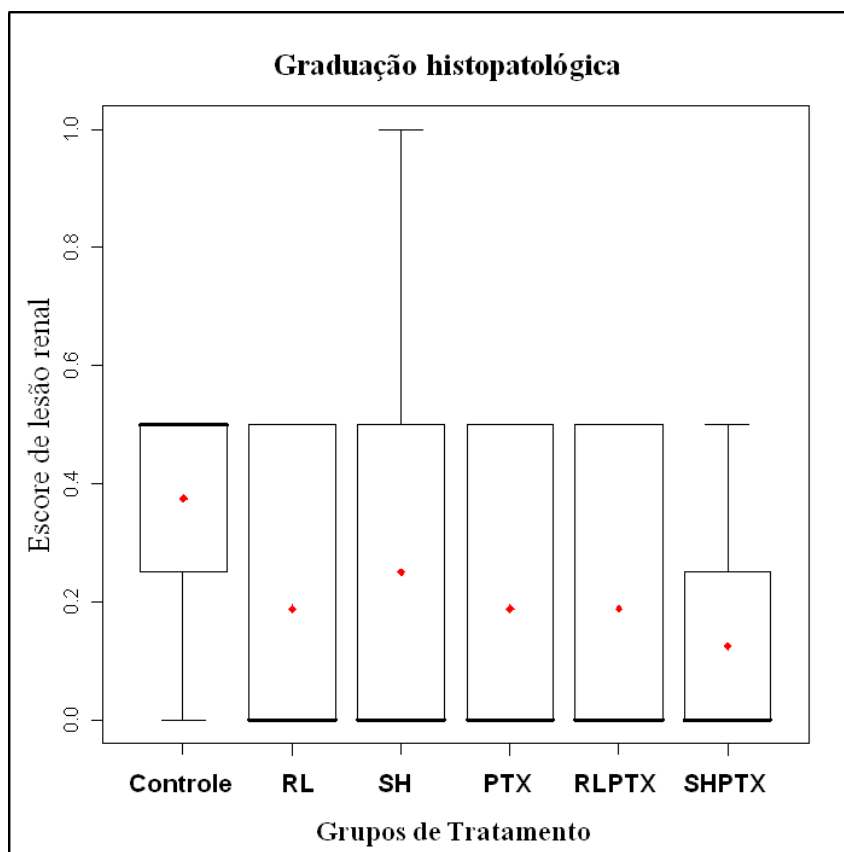
#### 4.1 Graduação histopatológica

Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,49$ ), na graduação histopatológica do tecido renal, entre os diferentes grupos, conforme se observa na Tabela 2 e Gráfico 1.

**Tabela 2** – Valores da graduação histopatológica expresso pelo escore de lesão renal.

Grupos	Graduação histopatológica					
	Controle	RL	SH	PTX	RLPTX	SHPTX
Mediana	0,50	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00
Média	0,37	0,19	0,25	0,19	0,31	0,12
Desvio padrão	0,23	0,26	0,38	0,26	0,26	0,23

**Gráfico 1** – Escore de lesão renal na avaliação histopatológica do tecido renal corado com HE nos grupos de tratamento.



## 4.2 Bax – eventos de apoptose no tecido renal

A quantificação do Bax apresentou menor número de eventos de apoptose no grupo SHPTX do que nos grupos Controle, PTX e RLPTX ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença em comparação aos grupos RL e SH.

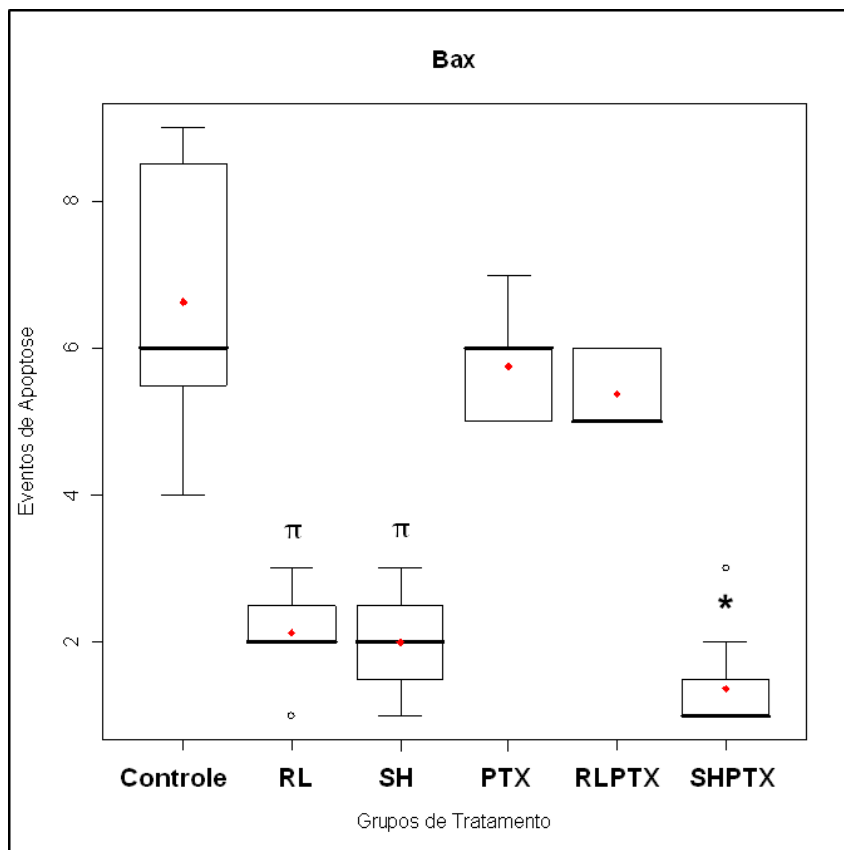
Os grupos RL e SH tiveram menos apoptose do que os grupos Controle e PTX ( $p < 0.05$ ), mas não em relação ao RLPTX.

Os grupos Controle, PTX e RLPTX foram equivalentes na comparação entre eles, conforme se observa na Tabela 3 e Gráfico 2.

**Tabela 3** - Valores de apoptose (expressos em número de eventos / 10 campos de 40 aumentos) no tecido renal para os grupos de estudo, analisado por Bax.

Descritivo - Bax						
Grupos	Controle	RL	SH	PTX	RLPTX	SHPTX
Mediana	6,00	2,00	2,00	6,00	5,00	1,00
Média	6,63	2,13	2,00	5,75	5,38	1,38
Desvio padrão	1,85	0,64	0,76	0,71	0,52	0,74

**Gráfico 2** – Eventos de apoptose no tecido renal com o marcador Bax.



\*:  $p < 0,05$  em SHPTX comparado ao Controle, PTX e RLPTX;

π:  $p < 0,05$  em SH e RL comparado ao Controle e PTX;

°: outlier.

#### 4.3 Bcl-2 – eventos de apoptose no tecido renal

A quantificação do marcador Bcl-2 nos grupos SHPTX, RL, SH e RLPTX apresentou menor número de apoptose do que no grupo Controle ( $p < 0,05$ ).

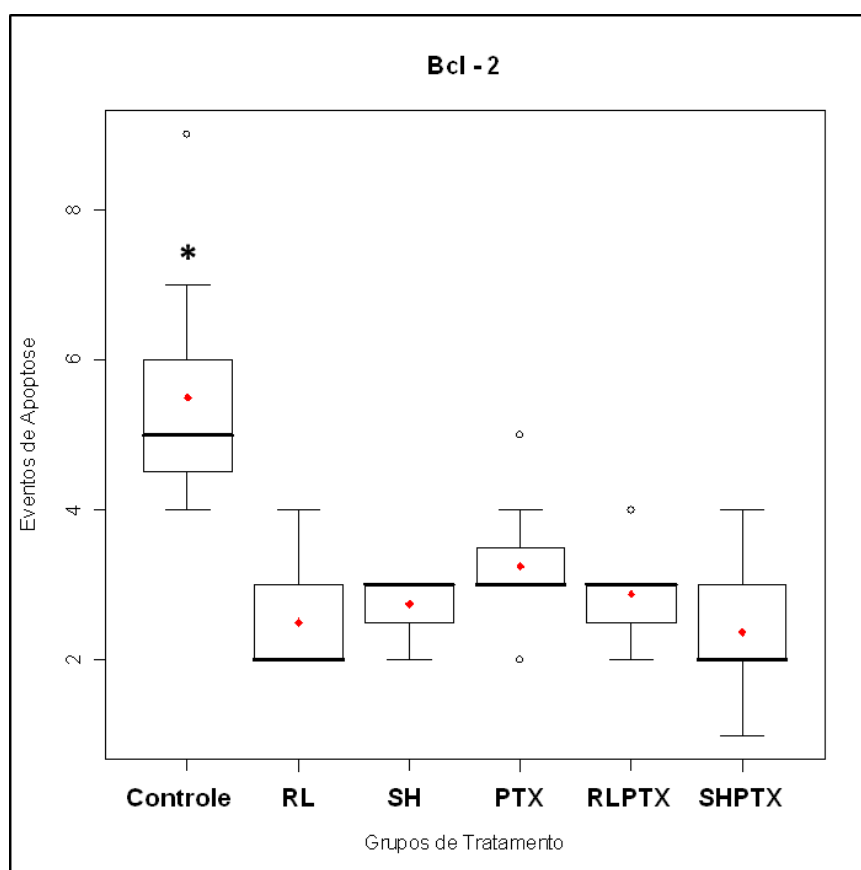
A análise comparativa entre os demais grupos não demonstrou diferença significativa entre eles, conforme se observa na Tabela 4 e Gráfico 3.



**Tabela 4** – Valores de apoptose (expressos em número de eventos / 10 campos de 40 aumentos) no tecido renal para os grupos de estudo, analisado por Bcl-2.

Descritivo - Bcl-2						
Grupos	Controle	RL	SH	PTX	RLPTX	SHPTX
Mediana	5,00	2,00	3,00	3,00	3,00	2,00
Média	5,50	2,50	2,75	3,25	2,88	2,38
Desvio padrão	1,69	0,76	0,46	0,89	0,64	0,92

**Gráfico 3** – Eventos de apoptose no tecido renal com o marcador Bcl-2.



\*:  $p < 0,05$  em SHPTX, RL, SH e RLPTX comparados ao grupo Controle;

o: outliers.

#### 4.4 Índice Bax / Bcl-2

Em relação ao índice Bax / Bcl-2 o grupo SHPTX teve, de forma estatisticamente significativa, menor valor do que os grupos Controle, PTX e RLPTX ( $p < 0,01$ ) e assemelhou-se aos grupos SH e RL.

