

**PAULO JOSÉ DE MEDEIROS**

**EFEITO DO SILDENAFIL NA LESÃO RENAL POR ISQUEMIA-  
REPERFUSÃO EM RATOS**

NATAL – RN

2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**PAULO JOSÉ DE MEDEIROS**

**EFEITO DO SILDENAFIL NA LESÃO RENAL POR ISQUEMIA-  
REPERFUSÃO EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Aldo da Cunha Medeiros

NATAL – RN

2010

## Ficha catalográfica

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Profa. Dra. Técia Maria de Oliveira Maranhão

Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**PAULO JOSÉ DE MEDEIROS**

**EFEITO DO SILDENAFIL NA LESÃO RENAL POR ISQUEMIA-  
REPERFUSÃO EM RATOS**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aldo da Cunha Medeiros – UFRN – Presidente

Profa. Dra. Maria Goretti Freire de Carvalho – UnP

Prof. Dr. Jael Soares Batista – UFERSA

Prof. Dr. George Dantas de Azevedo – UFRN

Profa. Dra. Maria José Pereira Vilar – UFRN

Aprovada em: 09/07/2010

## DEDICATÓRIA

A minha esposa Eliana,  
Aos meus filhos Luísa Paula,  
João Paulo e Paulo Augusto

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Aldo da Cunha Medeiros, meu orientador, pela oportunidade, pelo exemplo na profissão, e, sobretudo, pela paciência com seus orientandos.

Ao Prof. Dr. Sílvio Tucci Júnior, pelo incentivo e ajuda na discussão da metodologia do projeto.

Ao Prof. Dr. Francisco Pignataro Lima, pela disponibilidade e pelo trabalho na avaliação histopatológica.

A Ítalo Medeiros de Azevedo, por toda a ajuda na análise estatística e na execução da avaliação cintilográfica do projeto.

Ao Dr. Arthur Villarim Netto, por sua ajuda na disponibilização do EC-99mTc.

Às funcionárias da LIGA, Maria Kadja e Kércia Regina, pela manipulação e preparo do EC-99mTc.

À Érica Silva, pelo preparo da solução de sildenafil.

À Layra Ribeiro de Sousa Leão, pela ajuda na execução dos experimentos.

Ao PPGCSa, que tornou possível a realização do sonho da pós-graduação em Natal-RN.

# SUMÁRIO

Dedicatória .....	v
Agradecimentos .....	vi
Resumo .....	x
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 OBJETIVO .....	3
3 REVISÃO DA LITERATURA .....	4
3.1. Fisiopatologia da lesão renal por isquemia-reperfusão .....	4
3.1.1. Isquemia celular .....	4
3.2. Isquemia renal .....	5
3.2.1. Alterações vasculares.....	5
3.2.2. Lesão tubular renal .....	6
3.3. Sildenafil .....	7
3.4. Métodos de avaliação da isquemia renal.....	8
3.4.1. Cintilografia.....	8
3.4.2. Histopatologia .....	10
4 METODOLOGIA .....	11
5 RESULTADOS .....	18
5.1. Resultados cintilográficos .....	18
5.2. Resultados histopatológicos .....	20
6 DISCUSSÃO .....	23
6.1. Linha de pesquisa .....	23
6.2. Metodologia .....	24
6.3. Resultados.....	26
7 CONCLUSÃO .....	31
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	32
Abstract	

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATP	adenosina trifosfato
NO	<i>nitric oxide</i> (óxido nítrico)
GMPc	guanosina 3',5'-monofosfato cíclico
PDE5	fosfodiesterase 5
KeV	quilo electron-volt
MAG3-99mTc	99m Tecnécio complexado a mercaptoacetil-triglicina
DTPA-99mTc	99m Tecnécio complexado a dietileno-triamino-pentacetato
EC-99mTc	99m Tecnécio complexado a etilenodicisteína
DMSA-99mTc	99m Tecnécio complexado a dimercaptosuccinato
NTA	necrose tubular aguda
LIGA	Liga Norte-rio-grandense contra o Câncer
ROIS	região de interesse
TFG	taxa de filtração glomerular
CORM	moléculas liberadoras de monóxido de carbono

## RESUMO

A lesão renal causada pelo processo isquemia-reperfusão ocorre em várias intervenções cirúrgicas, como transplantes de rins, cirurgias vasculares renais e na nefrectomia parcial. Devido ao processo isquêmico, ocorre disfunção do órgão e morte celular. Com o objetivo de avaliar o efeito do sildenafil, em ratos, administrado previamente à isquemia renal e reperfusão, em avaliações cintilográficas e histopatológicas, foram utilizados vinte e quatro ratos *Wistar*, aleatoriamente distribuídos em dois grupos. Os animais receberam 0,1 ml IV <sup>99m</sup>Tecnécio-Etilenodicitestina, realizando-se a cintilografia renal inicial e, em seguida, foram submetidos à laparotomia, provocando-se isquemia no rim esquerdo, com oclusão da artéria renal, durante 1 hora, com posterior reperfusão. Os animais do grupo sildenafil receberam previamente 1mg/kg de sildenafil via oral, 60 minutos antes da isquemia. O grupo controle recebeu somente solução salina. Após a isquemia e reperfusão, metade dos animais de cada grupo foi avaliada com 24 horas e a outra metade, com sete dias, com nova cintilografia renal. Após eutanásia, com superdose de anestésico, os rins foram retirados e submetidos a exame histopatológico. Empregou-se avaliação estatística com o teste t de *Student* e com teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Foi observado no rim esquerdo do grupo controle um déficit funcional nas imagens cintilográficas, após sete dias, comparativamente ao respectivo estudo cintilográfico inicial ( $p < 0,05$ ). Nos rins esquerdos dos animais do grupo controle (24 horas pós-isquemia), ocorreu um maior grau de necrose celular quando comparados ao grupo tratado com o sildenafil ( $p < 0,05$ ). A cintilografia e a histopatologia demonstraram que o sildenafil exerceu ação protetora dos rins, após episódio de isquemia-reperfusão renal normotérmica. Deve ressaltar-se o

caráter interdisciplinar desta tese, que contou com a participação ativa de profissionais das áreas de cirurgia, medicina nuclear, urologia, patologia e estatística.

Palavras-chave: Isquemia. Reperusão. Rim. Cintilografia. Ratos. Sildenafil.

# 1 INTRODUÇÃO

A lesão renal causada pelo processo isquemia-reperfusão ocorre, inevitavelmente, nas várias intervenções cirúrgicas em que o rim permanece sem receber irrigação sanguínea. Ela é observada durante transplantes de rins, intervenções cirúrgicas vasculares na aorta e nas artérias renais e na nefrectomia parcial. Nos transplantes renais, a incidência de disfunção do enxerto, rejeição aguda e nefropatias crônicas correlacionam-se com o grau de lesão isquêmica e aumenta proporcionalmente com o tempo de isquemia normotérmica, presente quando se utiliza órgãos de doadores sem batimentos cardíacos<sup>1</sup>. Nas nefrectomias parciais, embora o objetivo seja a preservação da função renal, a lesão da isquemia-reperfusão frequentemente ocorre no parênquima renal remanescente, devido ao clampeamento da artéria renal, realizado com o objetivo de diminuir sangramento e permitir adequada visualização do campo operatório<sup>2,3</sup>. Com base em estudos experimentais realizados nos anos 70, em geral, utiliza-se a hipotermia renal *in situ* para diminuir a atividade metabólica e administra-se manitol para reduzir o edema celular, em casos de prolongado clampeamento da artéria renal no intraoperatório. Quanto à isquemia normotérmica, experimentalmente, esse tempo pode chegar aos 90 minutos<sup>4-8</sup>. Entretanto, na prática clínica, o tempo limite máximo tolerável de isquemia normotérmica é de 30 minutos. Na realização da nefrectomia parcial aberta, tal intervalo de tempo é suficiente, sendo fácil promover a hipotermia renal. Contudo, nas nefrectomias parciais laparoscópicas, o desafio técnico é maior, tanto para realizar a hipotermia renal, quanto para realizar o procedimento. Com isso, o intervalo de 30 minutos é limitante para muitos cirurgiões e, conseqüentemente, a opção terapêutica em muitos centros para pacientes com

pequenos tumores renais é a nefrectomia parcial aberta ou a nefrectomia total laparoscópica<sup>9</sup>.

Recentemente, tem havido um interesse considerável em investigar o papel do sildenafil na proteção de lesões decorrentes de isquemia-reperfusão, em modelos animais. Trata-se de uma nova classe de drogas vasoativas que tem sido desenvolvida para o tratamento da disfunção erétil. Seu mecanismo de ação envolve a inibição ativa da enzima fosfodiesterase do tipo 5 (PDE5), resultando no aumento da guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc), do óxido nítrico (NO) e na melhora da disfunção endotelial<sup>10</sup>. Foi demonstrado que a droga induz um efeito cardioprotetor contra lesão por isquemia-reperfusão, em coelhos. O efeito foi atribuído ao mecanismo farmacológico preconditionante<sup>11</sup>. Lledo-Garcia *et al.* descreveram efeito benéfico produzido pelo sildenafil em rins de porcos que foram transplantados, após um período de isquemia quente<sup>12</sup>.

Visando a procurar melhor o entendimento e soluções para o problema das lesões renais, após isquemia-reperfusão, o alvo deste estudo experimental foi determinar os efeitos do sildenafil administrado como um fármaco preconditionante, antes do período de isquemia-reperfusão.

## **2 OBJETIVO**

Avaliar o efeito do sildenafil administrado, previamente, à isquemia renal, em ratos, utilizando avaliações cintilográficas e histopatológicas renais.

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1. Fisiopatologia da lesão renal por isquemia-reperfusão

#### 3.1.1. Isquemia celular

A isquemia consiste na redução do suprimento de oxigênio e nutrientes para as células, geralmente devido à diminuição ou interrupção no fluxo sanguíneo, como ocorre na obstrução mecânica do sistema arterial. Além da falta de oxigênio, a produção de energia está comprometida pela falta de substrato para a produção de energia, após os substratos glicolíticos locais terem sido exauridos. Quando a tensão de oxigênio intracelular diminui, ocorre uma parada na fosforilação oxidativa, depleção de adenosina trifosfato (ATP), falência da bomba de sódio e potássio, resultando em edema celular. Verifica-se também entrada de cálcio intracelular, com seus efeitos deletérios. Há perda progressiva de glicogênio e diminuição de síntese protéica. Caso a isquemia continue, a depleção de ATP piora, causando mais deterioração, sucedendo perda do padrão ultraestrutural celular, com formação de bolhas na superfície da célula. As mitocôndrias encontram-se edemaciadas devido à perda do controle de volume nessas organelas, o retículo endoplasmático permanece dilatado e a célula inteira tem aspecto edemaciado. Caso o suprimento de oxigênio seja restabelecido, tais alterações são reversíveis. Contudo, se a isquemia persistir, a lesão torna-se irreversível, ocorrendo necrose ou morte celular<sup>13</sup>.

Restabelecendo-se o fluxo sanguíneo para os tecidos isquêmicos, pode ocorrer uma lesão adicional, acarretando um aumento da lesão e morte celular. Este processo é conhecido como lesão por isquemia-reperfusão e tem sua importância clínica porque pode piorar o dano celular, após terapias que restabelecem o fluxo sanguíneo. Os mecanismos propostos para explicar a lesão por isquemia-reperfusão são a produção celular de radicais livres de oxigênio, a ação de citocinas intensificando a resposta inflamatória e a ativação do sistema complemento. Radicais livres são moléculas que possuem um elétron solitário na camada externa, sendo extremamente instáveis e reativos. Durante a reperfusão, há aumento na geração de radicais livres de oxigênio nas células endoteliais, parenquimatosas e nos leucócitos. Este aumento é resultado do dano mitocondrial, da ação de oxidases nestas células e da redução na concentração de antioxidantes causada pela hipóxia. O efeito lesivo dos radicais livres dá-se pela peroxidação dos ácidos graxos das membranas celulares, pela inativação do DNA e do óxido nítrico<sup>14-16</sup>.

## **3.2. Isquemia renal**

### **3.2.1. Alterações vasculares**

A lesão isquêmica renal é um frequente problema clínico associado com alta mortalidade. A redução na taxa de filtração glomerular que ocorre após isquemia tem sido atribuído à vasoconstrição persistente, potencializada pela ativação do *feedback* túbulo-gomerular, bem como pelo resultado do aumento da liberação de solutos na mácula densa. O aumento na liberação de solutos para o nefron distal é causado pela perda de integridade da junção intracelular, resultando em menor

reabsorção de sódio, e pela perda da polaridade celular no túbulo proximal, com falência da bomba de sódio-potássio<sup>17</sup>.

A lesão endotelial resulta em edema celular e aumento da expressão de moléculas de adesão celular. Isto, junto com a ativação leucocitária, leva ao aumento na interação leucócito-endotelial, promovendo mais lesão e edema das células endoteliais, impedindo fisicamente o fluxo sanguíneo, contribuindo para a produção de fatores locais que promovem mais vasoconstrição<sup>18</sup>. A lesão endotelial também leva à mudança nas respostas das arteríolas às substâncias vasoativas. As arteríolas dos rins pos-isquemia têm um aumento no tônus basal e na reatividade aos agentes vasoconstritores, e uma resposta vasodilatadora diminuída comparada com arteríolas de rins normais. O NO é um vasodilatador que diminui a expressão de endotelinas e sua atividade no endotélio vascular, efeito que pode ser protetor contra a lesão isquêmica renal. Normalmente, o NO gerado pelas células endoteliais tem uma importante função vasodilatadora, mas sua produção pela enzima óxido nítrico sintetase endotelial é inibida na isquemia<sup>19</sup>.

### **3.2.2. Lesão tubular renal**

A depleção de ATP, que ocorre durante a isquemia nas células endoteliais e tubulares, promove severos distúrbios metabólicos. Inicialmente, essas células são protegidas da lesão isquêmica pelas altas concentrações intracelulares de glicina, pela diminuição do pH e pela possibilidade de glicólise como uma alternativa para gerar ATP<sup>20</sup>. Os segmentos tubulares distais são mais glicolíticos que os segmentos mais proximais e, com isso, têm um maior potencial para sobreviver à lesão isquêmica<sup>21</sup>. Os nucleotídeos guanosínicos têm efeito pleiotrópico na promoção da

sobrevivência tubular. Os efeitos vasodilatadores no fator atrial natriurético e do NO são mediados pelo GMPc. Demonstrou-se que a inibição da fosfodiesterase com zaprinast aumenta o fluxo renal e melhora o quadro de falência renal, após uma lesão isquêmica<sup>22</sup>.

Bioquimicamente, há depleção de ATP, acúmulo de cálcio intracelular, ativação de proteases, que causa ruptura do citoesqueleto, ativação de fosfolipases, que lesa a membrana celular, geração de radicais livres e ativação de caspases, que induz a apoptose<sup>23</sup>. Precocemente, há perda da polaridade celular e aumento da oferta de sódio nos túbulos distais. Isto desencadeia vasoconstrição através do *feedback* tubuloglomerular. Adicionalmente, as células isquêmicas tubulares expressam citocinas e moléculas de adesão, recrutando leucócitos que participam da reação inflamatória. Com o tempo, as células lesadas desprendem-se das membranas basais e causam obstrução tubular, que associado com o vazamento do fluido para o interstício, resulta em edema intersticial, pressão intratubular elevada e mais lesão<sup>23</sup>.

### **3.3. Sildenafil**

Com o propósito de proteger os órgãos contra os efeitos da isquemia-reperfusão, várias substâncias foram usadas em estudos experimentais. Uma delas é o citrato de sildenafil, um inibidor seletivo da PDE5, uma enzima que catalisa a quebra do potente relaxante de musculatura lisa, o GMPc. O sildenafil é uma base fraca (pKa 6,5), e moderadamente lipofílico, resultando em uma boa solubilidade e absorção no trato gastrointestinal<sup>24</sup>. Há 11 famílias de fosfodiesterases identificadas

nos mamíferos. Estudos imuno-histoquímicos têm demonstrado a presença de PDE5 no músculo liso vascular e brônquico e nas plaquetas<sup>25-27</sup>. O sildenafil foi desenvolvido para o tratamento da disfunção erétil e depois mostrou eficácia contra a disfunção endotelial em transplantados de coração<sup>28</sup>. Atualmente, é uma das drogas de escolha para tratamento da hipertensão pulmonar<sup>29</sup> e há um estudo mostrando efeito protetor na isquemia renal<sup>12</sup>.

### **3.4. Métodos de avaliação da isquemia renal**

#### **3.4.1. Cintilografia**

Vários métodos radiológicos são disponíveis para avaliar o sistema urinário, como a urografia excretora, ultrassonografia renal, tomografia computadorizada e ressonância magnética. Contudo, a cintilografia renal é o método de escolha para determinar a função diferencial de cada rim. A cintilografia renal baseia-se na administração de um composto radioativo que tenha afinidade metabólica específica pelo parênquima renal e que, ao mesmo tempo, emita continuamente alguma forma de radiação, permitindo que todo o processo seja registrado como imagens quantificáveis, por meio de um detector (câmara de cintilação). Os radioisótopos são átomos que, em seu estado de instabilidade nuclear, emitem radiação. O tecnécio-99 metaestável, obtido através de gerador de molibdênio-99, é o radioisótopo mais utilizado mundialmente, com tempo médio de decaimento (meia-vida) igual a 6 horas, sendo emissor gama “puro”, com energia de 140keV. Um radiofármaco é a combinação de um radioisótopo com um fármaco, sendo do último a tarefa de carrear o radioisótopo para o tecido que se deseja estudar. Para estudos renais, os

radiofármacos comumente utilizados são o mercaptoacetil-triglicina (MAG3-99mTc), dietileno-triamino-pentacetato (DTPA-99mTc), etilenodicisteína (EC-99mTc), dimercaptosuccinato (DMSA-99mTc)<sup>30</sup>.

Para a avaliação da função glomerular e tubular renal, utiliza-se o método de cintilografia dinâmica. Os radiofármacos habitualmente utilizados para este tipo de aquisição são o DTPA-99mTc, o MAG3-99mTc e o EC-99mTc. O DTPA-99mTc é eliminado quase que 100% por filtração glomerular, não apresentando reabsorção e/ou secreção tubular. Apesar de sua ampla disponibilidade e relativo baixo custo, as imagens com este radiofármaco são inferiores às obtidas com traçadores de secreção tubular, principalmente em situações de falência renal<sup>30</sup>. O MAG3-99mTc é excretado predominantemente por secreção tubular, e por isto, é o radiofármaco de escolha nos Estados Unidos e Europa<sup>31</sup>. O EC-99mTc foi introduzido como um novo e promissor radiotraçador para estudos da função renal. Estudo em humanos evidenciou que a excreção renal do EC-99mTc é superior à observada com MAG3-99mTc<sup>32</sup>. Estudos em camundongos foram realizados para comparar o MAG3-99mTc e o EC-99mTc, evidenciando que EC-99mTc tem uma excreção renal ligeiramente maior que o outro, entre 10 e 30 minutos, após a administração<sup>33</sup>.

A necrose tubular aguda (NTA) pode ser detectada e quantificada pela cintilografia, especialmente quando utilizados traçadores de secreção tubular. Quando expressados na superfície do lúmen tubular, estes traçadores dependem do fluxo do filtrado glomerular para que possam ser retirados dos túbulos e incorporados à urina. Dependendo do grau de lesão isquêmica, as células tubulares podem perder parcialmente sua capacidade de captar e secretar o traçador na luz tubular, com conseqüente hipocaptação difusa de radiação no rim afetado.

Conforme a evolução clínica, com a melhora da função renal, os referidos padrões tendem a ser proporcionalmente revertidos para a normalidade<sup>31</sup>.

### **3.4.2. Histopatologia**

A necrose tubular aguda isquêmica caracteriza-se por necrose epitelial tubular focal, em múltiplos pontos ao longo do nefron, com áreas não lesadas de permeio, frequentemente acompanhada de ruptura de membranas basais (tubulorrexia) e oclusão da luz tubular por cilindros. Também podem ser observados edema intersticial e acúmulo de leucócitos em vasos retos dilatados. Quando a causa da lesão é removida, a regeneração do epitélio tubular ocorre, a partir das células vizinhas, com lesões reversíveis, que retêm a capacidade de proliferação, sendo mediada por fatores de crescimento. Tal regeneração tubular é evidenciada pela presença de células epiteliais achatadas e figuras de mitose. No caso de evolução clínica favorável, a regeneração do epitélio tubular pode ser completa, a ponto de não serem evidenciados danos residuais no tecido<sup>23</sup>.

## 4 METODOLOGIA

Foram utilizados 24 ratos machos, da linhagem Wistar, com aproximadamente três meses de idade, provenientes do biotério do Centro de Ciências da Saúde - UFRN. Todos os animais foram pesados (peso de  $268 \pm 15$ g), alocados em gaiolas individuais, com água e ração (Labina® Purina) *ad libitum* e aclimatados no laboratório, durante oito dias, antes do início dos experimentos. Foram mantidos sob controle de temperatura ( $24^\circ$ ), umidade do ar (60 – 70%), iluminação (12/12 horas), ciclo claro/escuro, e manipulados de acordo com o Código Brasileiro de Ética para uso de Animais em Pesquisa (Lei Nº 11794/08). Após período de jejum de doze horas, os animais foram escolhidos ao acaso e divididos, por sorteio, em dois grupos de doze animais. O Grupo Sildenafil (GS) recebeu 1mg/kg de suspensão de sildenafil, preparada na Faculdade de Farmácia - UFRN, 60 minutos antes da isquemia, através de gavagem. O Grupo Controle (GC), recebeu igual volume de solução salina, pela mesma via (Figura 1).



Figura 1 - Administração de sildenafil, por gavagem

Todos os animais foram anestesiados com Tiopental (20mg/kg intraperitoneal) e Cetamina (20mg/Kg intramuscular). Após tricotomia, procedeu-se antissepsia da pele com álcool a 70% e todo procedimento foi realizado sob condições estéreis. Em todos os ratos, injetou-se 0,1ml de EC-99mTc, com atividade de 0,5mCi, na veia jugular, dissecada previamente, com uso de microscópio cirúrgico (Figura 2). O radiofármaco foi preparado no laboratório de radiobiologia da Liga Norterio-grandense Contra o Câncer (LIGA), transportado acondicionado em recipientes próprios de radioproteção. Os pesquisadores usaram equipamento individual de proteção radiológica durante todos os procedimentos cirúrgicos e de laboratório.



Figura 2 - Injeção de 0,1ml de EC-99mTc, na veia jugular.

Após 15 minutos, os animais foram submetidos à realização de cintilografia renal (exame inicial), com uso do *Kodak in vivo-FX Image System* (Kodak – USA), com exposição de 7 minutos, adquirindo-se imagem dos dois rins (Figura 3). Todos os animais foram posicionados em decúbito dorsal, na câmara de avaliação do equipamento, sendo critérios cintilográficos de inclusão no protocolo a presença dos dois rins, obrigatoriamente tópicos, com morfologia habitual e simétrica.



Figura 3 - Animal posicionado no *Kodak in vivo-FX Image System*, para realização da cintilografia renal.

Imediatamente após a realização da cintilografia, os animais foram transferidos para a sala de cirurgia e submetidos à laparotomia mediana, de aproximadamente cinco centímetros. O rim esquerdo foi exposto e a artéria renal esquerda foi isolada (Figura 4) e ocluída com um clampe atraumático, durante 60 minutos (Figura 5). O rim direito, assim como seu hilo vascular, não foi manipulado.



Figura 4 - Alças rebatidas à direita, com gaze, permitindo visualização do rim esquerdo e acesso ao hilo renal, com o isolamento da artéria renal.



Figura 5 - Clampeamento da artéria renal esquerda, com microclampe metálico, provocando isquemia renal.

Durante o período de isquemia renal, a parede abdominal foi aproximada em um plano único de sutura para evitar desidratação do animal, causada pela exposição do peritônio e vísceras abdominais, e os animais foram hidratados com 5

ml de solução salina a 0,9% injetados na cavidade peritoneal (Figura 6). Após os 60 minutos de isquemia, a parede abdominal foi reaberta e o clampe arterial foi removido. Observou-se reperfusão do órgão e a parede abdominal foi fechada por planos com fio de nylon 4-0 e os animais transferidos para as gaiolas individuais.