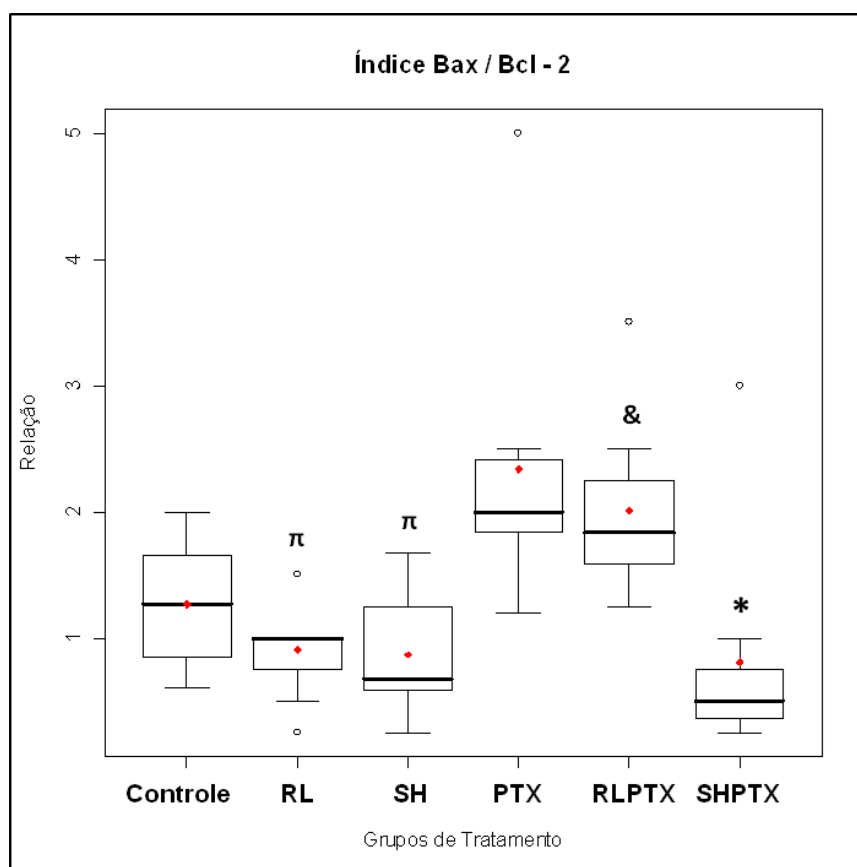
Os grupos SH e RL tiveram menor índice do que o grupo PTX ( $p < 0,01$ ).

Isoladamente, os grupos RL e SH foram semelhantes entre si e ao grupo Controle.

O grupo RLPTX apresentou um menor índice, estatisticamente significativa, comparado ao grupo Controle ( $p < 0,01$ ), conforme se observa na Tabela 5 e Gráfico 4.

**Tabela 5** - Valores do índice Bax / Bcl-2 para os grupos de estudo.

Descritivo - Índice Bax/Bcl-2						
Grupos	Controle	RL	SH	PTX	RLPTX	SHPTX
Mediana	1,27	1,00	0,67	2,00	1,84	0,50
Média	1,27	0,91	0,87	2,34	2,01	0,81
Desvio padrão	0,49	0,38	0,49	1,15	0,71	0,91

**Gráfico 4 – Relação do índice Bax / Bcl-2.**

\*:  $p < 0,05$  em SHPTX comparado aos grupos Controle, PTX e RLPTX;  
 $\pi$ :  $p < 0,05$  para SH e RL comparado a PTX;  
 &:  $p < 0,05$  em RLPTX em comparação ao grupo Controle;  
 °: outliers.

#### 4.5 TUNEL – eventos de apoptose no tecido renal

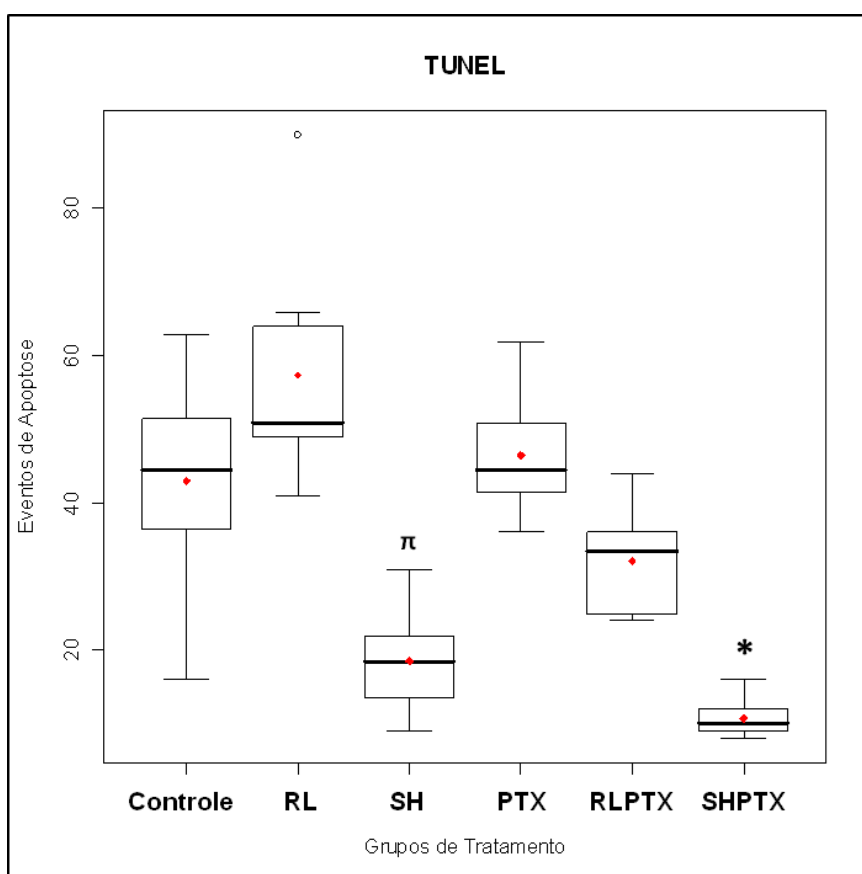
A quantificação do marcador TUNEL demonstrou que o grupo SHPTX teve, de forma estatisticamente significativa, menor valor do que os grupos Controle, RL e PTX ( $p < 0,01$ ).

O grupo SH apresentou valores menores do que os dos grupos RL e PTX ( $p < 0,01$ ), conforme se observa na Tabela 6 e Gráfico 5.

**Tabela 6** - Valores de apoptose (expressos em número de eventos / 10 campos de 40 aumentos) no tecido renal para os grupos de estudo, analisado pelo TUNEL.

Descritivo - TUNEL						
Grupos	Controle	RL	SH	PTX	RLPTX	SHPTX
Mediana	44,50	51,00	18,50	44,50	33,50	10,00
Média	43,00	57,38	18,50	46,50	32,13	10,75
Desvio padrão	14,24	15,36	6,93	8,45	7,04	2,76

**Gráfico 5** – Eventos de apoptose no tecido renal com o marcador TUNEL.



\*:  $p < 0,01$  em SHPTX comparado aos grupos Controle, RL e PTX;

$\pi$ :  $p < 0,01$  para SH comparado aos grupos RL e PTX;

°: outliers.

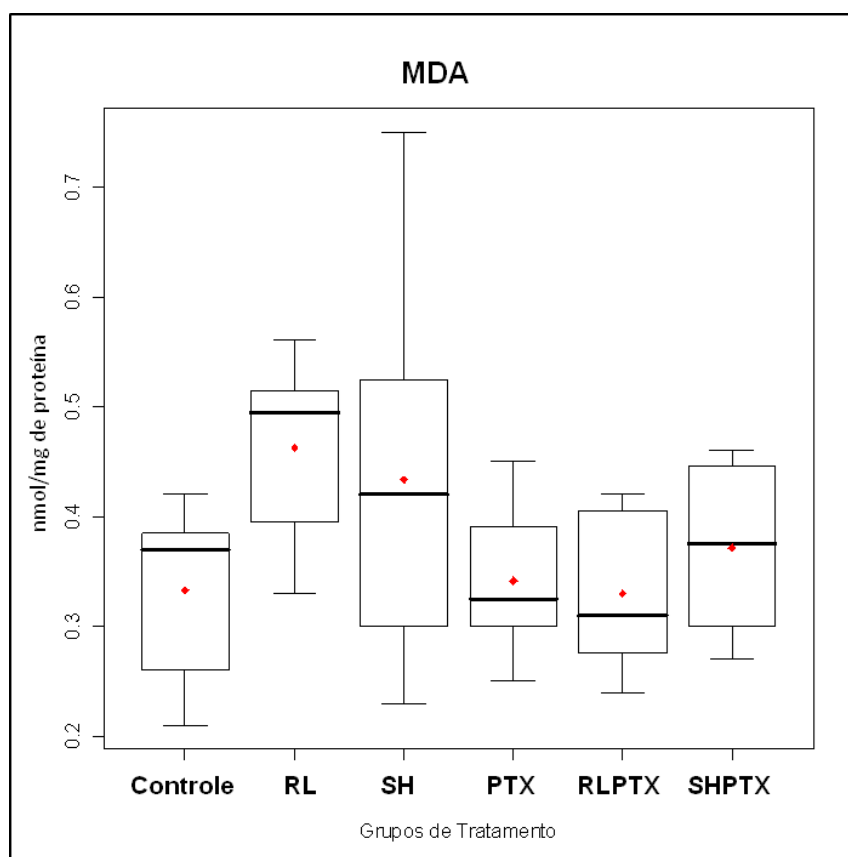
#### 4.6 MDA no tecido renal

A quantificação do MDA pela técnica do TBARS não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ), conforme se observa na Tabela 7 e Gráfico 6.

**Tabela 7** - Valores de malondialdeído (expressos em nmol / mg de proteínas) no tecido renal para os grupos de estudo, analisados por TBARS.

Descritivo - MDA						
Grupos	Controle	RL	SH	PTX	RLPTX	SHPTX
Mediana	0,37	0,50	0,42	0,33	0,31	0,38
Média	0,33	0,46	0,43	0,34	0,33	0,37
Desvio padrão	0,08	0,08	0,17	0,07	0,07	0,08

**Gráfico 6** – Quantificação do MDA pela técnica do TBARS no tecido renal.



Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos –  $p > 0,05$ .

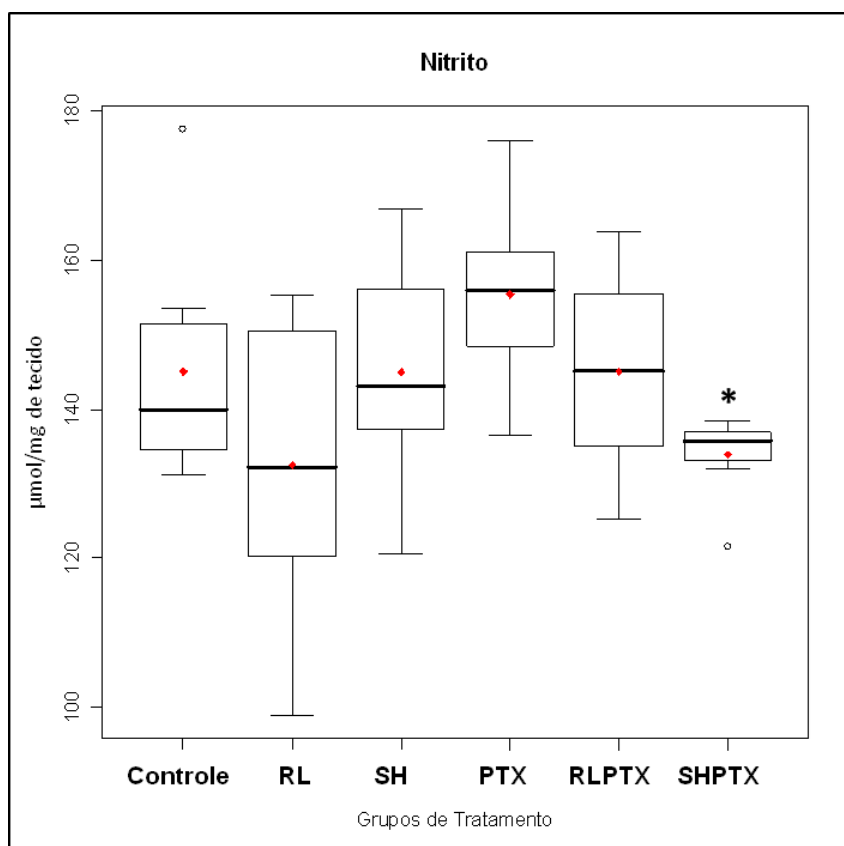
#### 4.7 Nitrito no tecido renal

A quantificação do nitrito demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos SHPTX e PTX ( $p < 0,05$ ), conforme se observa na Tabela 8 e Gráfico 7.

**Tabela 8** - Valores da quantificação do nitrito (expressos em  $\mu\text{mol} / \text{mg}$  de tecido) no tecido renal para os grupos de estudo.

Descritivo - Nitrito						
Grupos	Controle	RL	SH	PTX	RLPTX	SHPTX
Mediana	140,00	132,25	143,07	156,00	145,11	135,69
Média	145,06	132,50	145,02	155,44	145,06	133,92
Desvio padrão	15,18	19,51	14,58	11,67	12,92	5,39

**Gráfico 7** – Quantificação do nitrito no tecido renal.



\*:  $p < 0,05$  em SHPTX comparado ao grupo PTX;

°: outliers.

#### 4.8. Estatística aplicada aos grupos de tratamento

O coeficiente de postos de Spearman demonstra as seguintes correlações positivas: Bax e Bcl-2 ( $p < 0,001$ ), Bax e TUNEL ( $p = 0,001$ ), Bax e nitrito ( $p = 0,033$ ), índice Bax / Bcl-2 e TUNEL ( $p = 0,036$ ) e índice Bax / Bcl-2 e nitrito ( $p = 0,001$ ), conforme se observa na Tabela 9.

**Tabela 9** – Coeficiente de correlação de postos de Spearman considerando todos os animais do experimento agrupados por modalidade de tratamento.

Coeficiente de correlação de postos de Spearman - Todos os animais							
		BAX	Bcl-2	Bax / Bcl-2	TUNEL	MDA	Nitrito
BAX	$\rho$ (rho)	1	0,544	0,645	0,480	-0,269	0,309
	$p$		0,000*	0,000*	0,001*	0,064	0,033*
Bcl-2	$\rho$ (rho)	0,544	1	0,490	0,216	-0,190	0,140
	$p$	0,000*		0,741	0,140	0,196	0,341
Bax / Bcl-2	$\rho$ (rho)	0,645	0,049	1	0,303	-0,182	0,461
	$p$	0,000*	0,741		0,036*	0,216	0,001*
TUNEL	$\rho$ (rho)	0,480	0,216	0,303	1	0,127	0,098
	$p$	0,001*	0,140	0,036*		0,391	0,510
MDA	$\rho$ (rho)	-0,269	-0,190	-0,182	0,127	1	-0,155
	$p$	0,064	0,196	0,216	0,391		0,293
Nitrito	$\rho$ (rho)	0,309	0,140	0,461	0,098	-0,155	1
	$p$	0,033*	0,341	0,001*	0,510	0,293	

\* correlação significativa com  $p < 0,05$

O grupo SHPTX apresentou menor número de apoptose pelos marcadores Bax ( $p < 0,001$ ) e TUNEL ( $p = 0,008$ ) e menor quantificação de nitrito ( $p = 0,033$ ) do que todos os demais grupos (Controle, RL, SH, PTX e RLPTX), conforme se observa na Tabela 10.

**Tabela 10** – Análise de variância de classificação e postos de Kruskal-Wallis entre os grupos SHPTX versus outros grupos.

SHPTX versus outros grupos					
		n	Postos (Mediana)	$\chi^2$	p
<b>Bax</b>	<b>Outros</b>	40	27,74	13,260	0,000*
	<b>SHPTX</b>	8	8,31		
<b>Bcl-2</b>	<b>Outros</b>	40	26,29	4,347	0,037*
	<b>SHPTX</b>	8	15,56		
<b>Bax / Bcl-2</b>	<b>Outros</b>	40	26,88	6,960	0,008*
	<b>SHPTX</b>	8	12,63		
<b>TUNEL</b>	<b>Outros</b>	40	28,28	17,468	0,000*
	<b>SHPTX</b>	8	5,63		
<b>TBARS</b>	<b>Outros</b>	40	24,45	0,003	0,956
	<b>SHPTX</b>	8	24,47		
<b>Nitrito</b>	<b>Outros</b>	40	26,43	4,539	0,033*
	<b>SHPTX</b>	8	14,88		

\* correlação significativa com  $p < 0,05$



Os grupos que receberam solução salina hipertônica 7,5% associado ou não à pentoxifilina (SH e SHPTX) apresentaram menor número de apoptose pelos marcadores Bax ( $p < 0,0001$ ) e TUNEL ( $p < 0,0001$ ) do que os demais grupos (Controle, RL, SH e RLPTX), conforme se observa na Tabela 11.

**Tabela 11** – Análise de variância de classificação e postos de Kruskal-Wallis entre os grupos SH  $\pm$  PTX versus outros grupos.

SH $\pm$ PTX versus outros grupos					
		n	Postos (Mediana)	$\chi^2$	p
<b>Bax</b>	<b>Outros</b>	32	31,17	22,525	0,000*
	<b>SH <math>\pm</math> PTX</b>	16	11,16		
<b>Bcl-2</b>	<b>Outros</b>	32	27,55	5,051	0,025*
	<b>SH <math>\pm</math> PTX</b>	16	18,41		
<b>Bax / Bcl-2</b>	<b>Outros</b>	32	29,47	12,186	0,000*
	<b>SH <math>\pm</math> PTX</b>	16	14,56		
<b>TUNEL</b>	<b>Outros</b>	32	32,22	29,212	0,000*
	<b>SH <math>\pm</math> PTX</b>	16	9,06		
<b>TBARS</b>	<b>Outros</b>	32	23,31	0,692	0,405
	<b>SH <math>\pm</math> PTX</b>	16	26,88		
<b>Nitrito</b>	<b>Outros</b>	32	26,13	1,294	0,255
	<b>SH <math>\pm</math> PTX</b>	16	21,25		

\* correlação significativa com  $p < 0,05$

O grupo SHPTX apresentou menor número de apoptose pelo marcador TUNEL ( $p = 0,013$ ) e menor quantificação de nitrito ( $p = 0,04$ ) do que o grupo que recebeu exclusivamente SH, conforme se observa na Tabela 12.

**Tabela 12** – Análise de variância de classificação e postos de Kruskal-Wallis entre os grupos SHPTX versus SH.

SHPTX versus SH					
		n	Postos (Mediana)	Z	p
<b>Bax</b>	<b>SH</b>	8	10,38	-1,718	0,086
	<b>SHPTX</b>	8	6,63		
<b>Bcl-2</b>	<b>SH</b>	8	9,75	-1,156	0,248
	<b>SHPTX</b>	8	7,25		
<b>Bax / Bcl-2</b>	<b>SH</b>	8	9,94	-1,222	0,222
	<b>SHPTX</b>	8	7,06		
<b>TUNEL</b>	<b>SH</b>	8	11,44	-2,484	0,013*
	<b>SHPTX</b>	8	5,56		
<b>TBARS</b>	<b>SH</b>	8	9,25	-0,632	0,527
	<b>SHPTX</b>	8	7,75		
<b>Nitrito</b>	<b>SH</b>	8	10,94	-2,049	0,040*
	<b>SHPTX</b>	8	6,06		

\* correlação significativa com  $p < 0,05$

O grupo SHPTX apresentou menor número de apoptose pelos marcadores Bax ( $p < 0,001$ ), TUNEL ( $p = 0,001$ ) e índice Bax / Bcl-2 ( $p = 0,008$ ) do que o grupo RLPTX, conforme se observa na Tabela 13.

**Tabela 13** – Análise de variância de classificação e postos de Kruskal-Wallis entre os grupos SHPTX versus RLPTX.

SHPTX versus RLPTX					
		n	Postos (Mediana)	$\chi^2$	$p$
<b>Bax</b>	<b>RLPTX</b>	8	12,50	12,367	0,000*
	<b>SHPTX</b>	8	4,50		
<b>Bcl-2</b>	<b>RLPTX</b>	8	9,94	1,687	0,194
	<b>SHPTX</b>	8	7,06		
<b>Bax / Bcl-2</b>	<b>RLPTX</b>	8	11,63	6,955	0,008*
	<b>SHPTX</b>	8	5,38		
<b>TUNEL</b>	<b>RLPTX</b>	8	12,50	11,395	0,001*
	<b>SHPTX</b>	8	4,50		
<b>TBARS</b>	<b>RLPTX</b>	8	7,19	1,227	0,268
	<b>SHPTX</b>	8	9,81		
<b>Nitrito</b>	<b>RLPTX</b>	8	10,44	2,654	0,103
	<b>SHPTX</b>	8	6,56		

\* correlação significativa com  $p < 0,05$

O grupo SHPTX apresentou menor número de apoptose pelo marcador Bax ( $p < 0,001$ ), TUNEL ( $p = 0,008$ ), menor quantificação de nitrito ( $p = 0,001$ ) e índice Bax/Bcl-2 ( $p = 0,008$ ) do que o grupo que recebeu exclusivamente PTX, conforme se observa na Tabela 14.