Figura 6 - Parede abdominal aproximada em plano único de sutura com fio de nylon 4-0, para evitar desidratação do animal, durante período de isquemia renal (1 hora).

Seis animais de cada grupo foram avaliados, após 24 horas do processo de isquemia e reperfusão. A outra metade, após 7 dias. O procedimento consistiu de nova anestesia, com dissecção da veia jugular e injeção de 0,1ml de EC-99mTc. Após 15 minutos, os animais foram submetidos à realização de nova cintilografia renal, com uso do *Kodak in vivo-FX Image System*, com exposição de 7 minutos, e em seguida eutanasiados, com dose letal de anestésico (Tiopental 100mg/kg intracardíaco). Os rins foram retirados, imediatamente conservados em formol tamponado a 10%, e depois incluídos em parafina. As lâminas foram preparadas com cortes de 5 $\mu$  e coradas com hematoxilina e eosina para exame histopatológico.

As imagens cintilográficas foram avaliadas comparando-se a função diferencial renal, nas cintilografias inicial e secundária (com um ou com sete dias, após a isquemia), nos diferentes grupos. O rim direito, em todos os grupos, foi o controle de cada animal, sendo que necessariamente deveria apresentar padrão cintilográfico normal no exame inicial. A análise quantitativa das imagens foi realizada usando-se o *Kodak molecular imaging software v.4.0.5.*, gerando automaticamente regiões de interesse (ROIs) dos rins direito e esquerdo. A soma da intensidade das imagens em *pixels* definiu a função diferencial de cada rim. Os desenhos dos ROIS foram realizados pelo mesmo examinador, com a finalidade de não incluir variável de erro inter-observador.

As avaliações histopatológicas foram realizadas com microscopia ótica, para análise quantitativa do padrão histológico das alterações teciduais pós-isquemia, e foram graduadas através de escores, conforme mostrado na tabela 1. A pontuação por escore foi aplicada para alterações microscópicas compatíveis com NTA: dilatação da luz tubular (DLT), vacuolização celular (VC), cilindros intratubulares (CI) e necrose celular (NC)<sup>34</sup>.

TABELA 1 – Escores usados para avaliação histopatológica

ESCORE	PADRÃO HISTOPATOLÓGICO
0	Normal
0,5	Pequenas áreas focais lesadas
1	< 10% da área cortical lesada
2	10 a 25% da área cortical lesada
3	25 a 75% da área cortical lesada
4	> 75% de lesão

Cada rim teve suas correspondentes pontuações determinadas em duplicata pelo mesmo observador, que não teve conhecimento a que grupos pertenciam as

lâminas. Como critério histopatológico de inclusão dos animais, no protocolo, foi definido que todos os parâmetros histológicos deveriam ser obrigatoriamente normais no rim direito (rim controle) de todos os animais, em todos os grupos. O experimento foi completamente aleatorizado, com avaliação estatística através dos testes t de Student e de Mann-Whitmann. O nível de significância estabelecido para os testes foi de 5% (CI 95%), ou seja,  $p\text{-valor} < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

Os procedimentos cintilográficos e cirúrgicos foram realizados no Núcleo de Cirurgia Experimental - UFRN. As lâminas para análise histopatológica foram preparadas e avaliadas no laboratório do Departamento de Patologia da UFRN. O EC-99mTc foi cedido pela LIGA.

## 5 RESULTADOS

### 5.1. Resultados cintilográficos

Nos exames cintilográficos, foram obtidas imagens de boa qualidade, com o uso do *Kodak Molecular Imaging Software*. Não foram observadas alterações cintilográficas nos exames inicial, com 24 horas e com sete dias no rim direito.

Nos rins esquerdos dos ratos do grupo controle, observou-se nas imagens das cintilografias realizadas, após sete dias da isquemia, uma redução significativa na emissão de radiação pelo rim esquerdo (déficit funcional), com padrão cintilográfico de compatível com necrose tubular aguda (figura 7), comparada com o exame de cintilografia inicial (figura 8). A diferença foi significativa ( $p=0,01$ ).

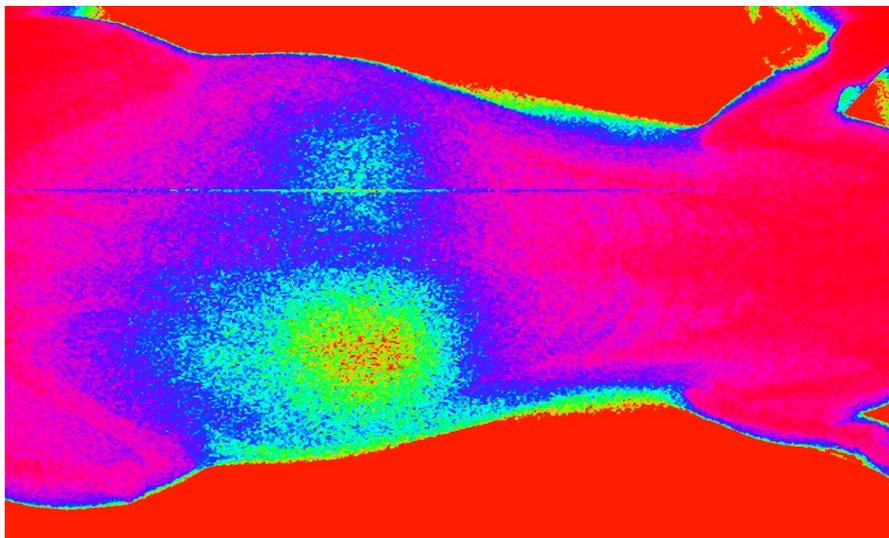


Figura 7 - Imagem cintilográfica, após sete dias do processo da isquemia-reperusão, em animal do grupo controle, demonstrando uma redução da emissão de radiação no rim esquerdo (déficit funcional), quando comparado com o rim direito (imagem inferior).

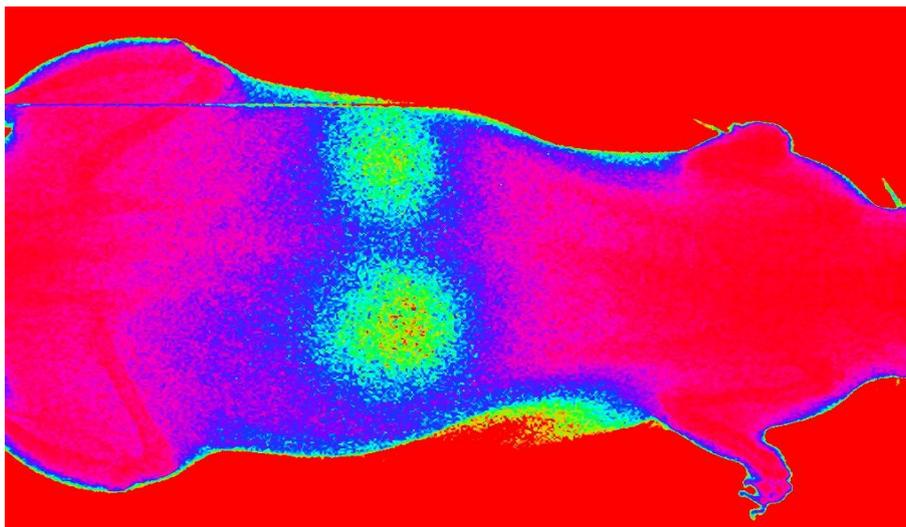


Figura 8 - Imagem cintilográfica inicial, capturada antes do processo da isquemia-reperfusão, em animal do grupo controle, demonstrando não haver diferença na emissão de radiação comparando-se o rim esquerdo (superior), com o rim direito (inferior)

No grupo sildenafil, nenhuma mudança significativa na função renal foi observada, após a isquemia e reperfusão. A tabela 2 mostra que não houve diferença significativa entre os valores de função renal diferencial do rim esquerdo, comparando os dados antes da isquemia e após 24 horas ( $p=0,787$ ) e após sete dias ( $p=0,343$ ).

Na tabela 2, são resumidos os resultados da análise da função diferencial do rim esquerdo, comparando a cintilografia inicial com a cintilografia após a isquemia.

Tabela 2 – Dados descritivos e respectivo teste estatístico da função do rim esquerdo (isquemiado), definidos pela cintilografia, utilizando-se o *Kodak Molecular Imaging Software*.

Rim esquerdo	Função Renal (%)		p-valor(1)
	Inicial	Pós-isquemia	
Controle 1 dia	48,0 ± 2,00	47,0 ± 5,00	0,761
Controle 7 dias	49,0 ± 2,00	46,0 ± 3,00	0,010
Sildenafil 1 dia	50,0 ± 2,00	49,0 ± 2,00	0,787
Sildenafil 7 dias	49,0 ± 1,30	47,0 ± 3,00	0,343

Média ± Desvio Padrão; (1) P-valor da análise pelo teste t de Student para amostras dependentes.

## 5.2. Resultados histopatológicos

A isquemia e reperfusão causaram marcantes alterações na histologia dos rins esquerdos, comparada com a dos rins direitos, que não sofreram isquemia. Nas lâminas dos rins esquerdos, coletados nos animais do grupo controle, após 24 horas pós-isquemia, observamos significativamente mais necrose celular, quando comparados com o grupo tratado com o sildenafil ( $p < 0,05$ ). Com relação à vacuolização celular e cilindros intratubulares, nenhuma diferença significativa foi observada entre os dois grupos. Dilatação da luz tubular foi significativamente mais freqüente nos animais do grupo sildenafil, quando comparados com os controles. Esses dados são sumarizados na tabela 3.

Tabela 3 – Dados descritos e respectivo teste estatístico das alterações histopatológicas no rim esquerdo, comparativos entre o grupo controle e o sildenafil, com 24h de observação.

Parâmetro histopatológico	Rim esquerdo		P-valor
	Controle	Sildenafil	
DLT	0,75 ± 1,04	2,20 ± 0,84	0,0295
VC	2,31 ± 1,39	1,80 ± 0,45	0,2844
CI	1,88 ± 1,36	2,20 ± 0,84	0,7242
NC	1,31 ± 1,41	0,20 ± 0,27	0,0451

Média ± Desvio Padrão

\* P-valor do Teste de Mann-Whitney, nível de significância de 5%

DLT – Dilatação da Luz Tubular; VC – Vacuolização Celular; CI – Cilindros Intra-tubulares; NC – Necrose Celular.

Na figura 9 (animal do grupo controle), percebe-se presença de necrose celular intensa, diferente do achado histopatológico no rim de animal tratado com sildenafil (figura 10).

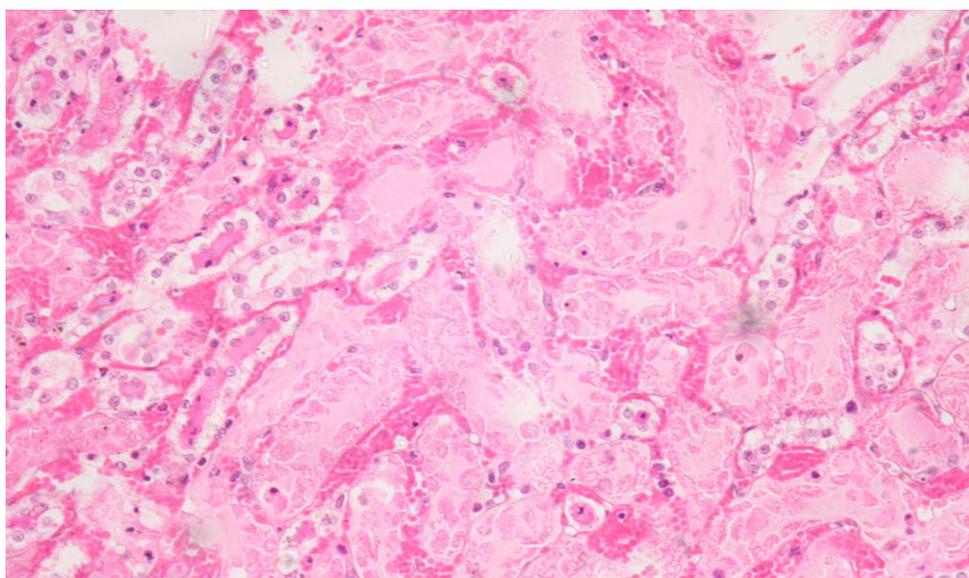


Figura 9 – Fotomicrografia de lâmina de rim esquerdo, de animal do grupo controle, (24 h após processo de isquemia-reperfusão), mostrando necrose celular. Coloração hematoxilina-eosina, aumento 200x.