**Tabela 14** – Análise de variância de classificação e postos de Kruskal-Wallis entre os grupos SHPTX versus PTX.

PTX versus SHPTX					
		n	Postos (Mediana)	Z	p
<b>Bax</b>	<b>PTX</b>	8	12,50	-3,489	0,000*
	<b>SHPTX</b>	8	4,50		
<b>Bcl-2</b>	<b>PTX</b>	8	10,56	-1,840	0,066
	<b>SHPTX</b>	8	6,44		
<b>Bax / Bcl-2</b>	<b>PTX</b>	8	11,63	-2,641	0,008*
	<b>SHPTX</b>	8	5,38		
<b>TUNEL</b>	<b>PTX</b>	8	12,50	-3,373	0,001*
	<b>SHPTX</b>	8	4,50		
<b>TBARS</b>	<b>PTX</b>	8	7,44	-0,895	0,371
	<b>SHPTX</b>	8	9,56		
<b>Nitrito</b>	<b>PTX</b>	8	12,25	-3,153	0,002*
	<b>SHPTX</b>	8	4,75		

\* correlação significativa com  $p < 0,05$

Os grupos tratados com Ringer lactato associado ou não à pentoxifilina (RL e RLPTX) apresentaram maior número de apoptose pelo TUNEL ( $p = 0,004$ ) do que os demais grupos (Controle, SH, PTX, e SHPTX), conforme se observa na Tabela 15.

**Tabela 15** – Análise da taxa de comparação e amostras independentes de Mann-Whitney entre os grupos RL + RLPTX versus outros grupos.

RL ± PTX versus outros grupos					
		n	Postos (Mediana)	Z	p
<b>Bax</b>	<b>Outros</b>	32	24,08	-0,285	0,776
	<b>RL ± PTX</b>	16	25,26		
<b>Bcl-2</b>	<b>Outros</b>	32	26,95	-1,727	0,084
	<b>RL ± PTX</b>	16	20,03		
<b>Bax / Bcl-2</b>	<b>Outros</b>	32	22,73	-1,190	0,234
	<b>RL ± PTX</b>	16	27,74		
<b>TUNEL</b>	<b>Outros</b>	32	20,24	-2,847	0,004*
	<b>RL ± PTX</b>	16	32,26		
<b>TBARS</b>	<b>Outros</b>	32	22,61	-1,262	0,207
	<b>RL ± PTX</b>	16	27,94		
<b>Nitrito</b>	<b>Outros</b>	32	26,31	-1,207	0,227
	<b>RL ± PTX</b>	16	21,21		

\* correlação significativa com  $p < 0,05$

O grupo RL apresentou maior número de apoptose pelo TUNEL ( $p = 0,001$ ) do que o grupo SH, conforme se observa na Tabela 16.

**Tabela 16** – Análise da taxa de comparação e amostras independentes de Mann-Whitney entre o grupo RL versus SH.

RL versus SH					
		n	Postos (Mediana)	Z	p
<b>Bax</b>	<b>RL</b>	8	8,88	-0,352	0,725
	<b>SH</b>	8	8,13		
<b>Bcl-2</b>	<b>RL</b>	8	7,38	-1,061	0,289
	<b>SH</b>	8	9,63		
<b>Bax / Bcl-2</b>	<b>RL</b>	8	9,00	-0,434	0,665
	<b>SH</b>	8	8,00		
<b>TUNEL</b>	<b>RL</b>	8	12,50	-3,363	0,001*
	<b>SH</b>	8	4,50		
<b>TBARS</b>	<b>RL</b>	8	9,19	-0,580	0,562
	<b>SH</b>	8	7,81		
<b>Nitrito</b>	<b>RL</b>	8	6,88	-1,365	0,172
	<b>SH</b>	8	10,13		

\* correlação significativa com  $p < 0,05$

O grupo SH apresentou menor número de apoptose pelo marcador Bax ( $p = 0,001$ ), índice Bax / Bcl-2 ( $p = 0,002$ ) e TUNEL ( $p = 0,001$ ) do que o grupo PTX, conforme se observa da Tabela 17.

**Tabela 17** – Análise da taxa de comparação e amostras independentes de Mann-Whitney entre os grupos SH versus PTX.

SH versus PTX					
		n	Postos (Mediana)	Z	p
<b>Bax</b>	<b>SH</b>	8	4,50	-3,427	0,001*
	<b>PTX</b>	8	12,50		
<b>Bcl-2</b>	<b>SH</b>	8	7,25	-1,282	0,200
	<b>PTX</b>	8	9,75		
<b>Bax / Bcl-2</b>	<b>SH</b>	8	4,81	-3,119	0,002*
	<b>PTX</b>	8	12,19		
<b>TUNEL</b>	<b>SH</b>	8	4,50	-3,361	0,001*
	<b>PTX</b>	8	12,50		
<b>TBARS</b>	<b>SH</b>	8	10,00	-1,261	0,207
	<b>PTX</b>	8	7,00		
<b>Nitrito</b>	<b>SH</b>	8	6,88	-1,366	0,172
	<b>PTX</b>	8	10,13		

\* correlação significativa com  $p < 0,05$

O grupo RL apresentou menor número de apoptose pelo marcador Bax ( $p = 0,001$ ), índice Bax / Bcl-2 ( $p = 0,001$ ) e menor quantificação de nitrito ( $p = 0,012$ ), porém maior quantificação de MDA pelo TBARS ( $p = 0,008$ ) do que o grupo que recebeu tratamento isolado de PTX, conforme se observa na Tabela 18.

**Tabela 18** – Análise da taxa de comparação e amostras independentes de Mann-Whitney entre os grupos RL versus PTX.

RL versus PTX					
		n	Postos (Mediana)	Z	p
<b>Bax</b>	RL	8	4,50	-3,451	0,001*
	PTX	8	12,50		
<b>Bcl-2</b>	RL	8	6,50	-1,807	0,071
	PTX	8	10,50		
<b>Bax / Bcl-2</b>	RL	8	4,63	-3,315	0,001*
	PTX	8	12,38		
<b>TUNEL</b>	RL	8	10,63	-1,789	0,074
	PTX	8	6,38		
<b>TBARS</b>	RL	8	11,63	-2,633	0,008*
	PTX	8	5,38		
<b>Nitrito</b>	RL	8	5,50	-2,522	0,012*
	PTX	8	11,50		

\* correlação significativa com  $p < 0,05$



O grupo Controle apresentou maior número de apoptose pelos marcadores Bax ( $p = 0,001$ ) e Bcl-2 ( $p < 0,001$ ) do que todos os grupos que receberam algum tratamento (RL, SH, PTX, RLPTX e SHPTX), conforme se observa na Tabela 19.

**Tabela 19** – Análise da taxa de comparação e amostras independentes de Mann-Whitney entre o grupo Controle versus outros grupos.

Controle versus outros grupos					
		n	Postos (Mediana)	Z	p
<b>Bax</b>	<b>Outros</b>	40	21,54	-3,332	0,001*
	<b>Controle</b>	8	39,31		
<b>Bcl-2</b>	<b>Outros</b>	40	20,70	-4,432	0,000*
	<b>Controle</b>	8	43,50		
<b>Bax / Bcl-2</b>	<b>Outros</b>	40	24,41	-0,097	0,923
	<b>Controle</b>	8	24,94		
<b>TUNEL</b>	<b>Outros</b>	40	23,09	-1,564	0,118
	<b>Controle</b>	8	31,56		
<b>TBARS</b>	<b>Outros</b>	40	25,64	-1,260	0,208
	<b>Controle</b>	8	18,81		
<b>Nitrito</b>	<b>Outros</b>	40	24,39	0,125	0,901
	<b>Controle</b>	8	25,06		

\* correlação significativa com  $p < 0,05$

## 5. Discussão

---

Nosso estudo demonstrou que a solução salina hipertônica 7,5% associada à pentoxifilina (SHPTX), neste modelo animal de obstrução e isquemia intestinal, apresentou um efeito protetor sobre o rim com propriedades antiapoptóticas.

A análise estatística inicial de todos os animais demonstrou haver uma correlação positiva entre os marcadores de apoptose analisados e a quantificação do nitrito no tecido renal. Ao analisarmos comparativamente os dados entre os grupos de tratamento, observamos que o grupo SHPTX apresentou menos eventos de apoptose nos marcadores Bax e TUNEL e teve a menor quantidade de nitrito mensurada.

As análises comparativas entre os grupos simularam as possíveis combinações terapêuticas. Nesse contexto, o grupo de lesão máxima (Controle) apresentou maior expressão de eventos de apoptose pelo Bax e Bcl-2. Quando fizemos a reposição volêmica com uma das soluções isoladas (RL ou SH) observamos que ambas cursaram com menor taxa de lesão do que se não houvesse nenhum tratamento hidroeletrólítico, sendo que o uso da SH apresentou menos eventos de apoptose pelo marcador TUNEL. Por sua vez, a administração isolada da PTX não contribuiu para a diminuição dos eventos de apoptose.

As análises das soluções combinadas do RL ou SH com PTX demonstraram um perfil de menor lesão celular renal, sendo que a solução SHPTX apresentou diferenças significativas em relação aos eventos de apoptose pelos marcadores Bax, índice Bax / Bcl-2 e TUNEL.

Esses achados são importantes porque corroboram que a reposição volêmica é fundamental no tratamento da disfunção renal decorrente dos mecanismos da SIRS/sepsis<sup>2</sup>. Entretanto, é necessário controlar o volume a ser repostado, de preferência com substâncias que possuam efeito osmolar adequado, em

associação com propriedades hemorreológicas e anti-inflamatórias que minimizem o dano às organelas celulares <sup>14</sup>. Nesse contexto, a análise dos mecanismos de morte celular permite-nos compreender como o estresse oxidativo e a formação de radicais livres imprimem seus efeitos deletérios sobre o funcionamento de diversos órgãos, mesmo antes do diagnóstico da disfunção fisiológica, pelos indicadores clínicos habitualmente medidos <sup>62, 63</sup>.

O primeiro desafio para estudos sobre fisiopatologia é a adequação do modelo experimental. Os modelos de sepse mais utilizados em animais consistem na inoculação de bactérias ou toxinas na corrente sanguínea ou via aérea, que levam ao aumento explosivo das citocinas inflamatórias e rápida deterioração <sup>64, 65</sup>. No clássico modelo de peritonite, reproduzido exaustivamente nos últimos 30 anos, é feita a ligadura e perfuração do ceco e o choque costuma instalar-se de forma rápida, pela extensa necrose do segmento e pelo extravasamento do conteúdo intraluminal. A vasta literatura com descrições do modelo acima demonstra diferenças importantes no número de punções no ceco e na extensão da ligadura intestinal, cursando com índices de mortalidade variável entre os autores <sup>66, 67</sup>.