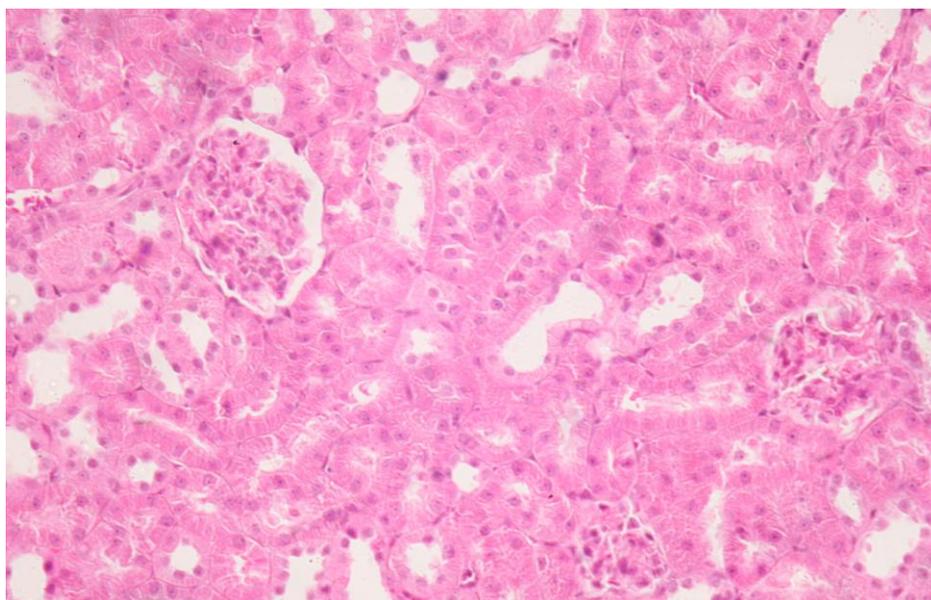


Figura 10 – Fotomicrografia de lâmina de rim esquerdo, de animal do grupo sildenafil (24 h após processo de isquemia-reperfusão), mostrando discretos sinais de necrose celular e dilatação da luz tubular. Coloração hematoxilina-eosina, aumento 200x.

Após sete dias do evento isquêmico, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas alterações histopatológicas entre os dois grupos, conforme se observa na tabela 4.

Tabela 4 – Dados descritos e respectivo teste estatístico para alterações histopatológicas no rim esquerdo, comparando o grupo controle com o sildenafil, após sete dias de observação.

Parâmetro histopatológico	Rim esquerdo		P-valor
	Controle	Sildenafil	
DLT	0,95 ± 0,69	1,86 ± 0,90	0,0553
VC	1,15 ± 0,78	1,43 ± 0,53	0,2295
CI	0,30 ± 0,35	0,71 ± 0,57	0,1088
NC	0,05 ± 0,16	0,00 ± 0,00	0,7396

Média ± Desvio Padrão; \* P-valor do Teste de Mann-Whitney, nível de significância de 5%

DLT – Dilatação da Luz Tubular; VC – Vacuolização Celular; CI – Cilindros Intra-tubulares; NC – Necrose Celular.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1. Linha de pesquisa

A escolha do tema deste estudo foi motivada pela importância do processo de isquemia e reperfusão na prática médica da urologia contemporânea, principalmente, nos procedimentos cirúrgicos de nefrectomia parcial e de transplante renal. Inclusive, há um interesse especial no tema, pois desde 1998 participamos do programa de transplante renal do Hospital Universitário Onofre Lopes. Ao se iniciar a discussão do tema do estudo, o Professor Sílvio Tucci Junior, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, juntamente com seu aluno de doutorado, Whemberton M. Araújo, tinham publicado um artigo em que avaliaram o efeito da clorpromazina em rins de ratos submetidos ao processo de isquemia e reperfusão, através da cintilografia com uso de MAG3-99mTc. Neste mesmo ano, em um congresso médico no exterior (Congresso da Associação Americana de Urologia) foi apresentado um trabalho do grupo da Espanha<sup>12</sup> estudando o efeito de sildenafil, em rins de porcos, sob isquemia e reperfusão, com resultados satisfatórios e com efeitos hemodinâmicos protetores.

Devido ao fato do professor Aldo Medeiros ter uma linha de pesquisa experimental em pequenos animais (ratos), na área de biodistribuição de radiofármacos, tivemos a idéia de avaliar a ação protetora do sildenafil contra os efeitos deletérios do processo isquemia-reperfusão, em rins de ratos, utilizando a cintilografia e exame anatomopatológico. O projeto foi aprovado pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, coincidindo com a chegada de um aparelho comprado para o Núcleo de Cirurgia Experimental, equipado com um módulo para realizar cintilografia em pequenos animais, o *Kodak in vivo-FX image system*. Na

época, o MAG3-99mTc não estava disponível no mercado brasileiro e com o apoio do Dr. Arthur Villarim Neto, decidiu-se pela utilização do 99mTc-EC, que foi fornecido pelo Serviço de Medicina Nuclear da LIGA.

Realizou-se um estudo piloto, no ano de 2008, no qual foi possível padronizar a técnica operatória. Inicialmente, ocorreram perdas de alguns animais, provavelmente relacionados à anestesia, pois era necessário aproximadamente duas horas para concluir todo o experimento, em cada animal. O projeto de pesquisa em questão motivou a apresentação de um pôster e dois temas livres em congressos nacionais e internacionais e resultou em artigo que foi aceito para publicação no periódico *Acta Cirúrgica Brasileira*, Qualis 2B-CAPES (Anexo no final desta tese).

## 6.2. Metodologia

A metodologia utilizada no presente trabalho foi baseada no modelo experimental realizado por Araújo *et al.* (2002)<sup>35</sup>, que estudaram a ação da clorpromazina na isquemia renal normotérmica em ratos, analisada através de cintilografia e histopatologia. Tanto no trabalho de Araújo *et al.*<sup>35</sup>, quanto neste experimento, o rim direito foi preservado em todos os animais, de modo que qualquer outra alteração hemodinâmica que o animal sofresse também seria evidenciada neste rim. Portanto, somente os animais com padrão histológico preservado no rim direito permaneceram no protocolo. Adicionalmente, a recuperação da função renal (pós-isquemia) tende a ser mais rápida e melhor

quando o rim contralateral é retirado previamente, provavelmente devido ao aumento da volemia e, conseqüentemente, incremento da pressão arterial justaglomerular, com tendência de aumento da taxa de filtração glomerular (TFG). Portanto, a manutenção do rim contralateral tende a isolar a proteção farmacológica da droga estudada, como variável de recuperação da função renal<sup>36</sup>.

A decisão de administrar o sildenafil, uma hora antes de iniciar a intervenção, foi baseada em modelos experimentais, através dos quais se sabe que, após a administração do inibidor da PDE5, o nível sanguíneo máximo da droga é alcançado em torno de uma hora<sup>24</sup>. A dose utilizada (1 mg/kg) foi a mesma usada em trabalhos anteriores na mesma linha de pesquisa<sup>12</sup>.

O modelo experimental utilizado correspondeu às expectativas, pois conseguimos demonstrar diferenças entre os grupos controle e experimental, com os métodos de avaliação escolhidos. Entretanto, é importante apreciar possíveis limitações técnicas da metodologia deste estudo. Primeiramente, no tocante ao método de avaliação da função renal. Como não foi realizada a nefrectomia direita, não poderíamos avaliar a função com dosagens de uréia e creatinina. Dentre os métodos para avaliar a função renal diferencial, a cintilografia renal é o método de escolha e o <sup>99m</sup>Tc-MAG3 é considerado o mais promissor radiotraçador para esse uso<sup>33</sup>. Neste trabalho, utilizou-se como radiofármaco o <sup>99m</sup>Tc-EC, porque tivemos dificuldade na aquisição do <sup>99m</sup>Tc-MAG3. Seu efeito é comparável ao <sup>99m</sup>Tc-MAG3, sendo facilmente disponível no mercado brasileiro e tem sido empregado para uso clínico e experimental<sup>32</sup>.

Quanto ao método de aquisição de imagens e medição da radiatividade emitida pelos rins, no trabalho de Araújo *et al.*<sup>35</sup>, foi utilizada câmara de cintilação Orbiter (Siemens, Alemanha). Neste experimento, foi utilizado o equipamento *Kodak*

*Image Station In Vivo FX*, que emprega outra tecnologia, baseada no sistema *Radioisotope Phosphor Screen*. Este converte partículas beta de alta energia em luz (fótons), que são coletadas pela lente do equipamento, e transformadas em imagens, medidas em *pixels*. O trabalho poderia ter sido enriquecido pela aferição da concentração plasmática do sildenafil em cada animal, uma vez que, no rato, a biodisponibilidade, após o uso oral do sildenafil, é de 23%, quando comparado com a mesma dose administrada por via intravenosa<sup>24</sup>.

### **6.3. Resultados**

Vários estudos têm sido realizados, na tentativa de encontrar fármacos ou criar estratégias para diminuir os efeitos deletérios da lesão por isquemia-reperfusão renal.

Nos últimos anos, surgiram evidências de que o NO tem importante papel na fisiopatologia desses eventos. Jeong *et al.* (2004)<sup>37</sup> demonstraram que a isquemia renal normotérmica leva a um aumento na resistência vascular, provavelmente causado pela perda na capacidade do endotélio vascular de produzir e liberar NO, ou por um desequilíbrio entre a produção de NO e de endotelina-1, que é essencial para a função vascular na regulação da perfusão dos órgãos.

Trabalhos experimentais com uso de NO e monóxido de carbono demonstraram efeito protetor contra a lesão de isquemia-reperfusão<sup>37,38</sup>. A administração de doador de NO ou monóxido de carbono, na forma de moléculas liberadoras de monóxido de carbono (CORM), aumenta o fluxo plasmático renal pela ativação de guanilato ciclase, com produção de GMPc, no músculo liso vascular, causando vasodilatação. Hosgoodl *et al.* (2008)<sup>38</sup> fizeram um estudo

experimental para analisar o uso do nitroprussiato de sódio (doador de NO) e da CORM, em rins isolados de porcos, submetidos à isquemia quente e reperfusão. Obtiveram como resultado um maior fluxo sanguíneo renal e menor resistência vascular renal com o uso de CORM e do nitroprussiato de sódio.

Öztürk *et al.* (2001)<sup>39</sup> estudaram a molsidomina no processo da lesão isquemia-reperfusão. A molsidomina é uma pró-droga, um potente vasodilatador, largamente usada como antianginoso, relaxando o músculo liso pela estimulação da guanilato ciclase aumentando os níveis de GMPc. O objetivo do trabalho foi verificar o efeito protetor da molsidomina na função renal e na histomorfometria durante a primeira semana, após isquemia-reperfusão. No referido estudo, os autores usaram ratos com modelo de nefrectomia direita e oclusão da artéria renal esquerda por uma hora. Todos os ratos tiveram dosagem de uréia e creatinina diariamente e foram sacrificados no sétimo dia para análise histológica renal. Os ratos do grupo molsidomina apresentaram uma melhor recuperação dos níveis de uréia e creatinina, uma melhor sobrevivência e menor grau de lesão renal quando comparados com os grupos controle<sup>39</sup>.

Recentemente, há um considerável interesse na investigação do papel do sildenafil na proteção contra a lesão por isquemia-reperfusão em modelos animais. Foi demonstrado que o sildenafil induz a um excelente efeito protetor miocárdico. É possível que a ação vasodilatadora de sildenafil pudesse liberar mediadores endógenos preconditionadores, como a adenosina ou a bradicinina das células endoteliais, que desencadeia um efeito cascata, resultando na fosforilação da óxido nítrico sintetase e na liberação de NO<sup>39</sup>. Estes conhecimentos abrem um campo de pesquisa para o uso dos inibidores das fosfodiesterases na lesão orgânica causada pela isquemia-reperfusão.

O único estudo experimental com o uso do sildenafil como protetor contra a isquemia renal foi realizado por Lledo Garcia *et al.* (2007)<sup>12</sup>. Eles utilizaram porcos e realizaram nefrectomia esquerda e autotransplante do rim direito, após 45 minutos de isquemia quente. O grupo controle não recebeu nenhum tratamento e o grupo experimental foi tratado com sildenafil 100mg, 2 horas antes de realizar a isquemia renal. Os rins foram perfundidos com solução preservadora, em uma máquina pulsátil de perfusão por 1 hora e então autotransplantados nos porcos. Após o desclameamento dos vasos, foram determinados parâmetros hemodinâmicos e dosagens do NO e de seus metabólitos. Obtiveram como resultados um melhor padrão hemodinâmico (maior fluxo sanguíneo e menor resistência vascular renal) e uma maior concentração de NO, no grupo tratado com sildenafil. A análise histológica mostrou diferenças mínimas entre os dois grupos, o que pode ser atribuído ao efeito benéfico da máquina de perfusão hipotérmica<sup>12</sup>.

Quanto aos resultados obtidos neste estudo, encontrou-se evidência de proteção contra a lesão induzida por isquemia-reperfusão com o uso do sildenafil. Encontramos algumas divergências no que tange às avaliações realizadas com 24 horas e com sete dias após o processo de isquemia, de acordo com o método de avaliação utilizado. A avaliação por cintilografia, realizada após 24 horas da isquemia, não mostrou diferenças significativas entre os dois grupos. Tal diferença só foi observada nos exames de cintilografia realizados após sete dias da isquemia. Provavelmente, isto se deva à radioatividade residual do tecnécio que foi utilizado no exame cintilográfico inicial, causando contaminação por radiatividade no exame com 24 horas. Na avaliação histopatológica, verificou-se maior grau de necrose celular, com significância estatística somente nos exames realizados nos animais sacrificados após 24 horas. Nos exames dos animais sacrificados após sete dias do

evento isquêmico, não observamos diferenças estatísticas entre os grupos, provavelmente, por que já estava ocorrendo recuperação das alterações celulares nos rins desses animais. Ou seja, por um método (histopatologia) o benefício do uso do sildenafil foi observado na avaliação de 24 horas e com o outro método (cintilografia), na avaliação realizada no sétimo dia.

Um dado relevante foi o achado de maior dilatação tubular nos rins de animais do grupo tratado com sildenafil. Apesar da dilatação da luz tubular caracterizar um aspecto histopatológico de lesão tubular, também pode ser explicada pelo efeito vasodilatador e natriurético do sildenafil<sup>40</sup>. Ademais, na maioria dos modelos usados para avaliar as alterações morfológicas causadas pela isquemia-reperfusão renal, a gravidade da necrose celular foi o parâmetro que mais se relacionou com a duração da isquemia<sup>4,41</sup>.

É importante ressaltar a originalidade da linha de pesquisa e o ineditismo deste estudo. Como vimos, a pesquisa na área de isquemia e reperfusão renal é muito intensa, com a utilização de diversos modelos experimentais e métodos de avaliação. O modelo mais utilizado é aquele em que se realiza uma isquemia no rim esquerdo, concomitante com a nefrectomia direita, utilizando as dosagens de uréia e creatinina como métodos de avaliação funcional. Somente um estudo foi realizado com a avaliação cintilográfica<sup>35</sup>, utilizando a gama câmara e o MAG3-99mTc.

Optamos pela utilização de um modelo com a manutenção dos dois rins, com a utilização da *Kodak in vivo-FX image system* para realizar cintilografia em pequenos animais, com o uso do EC-99mTc e da histopatologia. Decidimos pela utilização do sildenafil, como fármaco condicionante. Naquele momento, só existia um estudo na literatura utilizando o sildenafil na isquemia em rins de porcos<sup>12</sup>. Portanto, este foi o primeiro estudo que utilizou sildenafil em ratos, após

isquemia renal no rim esquerdo, com preservação do rim direito, avaliada por cintilografia com EC-99mTc e com a utilização da *Kodak in vivo-FX image system*.

A realização deste estudo contribuiu para iniciar uma linha de pesquisa na utilização de inibidores de fosfodiesterase e radiofármacos em processos de isquemia e reperfusão. Já está em andamento um estudo experimental com a utilização do sildenafil na isquemia hepática, no Núcleo de Cirurgia Experimental Clóvis Sarinho. Novos estudos, com utilização de doses diferentes de sildenafil, avaliações da isquemia em momentos diversos, uso de outros inibidores de fosfodiesterase deverão ser iniciados. Na minha área de atuação, principalmente no âmbito do transplante renal e das nefrectomias parciais, o estudo da atenuação dos processos de isquemia e reperfusão são estimulantes e poderão contribuir para um resultado pós-operatório, com melhor funcionalidade orgânica e menor morbidade.

## **7 CONCLUSÃO**

Os resultados permitem concluir que o pré-tratamento experimental com sildenafil resultou em efeito protetor da função e do dano celular tubular renal em modelo de isquemia-reperfusão, avaliados por cintilografia e histopatologia. Futuras investigações serão necessárias para estabelecer a viabilidade e eficácia do uso clínico do sildenafil nesse campo.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Foley DP, Chari RS. Ischemia-reperfusion injury in transplantation: novel mechanisms and protective strategies. *Transplant Rev.* 2007; 21: 43– 53.
2. Desai MM, Gill IS, Ramani AP, Spaliviero M, Rybichi L, Kaouk JH. The impact of warm ischemia on renal function after laparoscopic partial nephrectomy. *BJU Int.* 2005; 95: 377 – 83.
3. Riggs SB, LaRochelle JC, Belldegrun AS. Partial nephrectomy: A contemporary review regarding outcomes and different techniques. *Cancer J.* 2008; 14, 302-7.
4. Jablonski P, Howden BO, Rae DA, Birrell CS, Marshall VC, Tange J. An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia. *Transplantation.* 1983; 35:198-20.
5. Humphreys MR, Castle EP, Lohse CM, Sebo TJ, Leslie KO, Andrews PE. Renal ischemia time in laparoscopic surgery: an experimental study in a porcine model. *Int J Urol.* 2009; 16, 105–9.
6. Baldwin DD, Maynes LJ, Berger KA, Desai PJ, Zuppan CW, Zimmerman GJ, Winkielman AM, Sterling TH, Tsai CK, Ruckle HC. Laparoscopic warm renal ischemia in the solitary porcine kidney model. *Urology.* 2004; 64: 592–7.

7. Orvieto MA, Tolhurst SR, Chuang MS, Lyon MB, Ritch CR, Rapp DE, Shalhav AL. Defining maximal renal tolerance to warm ischemia in porcine laparoscopic and open surgery model. *Urology*. 2005; 66: 1111–15.
8. Simmons MN, Schreiber MJ, Gill IS. Surgical Renal Ischemia: A Contemporary Overview. *J Urol*. 2008; 180: 19-30.
9. Porpiglia F, Renard J, Billia M, Musso F, Volpe A, Burruni R, Terrone C, Colla L, Piccoli G, Podio V, Scarpa RM. Is renal warm ischemia over 30 minutes during laparoscopic partial nephrectomy possible? One-year results of a prospective study. *Eur Urol*. 2007; 52:1170-8.
10. Boolell M, Allen MJ, Ballard SA, Gepi-Attee S, Muirhead GJ, Naylor AM, Osterloh IH, Gingell C. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *Int J Impot Res*. 1996; 8: 47-52.
11. Kukreja RC, Salloum F, Das A, Ockaili R, Yin C, Bremer YA, Fisher PW, Wittkamp M, Hawkins J, Chou E, Kukreja AK, Wang X, Marwaha VR, Xi L. Pharmacological preconditioning with sildenafil: basic mechanisms and clinical implications. *Vasc Pharmacol*. 2005; 42: 219-32.
12. Lledo-Garcia E, Rodriguez-Martinez D, Cabello-Benavente R, Moncada-Iribarren I, Tejedor-Jorge A, Dulin E, Hernandez-Fernandez C, Del Canizo-Lopez JF. Sildenafil improves immediate posttransplant parameters in warm-

- ischemic kidney transplants. *Experimental Study. Transplant Proc.* 2007; 39: 1354–6.
13. Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, Choi AM. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2007; 9: 49-89.
14. Zweier JL, Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2006; 70:181-90.
15. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2002; 53: 31-47.
16. Riedemann NC, Ward PA. Complement in ischemia reperfusion injury. *Am J Pathol.* 2003; 162: 363-7.
17. Derweesh IH, Novick AC. Mechanisms of renal ischaemic injury and their clinical impact. *BJU Int.* 2005; 95: 948 – 50.
18. Newaz MA, Oyekan AO. Vascular responses to endothelin-1, angiotensin-II, and U46619 in glycerol-induced acute renal failure. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001; 38 : 569–77.

19. Kourembanas S, McQuillan LP, Leung GK. Nitric oxide regulates the expression of vasoconstrictors and growth factors by vascular endothelium under both normoxia and hypoxia. *J Clin Invest.* 1993; 92 : 99–104.
20. Kelly KJ, Plotkin Z, Dagher PC. Guanosine supplementation reduces apoptosis and protects renal function in the setting of ischemic injury. *J Clin Invest.* 2001; 108: 1291-8.
21. Schumer M, Colombel MC, Sawczuk IS, Gobé G, Connor J, O'Toole KM, Olsson CA, Wise GJ, Buttyan R. Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am J Pathol.* 1992; 140: 831-8.
22. Guan Z, Miller SB, Greenwald JE. Zaprinast accelerates recovery from established acute renal failure in the rat. *Kidney Int.* 1995; 45: 1569-75.
23. Alpers CE. The Kidney. In: Kumar V. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition. 8th ed. New York, Saunders, 2009.
24. Walker DK, Ackland MJ, James GC, Muirhead GJ, Rance DJ, Wastall P, Wright PA. Pharmacokinetics and metabolism of sildenafil in mouse, rat, rabbit, dog and man. *Xenobiotica.* 1999; 29: 297-310.
25. Beavo JA. Nucleotide Phosphodiesterases: Functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev.* 1995; 75: 725-43.

26. Shin HS, Bae SK, Lee MG. Pharmacokinetics of sildenafil after intravenous and oral administration in rats: Hepatic and intestinal first-pass effects. *Int J Pharm.* 2006; 320: 64–70.
27. Gupta M, Kovar A, Meibohm B. The clinical pharmacokinetics of phosphodiesterase-5 inhibitors for erectile dysfunction. *J Clin Pharmacol.* 2005; 45: 987-1003.
28. Bremer YA, Salloum F, Ockaili R, Chou E, Moskowitz WB, Kukreja RC. Sildenafil citrate (viagra) induces cardioprotective effects after ischemia/reperfusion injury in infant rabbits. *Pediatr Res.* 2005; 57:22-7.
29. Zhao L, Mason NA, Morrell NW, Kojonazarov B, Sadykov A, Maripov A, Mirrakhimov MM, Aldashev A, Wilkins MR. Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation.* 2001 24;104: 424-8.
30. Müller-Suur R, Müller-Suur C. Glomerular filtration and tubular secretion of MAG3 in the rat kidney. *J Nucl Med.* 1989; 30:1986-91.
31. Taylor A. Radionuclide Renography: A Personal Approach. *Semin Nucl Med.* 1999; 29: 102-27.
32. Verbruggen AM, Nosco DL, Van Nerom CG, Bormans GM, Adnaens PJ, De Roo MJ. Technetium-99m-L, L-ethylenedicysteine: a renal imaging agent. I. Labeling and evaluation in animals. *J Nucl Med.* 1992; 33: 551-7.