Segundo Parker e Watkins <sup>68</sup>, um modelo experimental de sepse deve iniciar com infecção localizada que evolua com disfunção de múltiplos órgãos, de forma gradual, em animais sem anestesia.

No presente estudo, utilizamos um modelo adaptado de obstrução e isquemia segmentar do íleo distal, que possibilita esse quadro evolutivo mais próximo do que ocorre na prática clínica <sup>7, 69, 70</sup>. Além disso, foi realizada a reposição volêmica, após um período padronizado de observação, seguido do tratamento operatório do fator causal do abdômen agudo <sup>1, 2</sup>.

Apesar de não diretamente comprovada a presença de infecção no modelo por nós utilizado, o argumento para essa proposição é baseado em alguns trabalhos: Zanoni e cols.<sup>69</sup> demonstraram cultura positiva em 86% dos linfonodos do mesentério e 57% das hemoculturas em um modelo semelhante de obstrução e isquemia intestinal. Kocdor e cols.<sup>55</sup> encontraram bactérias em 100% dos linfonodos do mesentério em um modelo de obstrução simples do íleo terminal, sem oclusão vascular e Akcay e cols.<sup>71</sup> constataram maior crescimento bacteriano no segmento do intestino obstruído em alça fechada do que em outro com obstrução simples.

Considerando que os animais evoluíram com um quadro de intensa resposta inflamatória e, possivelmente, sepse ao longo do período de observação de 24 horas e que ocorreram alterações hemodinâmicas com hipovolemia e, conseqüentemente, hipotensão arterial sistêmica, diminuição da pressão de perfusão renal<sup>59</sup> e eventos isquêmicos globais e regionais no rim, foram criadas as condições para o processo da LRA. Ainda, várias evidências demonstram que a LRA é insidiosa, podendo ser desencadeada mesmo sem sinais clínicos evidentes de choque<sup>2, 32</sup>.

Outros mecanismos relacionados à gênese da LRA incluem a disfunção microvascular, perfusão tecidual heterogênea, hipóxia celular, exacerbação da resposta imune e inflamatória, aumento do estresse oxidativo e os mecanismos de apoptose<sup>13, 72, 73</sup>. Desses, a formação de radicais livres a partir do óxido nítrico, como o ânion peroxinitrito (isômero instável do nitrato), ocasionam lesão direta das proteínas e do DNA das células<sup>5, 73</sup>. As alterações de isquemia e reperfusão renal são substancialmente sensíveis às reações de oxidação, estando muito relacionadas às formas agudas de LRA<sup>72</sup>. Além disso, o

peroxinitrito formado durante a cascata inflamatória tem especial associação com a sepse<sup>63</sup>, inclusive já demonstrado nos modelos de ligadura e punção do ceco<sup>59, 66, 67</sup>.

A lipoperoxidação das membranas, também associada com a formação de radicais livres e liberação do malondialdeído, contribui amplamente para a perda da função e integridade das membranas e organelas intracelulares, além de desencadear fenômenos mutagênicos e de falência energética da célula<sup>74</sup>. Os achados histológicos são a vacuolização das células tubulares apicais, necrose e apoptose<sup>18, 20</sup>. No nosso experimento não observamos diferenças significativas na graduação histopatológica de lesão renal, demonstrando que as análises imuno-histoquímicas são mais sensíveis do que a observação microscópica direta.

Via de regra, os danos às membranas da mitocôndria, retículo endoplasmático ou ao DNA desencadeiam um complexo processo de produção e liberação das proteínas Bcl-2 (antiapoptose) e Bax (pró-apoptose). A Bcl-2 combina-se à Bax ou aos seus sítios de ligação, interrompendo a cascata precursora de apoptose. Quando esse equilíbrio é superado pelos mecanismos de lesão celular, especialmente devido à formação de radicais livres, a produção da Bax aumenta, provocando a liberação e ativação das caspases e fator de transcrição NF-kB, levando adiante o processo de apoptose e morte celular<sup>22, 75</sup>.

Nesse contexto, o índice Bax / Bcl-2 é útil para a análise de suscetibilidade da morte celular por apoptose, ainda mais quando existe uma correlação positiva entre o índice e a dosagem de nitrito, conforme demonstrado nos nossos resultados.

Quando a cascata de eventos da SIRS / sepse e da LRA se inicia, é necessário instituir o tratamento clínico o mais precocemente possível. Nesse cenário a reposição volêmica permanece como um dos pilares da terapêutica na insuficiência renal aguda <sup>2, 76</sup>.

Entretanto, o melhor padrão de reposição ainda é objeto de estudo. Os efeitos sobre os órgãos e sistemas são diversos e é necessário compreender melhor o que pode ser benéfico e deletério para o organismo. No intestino, por exemplo, o excesso de volume provoca edema da parede, aumento da permeabilidade capilar e, conseqüentemente, íleo adinâmico e maior tempo para reintrodução da dieta no pós-operatório <sup>4</sup>. O aumento da pressão intra-abdominal com síndrome compartimental também pode advir em casos extremos, com comprometimento da perfusão <sup>77</sup>. Do ponto de vista sistêmico, as principais soluções de reposição contribuem para o aumento da concentração plasmática de sódio, com conseqüente acidose metabólica, produção de radicais livres e diminuição da taxa de filtração glomerular <sup>32, 63</sup>.

A análise das diferentes soluções utilizadas permite fazer algumas observações. Shih e cols. <sup>42</sup>, em modelo de punção e ligadura do ceco, estudaram o efeito da solução hipertônica e constataram que a produção de radicais livres de oxigênio nos diferentes tecidos é menor nesse grupo. Theobaldo e cols. <sup>44</sup>, em estudo recente, após injeção intraperitoneal de endotoxinas, demonstraram redução da peroxidação lipídica no intestino 24 horas após o tratamento com solução salina hipertônica, sendo que não havia diferença na análise inicial desses marcadores. A utilização da pentoxifilina em modelo de isquemia e reperfusão também evidenciou diminuição do MDA, produto final da peroxidação lipídica <sup>51</sup>.

No trabalho de Rasslan e cols.<sup>49</sup>, na análise do MDA pulmonar e intestinal, a associação SHPTX também promoveu a redução da lipoperoxidação das membranas. Outros autores também demonstram que a SH e a PTX, isoladamente, diminuem o estresse oxidativo em modelos de sepse<sup>42, 47, 78</sup>. Esses achados também foram observados por nós com a menor dosagem do MDA no tecido renal dos ratos tratados com a solução SHPTX.

Como medicamento isolado, a pentoxifilina, inibidor não específico da fosfodiesterase, está associada com o incremento da microcirculação vascular relacionada à deformabilidade eritrocitária e relaxamento vascular endotélio-dependente. Além disso, ela está relacionada com a regulação negativa das citocinas pró-inflamatórias e mecanismos de imunomodulação mais efetivos<sup>51</sup>. Em relação aos seus efeitos sobre a LRA, não houve efeito significativo sobre os mecanismos de lesão celular ou estresse oxidativo, justamente por não ter efeito sobre a hipovolemia. Quando a PTX foi usada em associação com SH, os efeitos de ambas as soluções foram maximizados e, mesmo associada com o RL, foi possível demonstrar que a PTX neutraliza alguns dos efeitos deletérios do cristalóide, principalmente aqueles associados a apoptose. Estudos anteriores demonstram que a pentoxifilina é capaz de modular a atividade inflamatória pela diminuição do TNF- $\alpha$  e produção de citocinas inflamatória como a IL-6 e IL-10<sup>51, 56</sup>.

Isoladamente, o Ringer lactato é uma das soluções hidroeletrólíticas mais amplamente utilizadas desde a década de 1960. Para o tratamento da sepse frequentemente são necessários 30 mL / kg de peso corporal com duas a três repetições nas primeiras seis horas<sup>9</sup>, quantidade que pode ser ainda maior nos casos de abdômen agudo obstrutivo. Nesses casos, é comum algum grau de



distúrbio metabólico decorrente da acidose. No nosso estudo, o uso isolado de RL não foi efetivo para modificar os achados de lesão renal e, por vezes, apresentou resultados semelhantes ao grupo Controle.

Quando comparamos ao uso isolado da SH, mesmo com um volume de infusão oito vezes menor (32 mL / kg x 8 mL / kg), os resultados foram mais animadores com essa solução. Radhakrishnan e cols.<sup>79</sup> já haviam demonstrado que, em um modelo animal de hipertensão abdominal, houve menor edema e recuperação mais rápida do trânsito intestinal quando comparado com outros cristaloides. Mazzone e cols.<sup>80</sup> demonstraram que a expansão plasmática, devido à alta osmolalidade e tonicidade dessa solução rica em sódio, promove a restauração do fluxo na microcirculação pela capacidade de retenção dos fluídos no espaço intravascular. Até por isso, a SH também auxilia no controle dos radicais livres de oxigênio, na inibição da ativação leucocitária e das citocinas<sup>41, 81</sup>.

A estratégia do tratamento com solução salina hipertônica e pentoxifilina foi estudada em modelos animais de choque hipovolêmico e os trabalhos demonstraram atenuação da resposta inflamatória na fase aguda, com menor produção de citocinas e redução dos marcadores inflamatórios nos tecidos<sup>57, 58, 82</sup>. Apesar dos efeitos animadores do uso isolado destas substâncias em modelo experimental de sepse<sup>37, 42, 51</sup>, as associações são pouco estudadas<sup>57</sup>. Kim e Lee<sup>57</sup>, em trabalho recente, avaliaram a resposta inflamatória aguda após a reanimação volêmica com a PTX associada à solução hipertônica em animais submetidos à injeção intratraqueal de lipopolissacarídeos. O trabalho demonstrou que este tipo de tratamento confere menor expressão de TNF- $\alpha$ ,

IL-10 e IL-6, comparado ao grupo RL. Nesta análise, o acréscimo da PTX ao RL não proporcionou diminuição da atividade inflamatória.

Em estudo prévio de Rasslan e cols.<sup>49</sup>, a SHPTX atenuou o estresse oxidativo, a ativação do NF-kB e a ativação da resposta inflamatória em ratos com obstrução e isquemia intestinal. Em outro estudo, Rocha-Santos e cols.<sup>83</sup> observaram diminuição no estresse oxidativo hepático com a associação SHPTX, por diminuir os efeitos deletérios da lesão de isquemia e reperfusão. Nessa linha, demonstramos que a SHPTX também apresentou melhor perfil sobre o estresse oxidativo e apoptose das células renais do que todas as outras soluções administradas.

O estudo que apresentamos foi consistente em observar as alterações celulares relacionadas aos mecanismos de morte celular, ficando evidente que a apoptose desempenha uma importante via relacionada à LRA. As observações relativas à produção do MDA e nitrito no tecido renal são pertinentes aos estudos com o mesmo modelo experimental conduzido por Rasslan e cols.<sup>59</sup> que fizeram as mesmas observações nos tecidos intestinal e pulmonar. Este conjunto de estudos é importante para colher informações acerca do uso da SHPTX, ampliando o conhecimento sobre essa associação.

Todavia, o presente estudo é limitado por não analisar variáveis fisiológicas e inflamatórias dos animais, não permitindo correlacionar os achados histopatológicos e imunohistoquímicos a exames laboratoriais que refletem a função renal, como a creatinina, a ureia e os eletrólitos. Ainda, não mensuramos objetivamente as alterações da pressão arterial e frequência cardíaca dos animais submetidos às diferentes intervenções e tratamentos.

A resposta inflamatória e a sepse são extremamente complexas e inúmeras variáveis interferem na sua fisiopatologia. A análise de resultados de diferentes terapêuticas precisa ser conduzida em um modelo experimental reprodutível e que permita controlar de forma mais eficiente as variáveis fisiológicas e imunohistoquímicas, para propor as correlações adequadas. Desta forma, a translação do conhecimento experimental poderá ser realizada com maior segurança para o doente.

Por hora, sabemos que o atendimento inicial do doente com SIRS / sepse exige reanimação volêmica vigorosa para restaurar os indicadores hemodinâmicos, distúrbios da microcirculação, alterações celulares e ajustar a demanda e a oferta do consumo metabólico <sup>2</sup>. A melhor forma de instituir essa terapêutica ainda carece de estudos mais consistentes e melhor mensuração de resultados, para propor-se um estudo clínico em humanos.

## 6. Conclusão

---

A reanimação volêmica com solução salina hipertônica a 7,5% associada à pentoxifilina, em modelo de obstrução e isquemia intestinal em ratos, está associada a menor lesão renal, especialmente a lesão associada a apoptose das células renais.

## 7. Anexos

---

**Anexo 1 – Carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa  
239 / 13.**

  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 14/08/2013, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 239/13 intitulado: **"SEPSE INDUZIDA POR OBSTRUÇÃO E ISQUEMIA INTESTINAL EM RATOS: RELAÇÃO DA LESÃO RENAL AGUDA COM O USO DE RINGER LACTATO, SOLUÇÃO SALINA HIPERTÔNICA E PENTOXIFILINA"**, apresentado pelo Departamento de **CIRURGIA**.

Para o presente projeto de pesquisa serão utilizadas amostras de tecido (rins) de ratos wistar conservados do experimento aprovado sob o Protocolo de Pesquisa número 172/11 em 08/06/2011. Não será necessário o uso de novos animais.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

**Pesquisador (a) Responsável: Samir Rasslan**

**Pesquisador (a) Executante: Gustavo Scapini**

CEP-FMUSP, 14 de Agosto de 2013.



**Dr. Eduardo Pompeu**  
Coordenador  
Comissão de Ética no Uso de Animais



**Prof. Dr. Roger Chammas**  
Coordenador  
Comitê de Ética em Pesquisa

**Anexo 2 – Carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa  
172 / 11.**


  
**MEDICINA**  
  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

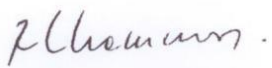
A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **08/06/2011**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **172/11** intitulado: **“EFEITOS DA SOLUÇÃO SALINA HIPERTÔNICA COM PENTOXIFILINA EM MODELO DE SEPSE INDUZIDA POR OBSTRUÇÃO E ISQUEMIA INTESTINAL EM RATOS.”** que utilizará **100** animais da espécie **Ratos**, apresentado pelo Departamento de **CIRURGIA**

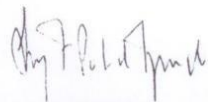
Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

**Pesquisador (a) Responsável: Luiz Francisco Poli de Figueiredo**  
**Pesquisador (a) Executante: Roberto Rasslan**

**CEP-FMUSP, 09 de Junho de 2011.**

  
**Dr. Eduardo Pompeu**  
**Coordenador**  
**Comissão de Ética no Uso de Animais**

  
**Prof. Dr. Roger Chammas**  
**Coordenador**  
**Comitê de Ética em Pesquisa**

  
**Prof. Dr. Luiz Francisco Poli de Figueiredo**  
**Coordenador do Programa de Pós-graduação**  
**Clínica Cirúrgica - FMUSP**



## Anexo 3 – Tabelas

Descritivo - Todos os animais							
Grupos	Animal	Bax	Bcl-2	Bax / Bcl-2	TUNEL	TBARS	Nitrito
Controle	1	9	5	1,80	49	0,40	136,00
	2	8	9	0,89	35	0,37	131,25
	3	6	4	2,00	49	0,29	133,00
	4	9	7	1,29	54	0,23	141,00
	5	5	4	1,25	40	0,42	177,50
	6	4	5	0,80	16	0,21	149,25
	7	6	5	0,60	38	0,37	139,00
	8	6	5	1,50	63	0,37	153,50
RL	9	2	2	1,00	66	0,51	99,00
	10	2	3	0,50	90	0,33	126,00
	11	2	2	1,00	41	0,34	114,25
	12	1	4	0,25	51	0,48	132,75
	13	2	2	1,00	50	0,45	149,75
	14	3	2	1,50	48	0,52	155,25
	15	3	3	1,00	51	0,56	131,75
	16	2	2	1,00	62	0,51	151,25
SH	17	2	3	0,67	19	0,54	120,50
	18	2	3	0,67	16	0,46	154,50
	19	3	2	1,50	31	0,51	139,00
	20	2	3	1,67	21	0,34	157,75
	21	3	3	1,00	11	0,75	166,75
	22	1	3	0,25	23	0,38	139,25
	23	1	2	0,50	9	0,23	135,50
	24	2	3	0,67	18	0,26	146,88
PTX	25	6	4	2,00	41	0,25	150,25
	26	5	3	1,67	46	0,41	176,00
	27	7	3	2,33	45	0,37	161,00
	28	6	3	2,00	44	0,32	146,50
	29	5	5	5,00	36	0,30	161,25
	30	6	3	1,20	56	0,33	156,00
	31	5	2	2,50	42	0,30	156,00
	32	6	3	2,00	62	0,45	136,50
RLPTX	33	6	3	2,00	24	0,42	134,75
	34	5	3	1,67	33	0,41	135,50
	35	5	2	1,25	37	0,30	125,25
	36	5	2	2,50	34	0,27	157,75
	37	6	3	2,00	35	0,28	163,75
	38	5	3	1,67	44	0,24	153,25
	39	6	4	1,50	24	0,32	145,34
	40	5	3	3,50	26	0,40	144,88
SHPTX	41	1	4	0,25	10	0,46	134,25
	42	2	2	0,40	9	0,35	132,00
	43	1	2	0,50	16	0,46	135,88
	44	3	3	1,00	10	0,27	135,50
	45	1	1	3,00	9	0,40	138,50
	46	1	2	0,50	10	0,43	121,50
	47	1	3	0,33	14	0,33	136,25
	48	1	2	0,50	8	0,27	137,44

**Tabela A** – Valores descritivos dos marcadores analisados por grupo de tratamento.

Estatística descritiva - Todos os animais						
	Bax	Bcl-2	Bax/Bcl-2	TUNEL	TBARS	Nitrito
<b>n válido</b>	48	48	48	48	48	48
<b>Mínimo</b>	1,00	1,00	0,25	8,00	0,21	99,00
<b>Máximo</b>	9,00	9,00	5,00	90,00	0,75	177,50
<b>Mediana</b>	3,50	3,00	1,23	35,50	0,37	139,12
<b>Média</b>	3,88	3,21	1,37	34,71	0,38	142,83
<b>Desvio padrão</b>	2,30	1,41	0,92	18,92	0,11	15,28

**Tabela B** – Estatística descritiva de todos os animais.

Descritivo - Bax							
	Animal	Controle	RL	SH	PTX	RLPTX	SHPTX
Eventos de apoptose	1	9,00	2,00	2,00	6,00	6,00	1,00
	2	8,00	2,00	2,00	5,00	5,00	2,00
	3	6,00	2,00	3,00	7,00	5,00	1,00
	4	9,00	1,00	2,00	6,00	5,00	3,00
	5	5,00	2,00	3,00	5,00	6,00	1,00
	6	4,00	3,00	1,00	6,00	5,00	1,00
	7	6,00	3,00	1,00	5,00	6,00	1,00
	8	6,00	2,00	2,00	6,00	5,00	1,00
<b>Mediana</b>		6,00	2,00	2,00	6,00	5,00	1,00
<b>Média</b>		6,63	2,13	2,00	5,75	5,38	1,38
<b>Desvio padrão</b>		1,85	0,64	0,76	0,71	0,52	0,74
<b>Erro padrão</b>		0,65	0,23	0,27	0,25	0,18	0,26
<b>Intervalo (25-75%)</b>		5,25	2,00	1,25	5,00	5,00	1,00
		8,75	2,75	2,75	6,00	6,00	1,75

**Tabela C** - Valores dos eventos de apoptose identificados a partir do marcador imuno-histoquímico Bax (expressos em número / 10 campos microscópicos de 40 x) no tecido renal dos grupos de estudo.

		Descritivo - Bcl-2						
		Animal	Controle	RL	SH	PTX	RLPTX	SHPTX
Eventos de apoptose	1		5,00	2,00	3,00	4,00	3,00	4,00
	2		9,00	3,00	3,00	3,00	3,00	2,00
	3		4,00	2,00	2,00	3,00	2,00	2,00
	4		7,00	4,00	3,00	3,00	2,00	3,00
	5		4,00	2,00	3,00	5,00	3,00	1,00
	6		5,00	2,00	3,00	3,00	3,00	2,00
	7		5,00	3,00	2,00	2,00	4,00	3,00
	8		5,00	2,00	3,00	3,00	3,00	2,00
<b>Mediana</b>			5,00	2,00	3,00	3,00	3,00	2,00
<b>Média</b>			5,50	2,50	2,75	3,25	2,88	2,38
<b>Desvio padrão</b>			1,69	0,76	0,46	0,89	0,64	0,92
<b>Erro padrão</b>			0,60	0,27	0,16	0,31	0,23	0,32
<b>Intervalo (25-75%)</b>			4,25	2,00	2,25	3,00	2,25	2,00
			6,50	3,00	3,00	3,75	3,00	3,00

**Tabela D** - Valores dos eventos de apoptose identificados a partir do marcador imuno-histoquímico Bcl-2 (expressos em número / 10 campos microscópicos de 40 x) no tecido renal.