33. Mooran JK. Technetium-99m-EC and other potential new agents in renal nuclear medicine. *Semin Nucl Med.* 1999; 29: 91-101.
34. Shih W, Hines WH, Neilson EG. Effects of cyclosporin A on the development of immune-mediated interstitial nephritis. *Kidney Int.* 1988; 33: 1113-8.
35. Araujo WM, Tucci Jr S, Costa, RS, Ferreira RA, Pozza ML, Mazzetto AS, Alves P, Cologna AJ, Martins ACP. Animal model of renal ischemic injury, and chlorpromazine protector effect, evaluated by Tc99m-MAG3 dynamic renal scan. *Acta Cir Bras.* 2002; 17: 15-9.
36. Finn WF. Enhanced recovery from post ischemic acute renal failure. Micropuncture studies in the rat. *Circ. Res.* 1980; 46: 440-8.
37. Jeong GY, Chung KY, Lee WJ, Kim YS, Sung SH. The effect of a nitric oxide donor on endogenous endothelin-1 expression in renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc.* 2004; 36:1943-5.
38. Hosgood SA, Bagul A, Kaushik M, Rimoldi J, Gadepalli RS, Nicholson ML. Application of nitric oxide and carbon monoxide in a model of renal preservation. *Br J Surg.* 2008; 95: 1060–7.
39. Öztürk H, Aldemir M, Büyükbayram H, Dokucu A, Otçu S. The effects of the nitric oxide donor molsidomine prevent in warm ischemia-reperfusion injury of

the rat renal – A functional and histopathological study. *Int Urol Nephrol.* 2001; 32: 601–7.

40. Dousa TP. Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney Int.* 1999; 55: 29-62.

41. Tirapelli LF, Barione DF, Trazzi BF, Tirapelli DP, Novas PC, Silva CS, Martinez M, Costa RS, Tucci S Jr, Suaid HJ, Cologna AJ, Martins AC. Comparison of two models for evaluation histopathology of experimental renal ischemia. *Transplant Proc.* 2009; 41: 4083-7.

## ANEXAÇÃO DE ARTIGO

**Artigo aceito para publicação no periódico Acta Cirúrgica Brasileira, indexada Medline e ISI – Qualis B2.**

**Effect of sildenafil in renal ischemia/reperfusion injury in rats<sup>1</sup>**  
Efeito do sildenafil na lesão renal por isquemia/reperfusão em ratos

**Paulo José de Medeiros<sup>I</sup>, Arthur Villarim Neto<sup>II</sup>, Francisco Pignataro Lima<sup>III</sup>, Ítalo Medeiros Azevedo<sup>IV</sup>, Layra Ribeiro de Sousa Leão<sup>V</sup>, Aldo Cunha Medeiros<sup>VI</sup>.**

<sup>I</sup> Fellow PhD degree, Postgraduate Program in Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Brazil.

<sup>II</sup> PhD, Associate Professor, Department of Physiology, UFRN, Natal, Brazil.

<sup>III</sup> PhD, Associate Professor, Department of Pathology, UFRN, Natal, Brazil.

<sup>IV</sup> Statistician, Department of Surgery, UFRN, Natal, Brazil.

<sup>V</sup> Graduate Student, Scientific Initiation Program, UFRN, Natal, Brazil.

<sup>VI</sup> Chairman, Full Professor, Department of Surgery, UFRN, Natal, Brazil.

### ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the effect of sildenafil, administered prior to ischemia/reperfusion (I/R), by renal scintigraphy and histopathological evaluation in rats. **Methods:** Twenty-four rats were divided randomly into two groups. They received 0.1 ml of 99mTechnetium-etilenodicticysteine intravenous, and a baseline (initial) renal scintigraphy was performed. The rats underwent 60 minutes of ischemia by left renal artery clamping. The right kidney was not manipulated. The sildenafil group (n = 12) received orally 1 mg/kg of sildenafil suspension 60 minutes before ischemia. Treatment with saline 0.9% in the control group (n = 12). Half of the rats was assessed after 24 hours and half after seven days I/R, with new renal scintigraphy to study differential function. After euthanasia, kidneys were removed and subjected to histopathological examination. For statistical evaluation, Student t and Mann-Whitney tests were used. **Results:** In the control group rats, the left kidneys had significant functional deficit, seven days after I/R, whose scintigraphic pattern was consistent with acute tubular necrosis, compared with the initial scintigraphy (p<0.05). Sildenafil treatment resulted in better differential function of the left kidneys 24h after reperfusion, compared with controls. Histopathologically, the left kidney of control rats (24 hours after I/R) showed a higher degree of cellular necrosis when compared with the sildenafil treated rats (p<0.05). **Conclusion:** Sildenafil had a protective effect in rat kidneys subjected to normothermic I/R, demonstrated by scintigraphy and histomorphometry.

**Key words:** Ischemia. Reperfusion. Kidney. Scintigraphy. Technetium Tc99m mertiatide. Rats.

---

## RESUMO

**Objetivo:** Estudar o efeito do sildenafil, administrado previamente à isquemia/reperfusão (I/R) renal, em avaliações cintilográficas e histopatológicas em ratos. **Métodos:** Vinte e quatro ratos *Wistar* foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos. Os animais receberam 0,1 ml IV de 99mTecnécio-Etilenodicitrateína, foram submetidos à cintilografia renal inicial e em seguida submetidos à isquemia no rim esquerdo, com oclusão da artéria renal, durante 60 minutos, com posterior reperfusão. O grupo sildenafil (n=12) recebeu previamente 1mg/kg de sildenafil suspensão, 60 minutos antes da isquemia. Solução salina 0,9% foi administrada no grupo controle (n=12). Metade dos animais de cada grupo foi avaliada após 24 horas e a outra metade após sete dias de reperfusão, com nova cintilografia renal. Após eutanásia, os rins foram retirados e submetidos a exame histopatológico. Na avaliação estatística foram empregados os testes t de *Student* e de Mann-Whitney. **Resultados:** Foi observado no rim esquerdo (submetido a I/R) do grupo controle déficit funcional diferencial nas imagens cintilográficas após sete dias, com padrão de necrose tubular aguda, quando comparado com a cintilografia inicial ( $p < 0,05$ ). O tratamento com sildenafil resultou em melhor função diferencial do rim esquerdo 24h após reperfusão, comparado com os controles. Na histopatologia, os rins esquerdos dos animais do grupo controle (24 horas pós-I/R), apresentaram maior grau de necrose celular quando comparados com o grupo tratado com o sildenafil ( $p < 0,05$ ). **Conclusão:** O sildenafil teve efeito protetor em rins de ratos submetidos à isquemia/reperfusão normotérmica, demonstrado por cintilografia e histopatologia. **Descritores:** Isquemia. Reperfusão. Rim. Cintilografia. Tecnécio Tc 99m mertiatida. Ratos.

---

<sup>1</sup>Research performed at the Department of Surgery, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Norte, (UFRN), Natal, Brazil.

## Introduction

The renal injury caused by the ischemia/reperfusion (I/R) occurs inevitably in surgical procedures in which the kidneys remain without blood supply for some time. This is observed during kidney transplantation, vascular surgery of aorta and renal arteries and in partial nephrectomy. In kidney transplantation, the graft dysfunction, acute rejection and chronic kidney disease correlate with the degree of ischemic injury and increases with the presence of normothermic ischemia, especially when the organs are from donors with cardiac arrest<sup>1</sup>. In the partial nephrectomy, although the goal is to preserve renal function, the I/R injury often occurs in the remaining renal parenchyma due to clamping of the renal artery, carried out in order to prevent bleeding and to allow adequate visualization of organs and tissues<sup>2,3</sup>.

Endothelial injury causes changes in the vascular responses to vasoactive substances<sup>4,5</sup>. Aiming to protect the organs against the effects of I/R, several substances have been used in experimental studies, many of them related to the performance of the nitric oxide (NO)<sup>6</sup>. In the last two decades, attention has turned to sildenafil, an inhibitor of phosphodiesterase-5, that increases the concentration of guanosine 3,5-cyclic monophosphate (cGMP), resulting in arterial vasodilation. The

use of this substance was protective against endothelial dysfunction in transplanted heart, and a hemodynamic improvement in auto-transplanted kidneys has been showed in animals preconditioned with sildenafil<sup>7,8</sup>. The aim of this study was to analyse whether previous administration of sildenafil have renoprotective effect on the episode of I/R in rats, based on renal scintigraphic and histopathological examination.

## **Methods**

Wistar rats weighing 268±15g were obtained from the Center for Health Sciences, UFRN, Brazil. The animals were housed in polypropylene cages and received standard rat chow (Labina® Purina) and water *ad libitum*. After 7 days of acclimatization at the laboratory, prior to surgery the rats were fasted overnight in separate cages. The investigational protocol was approved by the Institutional Animal Care Committee, and the research was performed in accordance with the guidelines of the Brazilian legislation for scientific use of animals (Law nº 11794/08).

### *Animals and surgery*

Twenty four rats were randomly assigned to a control group-CG (n=12), and sildenafil group-SG (n=12). Animals were fasted 12 hr before the experiment and anesthetized with intramuscular injection of ketamine (20mg/mL) and thiopental intraperitoneal (20mg/Kg). They breathed spontaneously throughout the procedures. After shaving, the abdominal skin was disinfected with 70% alcohol and all procedures were performed under sterile conditions. In all rats 0.1 mL of 99mTechnetium-Etilenodicisteine (0.5 miliCurrie) was injected into the previously dissected jugular vein. After 15 minutes, the animals underwent an initial renal scintigraphy, by using the Kodak Image Station In Vivo FX (USA). The Kodak molecular imaging software v.4.0.5 was used to process the radionuclide exposure for 7 minutes. At the end of scintigraphy, the rats were transferred to the operating room. A 5 cm midline laparotomy was performed, the left kidney was exposed, and the renal artery was isolated and occluded with a nontraumatic microaneurism clamp for 60 min. The right kidney was not manipulated. During the renal ischemia the abdominal incision was temporarily closed with 4-0 nylon running sutures. After 60 min of ischemia, the abdominal wall was opened again and the clamp was removed. The abdominal wound was sutured with nylon 4-0 and the animals were allowed to recover.

The sildenafil treated group rats (GS) were given 1 mg/Kg sildenafil suspension, orally via gavage, 60 min prior to ischemia. The control group rats (CG) were treated orally with the same volume of saline solution 0.9%. About 6 rats of each group were re-anesthetized after 24 h and 7 days of reperfusion, and a new scintigraphy was performed. After that, the rats were euthanased with an overdose of intracardiac thiopental (100mg/kg).

### *Scintigraphic examination*

The scintigraphic images were evaluated by comparing the differential function between the right and left kidney, after 24 h and 7 days of reperfusion, in all rats. Image analysis was performed using the Kodak molecular imaging software, generating automatic regions of interest (auto-ROIs) from both right and left kidneys. The sum of intensity in pixels defined the differential function in each kidney. The

designs resulting from auto-ROIs were performed by the same examiner, in order to exclude the inter-observer error.

#### *Histopathology*

The kidneys were removed and paraffin sections of kidneys fixed in 10% neutral buffered formalin were stained with hematoxylin and eosin. Histological changes were examined by light microscopy in a blinded fashion, evaluated and scored. For purposes of quantitative analysis of histological pattern, tissue changes after I/R were ranked by scores that ranged from 0 to 4, as shown in table 1.

**TABLE 1 – Scores used for histopathological evaluation**

SCORES	HISTOPATOLOGICAL PATTERN
0	Normal
0.5	Small focal areas injured
1	< 10% of cortical zone injured
2	10 to 25% of cortical zone injured
3	25 to 75% of cortical zone injured
4	> 75% injured

The scores were applied to microscopic changes consistent with tubular necrosis: dilation of tubular lumen, tubular cell vacuolization, intratubular cylinders, tubular cell necrosis and interstitial fibrosis. Each kidney had its corresponding scores determined by two observers.

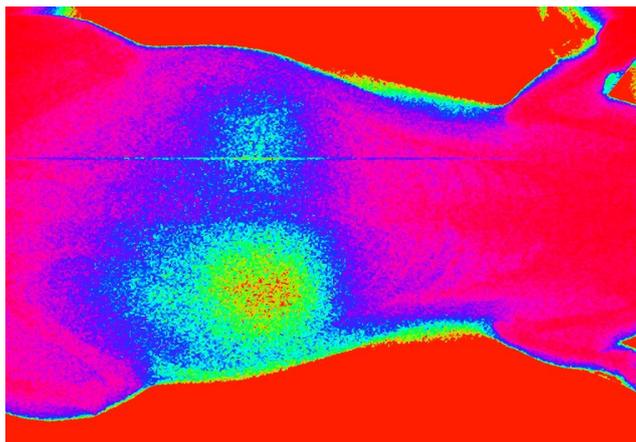
#### *Statistics*

The experiment was completely randomized, with statistical analysis done by Student t test for the scintigraphic data and the Mann-Whitney test for histological data. The level of significance for the tests was 5% (CI 95%), and  $p < 0.05$  was considered significant.

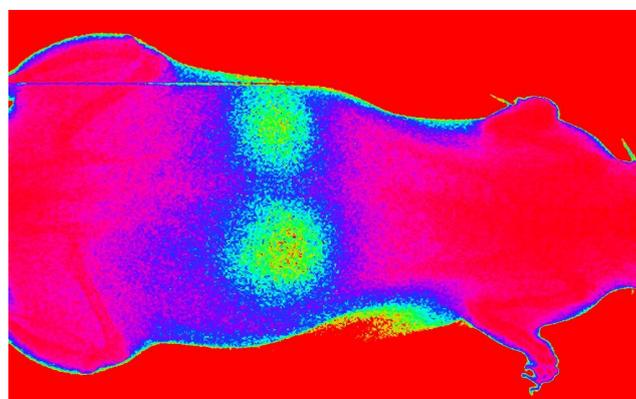
## **Results**

#### *Scintigraphic results*

In the right kidney we did not observe changes in scintigraphic images obtained before I/R, after 24 hours and after seven days of I/R. However, observing the left kidneys of the control group rats, the images of seven days after I/R detected a functional deficit whose scintigraphic pattern is consistent with acute tubular necrosis (Figure 1), compared to their baseline (initial) scintigraphic study (Figure 2). The difference was significant ( $p = 0.01$ ). The data from scintigraphic images are expressed by pixels of differential function, as shown in Table 2.



**FIGURE 1-** Scintigraphic image after seven days of I / R, from control group rat (without the use of sildenafil), showing a large reduction of the radiotracer uptake in the left kidney (functional deficit), when compared with the right kidney (below) .



**FIGURE 2-** Baseline (initial) scintigraphic image, captured before I/R, from control group rat. No difference in the radiotracer uptake was observed comparing the and left kidney (upper) and right (below).

In the experimental SG group, it was found that the use of sildenafil resulted in a protecting effect, and no change in renal function was observed after I/R. Table 2 shows that no significant difference between the values of differential function of the left kidney was detected, comparing data before ischemia and after 24 hours reperfusion ( $p=0.787$ ) and 7 days after I/R ( $p=0.343$ ).

**TABLE 2** – Descriptive data (pixels) of differential renal function defined by scintigraphy, using Kodak molecular imaging software.

<i>Left kidney</i>	<i>Renal function (%)</i>		<i>p-value<sup>(1)</sup></i>
	<i>Baseline</i>	<i>After I/R<sup>(2)</sup></i>	
Control 24 hours	48.0 ± 2.0	47.0 ± 5.0	0.761
Control 7 days	49.0 ± 2.0	46.0 ± 3.0	0.010
Sildenafil 24 hours	50.0 ± 2.0	49.0 ± 2.0	0.787
Sildenafil 7 days	49.0 ± 1.3	47.0 ± 3.0	0.343

Mean ±Standard Deviation

1. P-value; analysis by Student t test.
2. I/R, ischemia/reperfusion

### *Histopathologic Results*

Renal I/R injury caused marked alterations in histology of the left kidneys compared with right kidneys, not subjected to ischemia. At 24 h post-reperfusion the left kidney tissue from control rats showed significant changes, when compared to sildenafil treated animals. Parallel to the marked deterioration of differential renal function of control group rats, the left kidneys harvested from these animals (24 hours post-ischemia) were significantly more affected by cellular necrosis (CN) when compared with the left kidney of rats treated with sildenafil ( $p = 0.04$ ). However, no difference was observed between the two groups when the cell vacuolation (CV) and intratubular cylinders (IC) in renal tissue were examined ( $p=0.28$  and  $p=0.72$  respectively). Dilatation of tubular lumen (DTL) was significantly more frequent in the sildenafil group rats compared with controls ( $p = 0.02$ ). These data are summarized in Table 3.

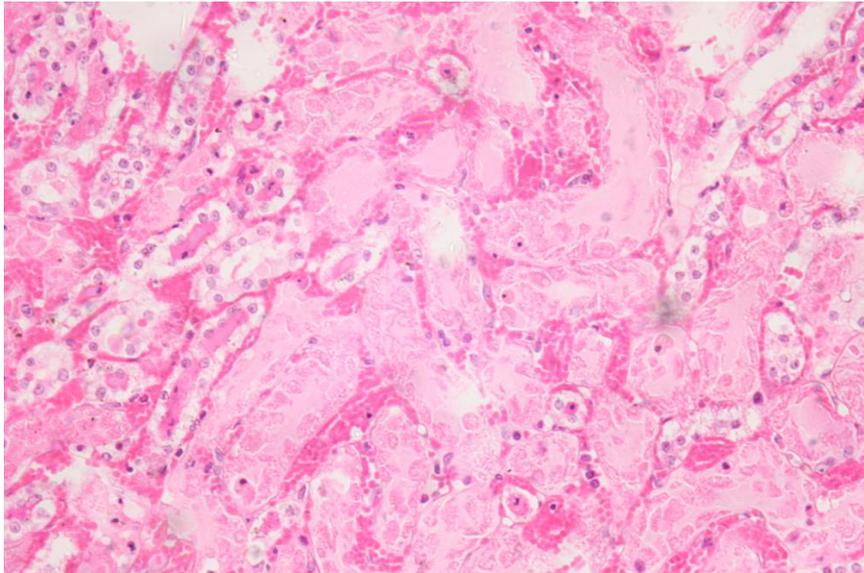
**TABLE 3** – Data set and its statistical test scores for the histopathologic changes in the left kidney, comparing the control and sildenafil groups, after 24 hours of I/R observation.

Histomorfometric parameter	Left kidney		P-valor*
	Control	Sildenafil	
DTL	0.75 ± 1.04	2.20 ± 0.84	0.02
CV	2.31 ± 1.39	1.80 ± 0.45	0.28
IC	1.88 ± 1.36	2.20 ± 0.84	0.72
CN	1.31 ± 1.41	0.20 ± 0.27	0.04

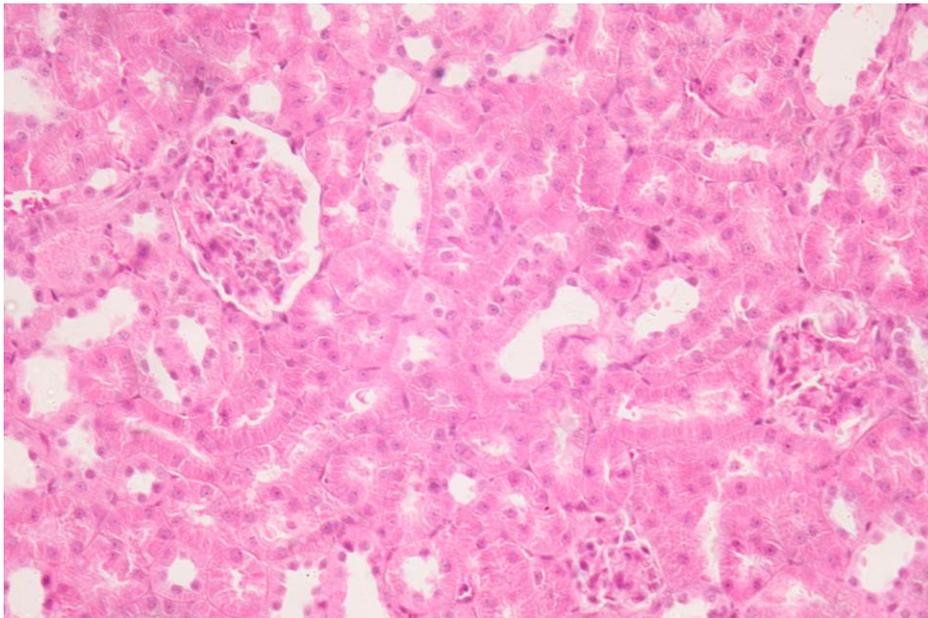
Mean ± Standard Deviation; \* P-valor, Mann-Whitney test, significance 5%

DTL – Dilation of Tubular Lumen; CV –Cellular Vacuolization; IC –Intra-tubular Cylinder; CN – Cellular Necrosis

Histopathological images of the left kidney can be observed in Figure 3 (control rat), where there is higher presence of cellular necrosis than in figure 4, from rat treated with sildenafil (24 hours after I/R).



**FIGURE 3** - Photomicrograph of kidney from a control group rat (24 h after I/R), showing cellular necrosis. Hematoxylin-eosin stained section, magnification 200x.



**FIGURE 4**- Photomicrograph of kidney from a sildenafil group rat, showing minor cellular necrosis and intense dilation of tubular lumen. Hematoxylin-eosin stained section, magnification 200x.

After seven days of the I/R event, we observed no significant differences in histopathological changes between the two groups, as shown in Table 4.

**TABLE 4** – Scores data on the histopathologic changes of the left kidney, comparing the control and sildenafil groups, after seven days of I/R.

Histomorfometric Parameter	Left kidney		P-valor
	Control	Sildenafil	
DTL	0.95 ± 0.69	1.86 ± 0.90	0.055
CV	1.15 ± 0.78	1.43 ± 0.53	0.229
IC	0.30 ± 0.35	0.71 ± 0.57	0.108
CN	0.05 ± 0.16	0.00 ± 0.00	0.739

Mean ± Standard Deviation; \* P-valor, Mann-Whitney test, significance 5%

DTL – Dilatation of Tubular Lumen; CV –Cellular Vacuolization; IC –Intra-tubular Cylinder; CN – Cellular Necrosis

## Discussion

All organs to be transplanted remain in a period of cold preservation before being implanted in recipients. In these cases, the ischemia and reperfusion organ injury (I/R) is a complex process involving the period of anoxia during cold preservation, followed by reperfusion, whose injury depends on the period after implantation, occurring in all organs transplanted and is directly related to the length of ischemia time<sup>1,4</sup>. The interruption of renal blood flow during clamping of the vascular pedicle is required during partial nephrectomy, especially in tumors deeply located into the renal parenchyma. The remnant kidney suffers the consequences of the I/R process, and the most important factor in the return of organ function appears to be the time of ischemia. It has been demonstrated in experimental studies that the maximum duration of warm ischemia, associated with complete recovery of renal function is 30 minutes, but some authors postulate that this time can be extended up to 90 minutes<sup>9-11</sup>. In the present work the time of renal ischemia in the experimental model was 60 minutes.

Several studies have been conducted to explain the pathophysiology of renal I/R, trying to find drugs and measures that reduce their effects. Among them, nitric oxide (NO), a vasodilator that helps to decrease the expression and activity of endothelin in vascular endothelium, may be protective against ischemic renal injury<sup>12,13</sup>. With endothelial injury, production of NO by the endothelial nitric oxide synthetase is inhibited. It has been demonstrated that warm ischemia leads to increased renal vascular resistance, probably caused by a loss on the ability of vascular endothelium to produce and release NO, or by an imbalance between production of NO and endothelin-1, which is essential to the vascular function on regulating of organ perfusion<sup>6,13</sup>.

Experimental studies with NO and carbon monoxide have shown a protective effect against injury after I/R<sup>5,6</sup>. An experimentally study described the use of sodium nitroprusside (a NO donor) in kidneys isolated from animals subjected to warm ischemia and reperfusion. It was demonstrated higher renal blood flow and lower renal vascular resistance, comparing with controls<sup>5</sup>.

Öztürk et al.<sup>6</sup> studied the molsidomine in the process of I/R. The molsidomine is a potent vasodilator that is widely used as antianginous, relaxing the smooth

muscle by stimulating guanylate cyclase, increasing the levels of cyclic guanosine monophosphate (cGMP). They investigated the protective effect of molsidomine on renal function and histomorphometry during the first week after I/R. A rat model of right nephrectomy and occlusion of the left renal artery for 60 min was used. All rats had blood urea and creatinine dosed daily and renal histological analysis was done on seventh day. Molsidomine group rats had better recovery of urea and creatinine, a better survival and lesser degrees of kidney injury when compared with the control group<sup>6</sup>. This experimental design was similar to that used in our work, except the right nephrectomy, not performed in our rats.