		Descritivo - Índice Bax / Bcl-2						
		Animal	Controle	RL	SH	PTX	RLPTX	SHPTX
Eventos de apoptose	1		1,80	1,00	0,67	2,00	2,00	0,25
	2		0,89	0,50	0,67	1,67	1,67	0,40
	3		2,00	1,00	1,50	2,33	1,25	0,50
	4		1,29	0,25	1,67	2,00	2,50	1,00
	5		1,25	1,00	1,00	5,00	2,00	3,00
	6		0,80	1,50	0,25	1,20	1,67	0,50
	7		0,60	1,00	0,50	2,50	1,50	0,33
	8		1,50	1,00	0,67	2,00	3,50	0,50
<b>Mediana</b>			1,27	1,00	0,67	2,00	1,84	0,50
<b>Média</b>			1,27	0,91	0,87	2,34	2,01	0,81
<b>Desvio padrão</b>			0,49	0,38	0,49	1,15	0,71	0,91
<b>Erro padrão</b>			0,17	0,13	0,17	0,41	0,25	0,32
<b>Intervalo (25-75%)</b>			0,82	0,63	0,54	1,75	1,54	0,35
			1,73	1,00	1,38	2,46	2,38	0,88

**Tabela E** – Valores do índice Bax / Bcl-2 (expresso em números absolutos).

Descritivo - TUNEL							
	Animal	Controle	RL	SH	PTX	RLPTX	SHPTX
Eventos de apoptose	1	49,00	66,00	19,00	41,00	24,00	10,00
	2	35,00	90,00	16,00	46,00	33,00	9,00
	3	49,00	41,00	31,00	45,00	37,00	16,00
	4	54,00	51,00	21,00	44,00	34,00	10,00
	5	40,00	50,00	11,00	36,00	35,00	9,00
	6	16,00	48,00	23,00	56,00	44,00	10,00
	7	38,00	51,00	9,00	42,00	24,00	14,00
	8	63,00	62,00	18,00	62,00	26,00	8,00
<b>Mediana</b>		44,50	51,00	18,50	44,50	33,50	10,00
<b>Média</b>		43,00	57,38	18,50	46,50	32,13	10,75
<b>Desvio padrão</b>		14,24	15,36	6,93	8,45	7,04	2,76
<b>Erro padrão</b>		5,04	5,43	2,45	2,99	2,49	0,98
<b>Intervalo (25-75%)</b>		35,75	48,50	12,25	41,25	24,50	9,00
		52,75	65,00	22,50	53,50	36,50	13,00

**Tabela F** - Valores dos eventos de apoptose identificados a partir do marcador imuno-histoquímico TUNEL (expressos em número / 10 campos microscópicos de 40x) no tecido renal.

Descritivo - TBARS							
	Animal	Controle	RL	SH	PTX	RLPTX	SHPTX
nmol / mg proteínas	1	0,40	0,51	0,54	0,25	0,42	0,46
	2	0,37	0,33	0,46	0,41	0,41	0,35
	3	0,29	0,34	0,51	0,37	0,30	0,46
	4	0,23	0,48	0,34	0,32	0,27	0,27
	5	0,42	0,45	0,75	0,30	0,28	0,40
	6	0,21	0,52	0,38	0,33	0,24	0,43
	7	0,37	0,56	0,23	0,30	0,32	0,33
	8	0,37	0,51	0,26	0,45	0,40	0,27
<b>Mediana</b>		0,37	0,50	0,42	0,33	0,31	0,38
<b>Média</b>		0,33	0,46	0,43	0,34	0,33	0,37
<b>Desvio padrão</b>		0,08	0,08	0,17	0,07	0,07	0,08
<b>Erro padrão</b>		0,03	0,03	0,06	0,02	0,02	0,03
<b>Intervalo (25-75%)</b>		0,25	0,37	0,28	0,30	0,27	0,29
		0,39	0,52	0,53	0,40	0,41	0,45

**Tabela G** - Valores da dosagem de MDA pela técnica de TBARS (expresso em nmol / mg de proteínas) no tecido renal.

Descritivo - Nitrito							
	Animal	Controle	RL	SH	PTX	RLPTX	SHPTX
μmol / mg de tecido	1	136,00	99,00	120,50	150,25	134,75	134,25
	2	131,25	126,00	154,50	176,00	135,50	132,00
	3	133,00	114,25	139,00	161,00	125,25	135,88
	4	141,00	132,75	157,75	146,50	157,75	135,50
	5	177,50	149,75	166,75	161,25	163,75	138,50
	6	149,25	155,25	139,25	156,00	153,25	121,50
	7	139,00	131,75	135,50	156,00	145,34	136,25
	8	153,50	151,25	146,88	136,50	144,88	137,44
<b>Mediana</b>		140,00	132,25	143,07	156,00	145,11	135,69
<b>Média</b>		145,06	132,50	145,02	155,44	145,06	133,92
<b>Desvio padrão</b>		15,18	19,51	14,58	11,67	12,92	5,39
<b>Erro padrão</b>		5,37	6,90	5,16	4,13	4,57	1,90
<b>Intervalo</b>		133,75	117,19	136,38	147,44	134,94	132,56
<b>(25-75%)</b>		152,44	150,88	156,94	161,19	156,63	137,14

**Tabela H** - Valores da dosagem de nitrito (expresso em μmol / mg de tecido) no tecido renal.

## 8. Referências

---

- 1 Rasslan S. Obstrução Intestinal. in Rasslan, S. Afecções Cirúrgicas de Urgência. São Paulo: Robe editorial, 1995. pp. 121-137. .
- 2 Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM *et al.* Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med* 2013; 41: 580–637.
- 3 Deitch EA. Gut-origin sepsis: evolution of a concept. *Surgeon* 2012; 10: 350–356.
- 4 Nellgard P, Cassuto J. Inflammation as a major cause of fluid losses in small-bowel obstruction. *Scand J Gastroenterol* 1993; 28: 1035–1041.
- 5 Goncalves GM, Zamboni DS, Camara NOS. The role of innate immunity in septic acute kidney injuries. *Shock* 2010; 34 Suppl 1: 22–26.
- 6 Umegaki T, Ikai H, Imanaka Y. The impact of acute organ dysfunction on patients' mortality with severe sepsis. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* 2011; 27: 180–184.
- 7 Samel S, Keese M, Kleczka M, Lanig S, Gretz N, Hafner M *et al.* Microscopy of bacterial translocation during small bowel obstruction and ischemia in vivo--a new animal model. *BMC Surg* 2002; 2: 6.
- 8 Silva E, Passos RDH, Ferri MB, de Figueiredo LFP. Sepsis: from bench to bedside. *Clinics (Sao Paulo)* 2008; 63: 109–120.
- 9 Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B *et al.* Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001; 345: 1368–1377.
- 10 Vincent J-L, Gerlach H. Fluid resuscitation in severe sepsis and septic shock: an evidence-based review. *Crit Care Med* 2004; 32: S451–4.
- 11 Rivers EP, Coba V, Whitmill M. Early goal-directed therapy in severe sepsis and septic shock: a contemporary review of the literature. *Curr Opin Anaesthesiol* 2008; 21: 128–140.
- 12 Diaz JJJ, Bokhari F, Mowery NT, Acosta JA, Block EFJ, Bromberg WJ *et al.* Guidelines for management of small bowel obstruction. *J Trauma* 2008; 64: 1651–1664.
- 13 Bagshaw SM, Uchino S, Bellomo R, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M *et al.* Septic acute kidney injury in critically ill patients: clinical characteristics and outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; 2: 431–439.
- 14 Zarbock A, Gomez H, Kellum JA. Sepsis-induced acute kidney injury revisited: pathophysiology, prevention and future therapies. *Curr Opin Crit Care* 2014; 20: 588–595.

- 15 Langenberg C, Wan L, Egi M, May CN, Bellomo R. Renal blood flow in experimental septic acute renal failure. *Kidney Int* 2006; 69: 1996–2002.
- 16 Wan L, Bagshaw SM, Langenberg C, Saotome T, May C, Bellomo R. Pathophysiology of septic acute kidney injury: what do we really know? *Crit Care Med* 2008; 36: S198–203.
- 17 Ishikawa K, May CN, Gobe G, Langenberg C, Bellomo R. Pathophysiology of septic acute kidney injury: a different view of tubular injury. *Contrib Nephrol* 2010; 165: 18–27.
- 18 Racusen LC, Fivush BA, Li YL, Slatnik I, Solez K. Dissociation of tubular cell detachment and tubular cell death in clinical and experimental ‘acute tubular necrosis’. *Lab Invest* 1991; 64: 546–556.
- 19 Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239–257.
- 20 Lieberthal W, Levine JS. Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol* 1996; 271: F477–88.
- 21 Strasser A, O’Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 217–245.
- 22 Kaushal GP, Basnakian AG, Shah S V. Apoptotic pathways in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 2004; 66: 500–506.
- 23 Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 2002; 296: 1635–1636.
- 24 Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal* 2003; 15: 983–992.
- 25 Lanave C, Santamaria M, Saccone C. Comparative genomics: the evolutionary history of the Bcl-2 family. *Gene* 2004; 333: 71–79.
- 26 Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1644: 83–94.
- 27 Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493–501.
- 28 Schumer M, Colombel MC, Sawczuk IS, Gobe G, Connor J, O’Toole KM *et al.* Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am J Pathol* 1992; 140: 831–838.