The phosphodiesterase inhibitors are a class of vasoactive drugs that have been developed for the treatment of erectile dysfunction. The mechanism of action involves inhibition of the enzyme phosphodiesterase-5 (PDE-5), resulting in increased cGMP and relaxation of smooth muscles in the penis. There are 11 phosphodiesterases families identified in mammals. Immunohistochemical studies have demonstrated the presence of PDE-5 in vascular smooth muscle, in bronchial tissues and platelets<sup>14-16</sup>. Over the past 10 years, there has been considerable interest in investigating the role of sildenafil in protection against injury by I/R in animal models. It was shown that sildenafil induces protective effect in myocardium<sup>21</sup>. It is possible that the vasodilating action of sildenafil contributes to the release of endogenous mediators, such as adenosine and bradykinin from endothelial cells, which triggers a cascade resulting in phosphorylation of nitric oxide synthase and the release of NO<sup>17</sup>. This knowledge stimulated a research field for the use of inhibitors of phosphodiesterases in the organs injuries caused by I/R. Some of the few experimental studies with the use of sildenafil as a protector against kidney ischemia were made by Lledo-Garcia et al.<sup>7,8</sup>, who used pigs subjected to left nephrectomy and auto-transplantation of the right kidney after 45 minutes of normothermic ischemia. The results demonstrated a better hemodynamic pattern (increased blood flow and low renal vascular resistance), favorable histology and a higher concentration of serum NO in the animals treated with sildenafil than in controls<sup>7,8</sup>.

The design of the present experiment was originally used by Araújo et al.<sup>18</sup> who analyzed, by scintigraphy and histopathology, the action of chlorpromazine on renal normothermic ischemia. In both the work of Araújo et al.<sup>18</sup>, as in our experiment, the right kidney was preserved in all animals. So, the systemic reactions such as hypotension, hypovolemia, heart failure and nephrotoxicity could also be evident in the right kidney. Therefore, only those animals with histologically preserved right kidney remained in the protocol. The maintenance of the contralateral kidney tends to isolate the pharmacological effect of the experimental drug<sup>18</sup>.

In this study the administration of sildenafil one hour before renal ischemia was based on experimental models of myocardic ischemia<sup>17,21</sup>. The dose of sildenafil (1 mg/kg) orally followed the model used by Lledo-Garcia et al., who found effective plasma levels<sup>7,8</sup>. In our experiment we observed less functional and histopathological changing in the left kidney of the sildenafil group rats, when compared to the left kidney of the control group, meaning a protective effect of the drug against renal I/R.

As right nephrectomy was not performed, the renal function was not measure by urea and creatinine dosage. Renal function was measured with radioisotope renogram, the method of choice for evaluating the differential function of each kidney. The 99m-technetium-mercaptatide, whose chemical nomination is mercapto-acetyl-triglycine (99mTc-MAG3) is the radiopharmaceutical most widely used in

studies of the differential renal function<sup>22</sup>. However, in this study we used the 99m-technetium-ethylenedicysteine (99mTc-EC), because the 99mTc-MAG3 is not currently available in the Brazilian market. 99mTc-EC was described and introduced in nuclear medicine by Verbruggen et al.<sup>20</sup> in 1990 and it has an effect comparable to 99mTc-MAG3<sup>19</sup>. In our experiment, we used the Image Station In Vivo FX, whose scintigraphic imaging was captured by using the radioisotope phosphor screen, which converts high-energy beta particles into light (photons). The light was captured and processed into images and measured in pixels. This technique differs from that used by Araújo et al.<sup>18</sup>.

In the histopathological evaluation it was observed statistically significant difference in the scores of cell necrosis only in the left kidneys of rats examined 24 hours after I/R. In the samples of rats examined seven days after I/R, the histopathologic findings showed no significant differences between sildenafil and control groups, probably because of cellular recovery in kidneys 7 days after I/R. The intense tubular dilation in kidneys of sildenafil treated rats has proved to be relevant. Despite the dilation of tubular lumen be a histomorphometric characterization of tubular lesions, it can be explained by the vasodilator and natriuretic effect of sildenafil. Considering the methodology of this study, the above results and the literature collected data, sildenafil had a positive effect on the preservation of cellular function, allowing good recovery as well as protection of renal tissue exposed to I/R.

### Conclusion

Given our results, the experimental pretreatment with sildenafil resulted in reduced cellular damage due to renal I/R, evaluated by scintigraphy and histopathology. Further investigations are needed to establish the feasibility and efficacy of sildenafil in clinical I/R settings.

### References

1. Foley DP, Chari RS. Ischemia-reperfusion injury in transplantation: novel mechanisms and protective strategies. *Transplant Rev.* 2007; 21: 43– 53.
2. Desai MM, Gill IS, Ramani AP, Spaliviero M, Rybichi L, Kaouk JH. The impact of warm ischemia on renal function after laparoscopic partial nephrectomy. *BJU Int.* 2005; 95: 377 – 83.
3. Riggs SB, LaRoche JC and Beldegrun AS. Partial nephrectomy: A contemporary review regarding outcomes and different techniques. *Cancer J.* 2008; 14, 302-7.
4. Derweesh IH, Novick AC. Mechanisms of renal ischaemic injury and their clinical impact. *BJU Int.* 2005; 95: 948 – 50.
5. Hosgood SA, Bagul A, Kaushik M, Rimoldi J, Gadepalli RS, Nicholson ML. Application of nitric oxide and carbon monoxide in a model of renal preservation. *Br J Surg.* 2008; 95: 1060–7
6. Öztürk H, Aldemir M, Büyükbayram H, Dokucu A, Otçu S. The effects of the nitric oxide donor molsidomine prevent in warm ischemia-reperfusion injury of the rat renal – A functional and histopathological study. *Int Urol Nephrol.* 2001; 32: 601–7.
7. Lledo-Garcia E, Rodriguez-Martinez D, Cabello-Benavente R, Moncada-Iribarren I, Tejedor-Jorge A, Dulin E, Hernandez-Fernandez C, Del Canizo-Lopez JF. Sildenafil improves immediate posttransplant parameters in warm-

- ischemic kidney transplants. Experimental Study. *Transplant Proc.* 2007; 39, 1354–6.
8. Lledo-García E, Rodríguez Martínez D, Cabello Benavente R, Dulín E, García Bordas J, Fernández Álvarez E, Hernández-Fernández C, Del Canizo Lopez JF. Precondicionamiento farmacológico con sildenafil del riñón con isquemia normotérmica. *Actas Urol Esp.* 2008; 32, 67-74
  9. Humphreys MR, Castle EP, Lohse CM, Sebo TJ, Leslie KO, Andrews PE. Renal ischemia time in laparoscopic surgery: an experimental study in a porcine model. *Int J Urol.* 2009; 16, 105–9.
  10. Baldwin DD, Maynes LJ, Berger KA, Desai PJ, Zuppan CW, Zimmerman GJ, Winkielman AM, Sterling TH, Tsai CK, Ruckle HC. Laparoscopic warm renal ischemia in the solitary porcine kidney model. *Urology.* 2004; 64: 592–7.
  11. Orvieto MA, Tolhurst SR, Chuang MS, Lyon MB, Ritch CR, Rapp DE, Shalhav AL. Defining maximal renal tolerance to warm ischemia in porcine laparoscopic and open surgery model. *Urology.* 2005; 66: 1111–15.
  12. Simmons MN, Schreiber MJ, Gill IS. Surgical Renal Ischemia: A Contemporary Overview. *J Urol.* 2008; 180: 19-30.
  13. Jeong GY, Chung KY, Lee WJ, Kim YS, Sung SH. The effect of a nitric oxide donor on endogenous endothelin-1 expression in renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc.* 2004; 36:1943-5.
  14. Beavo JA. Nucleotide Phosphodiesterases: Functional Implications of Multiple Isoforms. *Physiol Rev.* 1995; 75: 725-43.
  15. Shin HS, Bae SK, Lee MG. Pharmacokinetics of sildenafil after intravenous and oral administration in rats: Hepatic and intestinal first-pass effects. *Int J Pharm.* 2006; 320: 64–70.
  16. Gupta M, Kovar A, Meibohm B. The Clinical Pharmacokinetics of Phosphodiesterase-5 Inhibitors for Erectile Dysfunction. *J Clin Pharmacol.* 2005; 45: 987-1003.
  17. Kukreja RC, Salloum F, Das A, Ockaili R, Yin C, Bremer YA, Fisher PW, Wittkamp M, Hawkins J, Chou E, Kukreja AK, Wang X, Marwaha VR, Xi L. Pharmacological preconditioning with sildenafil: basic mechanisms and clinical implications. *Vasc Pharmacol.* 2005; 42: 219-32.
  18. Araujo WM, Tucci Jr S, Costa, RS, Ferreira RA, Pozza ML, Mazzetto AS, Alves P, Cologna AJ, Martins ACP. Animal model of renal ischemic injury, and chlorpromazine protector effect, evaluated by Tc99m-MAG3 dynamic renal scan. *Acta Cir Bras.* 2002; 17: 15-9.
  19. Mooran JK. Technetium-99m-EC and other potential new agents in renal nuclear medicine. *Semin Nucl Med.* 1999; 29: 91-101.
  20. Verbruggen AM, Nosco DL, Van Nerom CG, Bormans GM, Adnaens PJ, De Roo MJ. Technetium-99m-L, L-ethylenedicysteine: a renal imaging agent. i. labeling and evaluation in animals. *J Nucl Med.* 1992; 33: 551-7.
  21. Bremer YA, salloum F, Ockaili R, Chou E, Moskowitz WB, Kukreja RC. Sildenafil citrate (viagra) induces cardioprotective effects after ischemia/reperfusion injury in infant rabbits. *Pediatr Res.* 2005;57:22-7.
  22. Caglar M, Gedik GK, Karabulut E. Differential renal function estimation by dynamic renal scintigraphy: influence of background definition and radiopharmaceutical. *Nucl Med Commun.* 2008;29:1002-5.

---

**Correspondence:**

Aldo Cunha Medeiros

Ave. Cordeiro de Faria S/N

59010-180, Natal, RN, Brazil.

[aldo@ufrnet.br](mailto:aldo@ufrnet.br)

Conflict of interest: none

Financial source: CNPq

## Abstract

The renal injury caused by the ischemia/reperfusion (I/R) occurs in many surgical procedures as kidney transplantation, vascular surgery of aorta and renal arteries and in partial nephrectomy. It causes graft dysfunction and cellular necrosis. To evaluate the effect of sildenafil, administered prior to ischemia/reperfusion (I/R), by renal scintigraphy and histopathological evaluation, twenty-four rats were divided randomly into two groups. They received 0.1 ml of <sup>99m</sup>Tc-ethylenediamine-diethylenetriamine (EDTA) intravenously, and a baseline (initial) renal scintigraphy was performed. The rats underwent 60 minutes of ischemia by left renal artery clamping. The right kidney was not manipulated. The sildenafil group (n = 12) received orally 1 mg/kg of sildenafil suspension 60 minutes before ischemia. Treatment with saline 0.9% in the control group (n = 12). Half of the rats was assessed after 24 hours and half after seven days of I/R, with new renal scintigraphy to study differential function. After euthanasia, kidneys were removed and subjected to histopathological examination. For statistical evaluation, Student t and Mann-Whitney tests were used. In the control group rats, the left kidneys had significant functional deficit, seven days after I/R, whose scintigraphic pattern was consistent with acute tubular necrosis, compared with the initial scintigraphy (p<0.05). Sildenafil treatment resulted in better differential function of the left kidneys 24h after reperfusion, compared with controls. Histopathologically, the left kidney of control rats (24 hours after I/R) showed a higher degree of cellular necrosis when compared with the sildenafil treated rats (p<0.05). Sildenafil had a protective effect in rat kidneys subjected to normothermic I/R, demonstrated by scintigraphy and histomorphometry. This was a

multidisciplinary study involving researchers at the experimental surgery, nuclear medicine, urology, pathology and statistics.

Key words: Ischemia. Reperfusion. Kidney. Scintigraphy. Rats. Sildenafil.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)