- 29 Iwata M, Myerson D, Torok-Storb B, Zager RA. An evaluation of renal tubular DNA laddering in response to oxygen deprivation and oxidant injury. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5: 1307–1313.
- 30 Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 647–656.
- 31 Loo DT. In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques. *Methods Mol Biol* 2011; 682: 3–13.
- 32 Zhou F, Peng Z-Y, Bishop J V, Cove ME, Singbartl K, Kellum JA. Effects of fluid resuscitation with 0.9% saline versus a balanced electrolyte solution on acute kidney injury in a rat model of sepsis\*. *Crit Care Med* 2014; 42: e270–8.
- 33 Myburgh JA, Mythen MG. Resuscitation fluids. *N Engl J Med* 2013; 369: 1243–1251.
- 34 Savage SA, Fitzpatrick CM, Kashyap VS, Clouse WD, Kerby JD. Endothelial dysfunction after lactated Ringer's solution resuscitation for hemorrhagic shock. *J Trauma* 2005; 59: 284–290.
- 35 Moore FA. The use of lactated ringer's in shock resuscitation: the good, the bad and the ugly. *J Trauma* 2011; 70: S15–6.
- 36 Vincent J-L, Gottin L. Type of fluid in severe sepsis and septic shock. *Minerva Anestesiol* 2011; 77: 1190–1196.
- 37 Libert N, de Rudnicki S, Cirodde A, Thepenier C, Mion G. [Is there any place for hypertonic saline for fluid resuscitation in septic shock]. *Ann Fr Anesth Reanim* 2010; 29: 25–35.
- 38 Perel P, Roberts I, Ker K. Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill patients. *Cochrane database Syst Rev* 2013; 2: CD000567.
- 39 Velasco IT, Pontieri V, Rocha e Silva MJ, Lopes OU. Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock. *Am J Physiol* 1980; 239: H664–73.
- 40 Poli-de-Figueiredo LF, Cruz RJJ, Sannomiya P, Rocha-E-Silva M. Mechanisms of action of hypertonic saline resuscitation in severe sepsis and septic shock. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2006; 6: 201–206.
- 41 Oliveira RP, Velasco I, Soriano FG, Friedman G. Clinical review: Hypertonic saline resuscitation in sepsis. *Crit Care* 2002; 6: 418–423.
- 42 Shih C-C, Chen S-J, Chen A, Wu J-Y, Liaw W-J, Wu C-C. Therapeutic effects of hypertonic saline on peritonitis-induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats. *Crit Care Med* 2008; 36: 1864–1872.

- 43 Hatanaka E, Shimomi FM, Curi R, Campa A. Sodium chloride inhibits cytokine production by lipopolysaccharide-stimulated human neutrophils and mononuclear cells. *Shock* 2007; 27: 32–35.
- 44 Theobaldo MC, Barbeiro HV, Barbeiro DF, Petroni R, Soriano FG. Hypertonic saline solution reduces the inflammatory response in endotoxemic rats. *Clinics (Sao Paulo)* 2012; 67: 1463–1468.
- 45 Shields CJ, O’Sullivan AW, Wang JH, Winter DC, Kirwan WO, Redmond HP. Hypertonic saline enhances host response to bacterial challenge by augmenting receptor-independent neutrophil intracellular superoxide formation. *Ann Surg* 2003; 238: 249–257.
- 46 Hannemann L, Reinhart K, Korell R, Spies C, Bredle DL. Hypertonic saline in stabilized hyperdynamic sepsis. *Shock* 1996; 5: 130–134.
- 47 van Haren FMP, Sleigh J, Boerma EC, La Pine M, Bahr M, Pickkers P *et al.* Hypertonic fluid administration in patients with septic shock: a prospective randomized controlled pilot study. *Shock* 2012; 37: 268–275.
- 48 Cruz RJJ, Yada-Langui MM, de Figueiredo LFP, Sinosaki S, Rocha e Silva M. The synergistic effects of pentoxifylline on systemic and regional perfusion after hemorrhage and hypertonic resuscitation. *Anesth Analg* 2006; 102: 1518–1524.
- 49 Rasslan R, Utiyama EM, Marques GMN, Ferreira TC, Costa VAP da, Victo NC de *et al.* Inflammatory activity modulation by hypertonic saline and pentoxifylline in a rat model of strangulated closed loop small bowel obstruction. *Int J Surg* 2014; 12: 594–600.
- 50 Coimbra R, Melbostad H, Hoyt DB. Effects of phosphodiesterase inhibition on the inflammatory response after shock: role of pentoxifylline. *J Trauma* 2004; 56: 442–449.
- 51 Kreth S, Ledderose C, Luchting B, Weis F, Thiel M. Immunomodulatory properties of pentoxifylline are mediated via adenosine-dependent pathways. *Shock* 2010; 34: 10–16.
- 52 Salhiyyah K, Senanayake E, Abdel-Hadi M, Booth A, Michaels JA. Pentoxifylline for intermittent claudication. *Cochrane database Syst Rev* 2012; 1: CD005262.
- 53 Whitfield K, Rambaldi A, Wetterslev J, Gluud C. Pentoxifylline for alcoholic hepatitis. *Cochrane database Syst Rev* 2009; : CD007339.
- 54 Koyluoglu G, Bakici MZ, Elagoz S, Arpacik M. The effects of pentoxifylline treatment on bacterial translocation after hemorrhagic shock in rats. *Clin Exp Med* 2001; 1: 61–66.

- 55 Kocdor MA, Kocdor H, Gulay Z, Gokce O. The effects of pentoxifylline on bacterial translocation after intestinal obstruction. *Shock* 2002; 18: 148–151.
- 56 Staubach KH, Schroder J, Stuber F, Gehrke K, Traumann E, Zabel P. Effect of pentoxifylline in severe sepsis: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arch Surg* 1998; 133: 94–100.
- 57 Kim HJ, Lee KH. The effectiveness of hypertonic saline and pentoxifylline (HTS-PTX) resuscitation in haemorrhagic shock and sepsis tissue injury: comparison with LR, HES, and LR-PTX treatments. *Injury* 2012; 43: 1271–1276.
- 58 Coimbra R, Porcides R, Loomis W, Melbostad H, Lall R, Deree J *et al.* HSPTX protects against hemorrhagic shock resuscitation-induced tissue injury: an attractive alternative to Ringer's lactate. *J Trauma* 2006; 60: 41–51.
- 59 Rasslan R. *Efeito da solução salina hipertônica e da pentoxifilina sobre o estresse oxidativo e a resposta inflamatória na sepse induzida por obstrução e isquemia intestinal em ratos.* 2013.
- 60 Souza V, Oliveira R, Lucena H. Gentamicin induces renal morphopathology in Wistar rats. *Int J Morphol* 2009; 27: 59–63.
- 61 Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126: 131–138.
- 62 Gomez H, Ince C, De Backer D, Pickkers P, Payen D, Hotchkiss J *et al.* A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics, and the tubular cell adaptation to injury. *Shock* 2014; 41: 3–11.
- 63 Seija M, Baccino C, Nin N, Sanchez-Rodriguez C, Granados R, Ferruelo A *et al.* Role of peroxynitrite in sepsis-induced acute kidney injury in an experimental model of sepsis in rats. *Shock* 2012; 38: 403–410.
- 64 Poli-de-Figueiredo LF, Garrido AG, Nakagawa N, Sannomiya P. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock*. 2008; 30 Suppl 1: 53–59.
- 65 Esmon CT. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit Care Med* 2004; 32: S219–22.
- 66 Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol* 2011; 19: 198–208.
- 67 Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW 3rd, Bland KI *et al.* Cecal ligation and puncture. *Shock* 2005; 24 Suppl 1: 52–57.

- 68 Parker SJ, Watkins PE. Experimental models of gram-negative sepsis. *Br J Surg* 2001; 88: 22–30.
- 69 Zanoni FL, Benabou S, Greco KV, Moreno ACR, Cruz JWMC, Figueira FP *et al.* Mesenteric microcirculatory dysfunctions and translocation of indigenous bacteria in a rat model of strangulated small bowel obstruction. *Clinics (Sao Paulo)* 2009; 64: 911–919.
- 70 Luiz Zanoni F, Costa Cruz JWM, Martins JO, Benabou S, Vicente Greco K, Ramos Moreno AC *et al.* Hypertonic saline solution reduces mesenteric microcirculatory dysfunctions and bacterial translocation in a rat model of strangulated small bowel obstruction. *Shock* 2013; 40: 35–44.
- 71 Akcay MN, Capan MY, Gundogdu C, Polat M, Oren D. Bacterial translocation in experimental intestinal obstruction. *J Int Med Res* 1996; 24: 17–26.
- 72 Lentini P, de Cal M, Cruz D, Chronopoulos A, Soni S, Nalesso F *et al.* The role of advanced oxidation protein products in intensive care unit patients with acute kidney injury. *J Crit Care* 2010; 25: 605–609.
- 73 Ware LB, Fessel JP, May AK, Roberts LJ 2nd. Plasma biomarkers of oxidant stress and development of organ failure in severe sepsis. *Shock* 2011; 36: 12–17.
- 74 Okazaki S, Tachibana Y, Koga-Ogawa Y, Takeshita K. Redox evaluation in sepsis model mice by the in vivo ESR technique using acyl-protected hydroxylamine. *Free Radic Biol Med* 2014; 68: 72–79.
- 75 Salomao R, Brunialti MKC, Rapozo MM, Baggio-Zappia GL, Galanos C, Freudenberg M. Bacterial sensing, cell signaling, and modulation of the immune response during sepsis. *Shock* 2012; 38: 227–242.
- 76 Lopes JA, Fernandes P, Jorge S, Resina C, Santos C, Pereira A *et al.* Long-term risk of mortality after acute kidney injury in patients with sepsis: a contemporary analysis. *BMC Nephrol* 2010; 11: 9.
- 77 Enochsson L, Nylander G, Ohman U. Effects of intraluminal pressure on regional blood flow in obstructed and unobstructed small intestines in the rat. *Am J Surg* 1982; 144: 558–561.
- 78 Shih C-C, Tsai M-F, Chen S-J, Tsao C-M, Ka S-M, Huang H-C *et al.* Effects of small-volume hypertonic saline on acid-base and electrolytes balance in rats with peritonitis-induced sepsis. *Shock* 2012; 38: 649–655.
- 79 Radhakrishnan RS, Xue H, Moore-Olufemi SD, Weisbrodt NW, Moore FA, Allen SJ *et al.* Hypertonic saline resuscitation prevents hydrostatically induced intestinal edema and ileus. *Crit Care Med* 2006; 34: 1713–1718.

- 80 Mazzoni MC, Borgstrom P, Arfors KE, Intaglietta M. Dynamic fluid redistribution in hyperosmotic resuscitation of hypovolemic hemorrhage. *Am J Physiol* 1988; 255: H629–37.
- 81 Khan R, Kirschenbaum LA, Larow C, Astiz ME. The effect of resuscitation fluids on neutrophil-endothelial cell interactions in septic shock. *Shock* 2011; 36: 440–444.
- 82 Deree J, de Campos T, Shenvi E, Loomis WH, Hoyt DB, Coimbra R. Hypertonic saline and pentoxifylline attenuates gut injury after hemorrhagic shock: the kinder, gentler resuscitation. *J Trauma* 2007; 62: 818.
- 83 Rocha-Santos V, Figueira ERR, Rocha-Filho JA, Coelho AMM, Pinheiro RS, Bacchella T *et al.* Pentoxifylline enhances the protective effects of hypertonic saline solution on liver ischemia reperfusion injury through inhibition of oxidative stress. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2015; 14: 194–200.