



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Alexandre Fabricio Martucci

**Achados hemodinâmicos e de função e
toxicidade renais após a infusão de carreadores
de oxigênio baseados em hemoglobina**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutor em Anestesiologia.

Orientadora: Prof^a Titular Yara Marcondes Machado Castiglia

Coorientador: Prof. Adjunto Paulo do Nascimento Junior

Coorientadora: Dr^a Amy G Tsai

**Botucatu
2016**

Alexandre Fabricio Martucci

Achados hemodinâmicos e de função e toxicidade
renais após a infusão de carreadores de oxigênio
baseados em hemoglobina

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutor em Anestesiologia.

Orientadora: Prof^a Titular Yara Marcondes Machado Castiglia
Coorientador: Prof. Adjunto Paulo do Nascimento Junior
Coorientadora: Dr^a Amy G Tsai

Botucatu
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Martucci, Alexandre Fabrício.

Achados hemodinâmicos e de função e toxicidade renais após a infusão de carreadores de oxigênio baseados em hemoglobina / Alexandre Fabrício Martucci. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Yara Marcondes Machado Castiglia

Coorientador: Paulo do Nascimento Junior

Coorientador: Amy G Tsai

Capes: 40102130

1. Insuficiência renal aguda. 2. Taxa de filtração glomerular. 3. Toxicidade - Testes. 4. Fluoresceína. 5. Hemodinâmica. 6. Hemoglobina.

Palavras-chave: Fluoresceína-isotiocianato sinistrina; Lesão renal aguda; Substitutos sanguíneos; Taxa de filtração glomerular.

Agradecimentos

À Dra Yara Marcondes Machado Castiglia, minha orientadora

É uma tarefa muito difícil conseguir aqui expressar todo o meu agradecimento à Dra Yara, pessoa incrível, que será minha eterna orientadora. É muito gratificante ser aceito por alguém que conquistou tanto pela própria especialidade, pela residência em Anestesiologia e pela pós-graduação em Anestesiologia.

A orientação da Dra. Yara foi muito além de correções de forma e conteúdo de minha tese. Ela me orientou em tempos difíceis durante a residência médica, no meu mestrado, e ainda conseguiu essa incrível oportunidade para o doutorado.

Muito obrigado.

Agradecimentos

Ao Dr Paulo do Nascimento Jr

Por abrir as portas do laboratório de Bioengenharia da Universidade da Califórnia San Diego e me apresentar aqueles que seriam meus co-orientadores. Foi devido ao seu empenho que pude me ligar a uma universidade estrangeira e abrir meus horizontes. Espero que suas cartas de apresentação continuem sendo bem recebidas, e espero sinceramente responder a altura por tanto esforço e dedicação.

Por toda preocupação dispensada tanto a mim quanto a minha esposa desde os primeiros momentos nessa jornada, acalmando nossos anseios e incentivando nossos sonhos.

Muito obrigado.

Agradecimentos

À Dra Amy G Tsai

Agradeço pela paciência e dedicação ao meu trabalho;
por ter proporcionado um ano rico em conhecimento técnico e cultural;
pelo acolhimento fraterno que dispensou à minha esposa e a mim.

I appreciate the patience and dedication to my work.
For giving one year rich in technical and cultural knowledge.
The fraternal welcome that dismissed to my wife and me.

Muito obrigado

Agradecimentos

Aos meu pais, Sidnei Martucci e Aparecida Leonice Fabricio Martucci, que me deram apoio desde o começo de minha jornada. Não é fácil descrever em palavras todo o amor e a gratidão que eu sinto. Imagino que as conquistas que nós dividimos com nossos pais sejam tão recompensadoras para nós quanto para eles. Nada disso teria sido possível sem o apoio e exemplo de meus pais.

Muito obrigado

Agradecimentos

À Ana Carolina Carvalho Ferreira Abreu Martucci, minha esposa, que passou horas estudando comigo, mudou de país comigo e ainda fez muito serviço de laboratório para me ajudar. Não existem palavras para agradecer tanto esforço e dedicação.

Muito obrigado

RESUMO

Martucci AF. Achados hemodinâmicos e de função e toxicidade renais após a infusão de carreadores de oxigênio baseados em hemoglobina. [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2016. 60p.

Introdução. As reações adversas relacionadas à transfusão sanguínea chegam a 0,138%. Lesão Pulmonar Aguda Relacionada à Transfusão (TRALI), imunossupressão, febre, transmissão de patógenos e reação hemolítica aguda são as complicações mais comuns. Na tentativa de mitigar essas reações, pesquisadores tentam criar carreadores de oxigênio eficazes e não tóxicos. As soluções até agora apresentadas não foram melhores do que uma transfusão sanguínea. O óxido nítrico (NO) tem influência nas alterações vasculares e pode ter influência na toxicidade. Assim como o NO, a curva de saturação da hemoglobina (Hb) pelo oxigênio e a meia-vida são características que não foram completamente investigadas quanto à toxicidade e às alterações sistêmicas e micro-hemodinâmicas. **Objetivo.** Determinar se as diferentes propriedades quanto à meia-vida, à dissociação de oxigênio e à cinética de NO de soluções de carreadores de oxigênio baseados em Hb (HBOC) afetam a microvasculatura e a função renal, diferentemente. **Material e Métodos.** Estudo prospectivo realizado no Laboratório de Bioengenharia da Universidade da Califórnia, San Diego, EUA, usando hamsters Sírios Dourados machos. Foi injetado um HBOC em animal previamente anestesiado e operado para instalação de uma janela de visualização da microvasculatura e, também, para implante de cateteres centrais. Cinco tipos de solução que variavam entre elas quanto à meia-vida, à curva de dissociação do oxigênio e ao consumo de NO foram empregadas. Foram avaliados a pressão arterial média (PAM), a frequência cardíaca, o conteúdo plasmático de Hb livre. Arteriolas de 50 a 100mcm foram avaliadas ao longo do experimento quanto a alterações de diâmetro, fluxo e velocidade do fluxo através da janela de visualização. Foi também avaliado o ritmo de filtração glomerular (RFG) com sinistrina associada à fluoresceína-isotiocianato em três tempos diferentes após a infusão das soluções. A estrutura renal foi analisada com cortes histológicos após o sacrifício. Somente após o experimento terminado é que as características das soluções foram reveladas. **Principais resultados.** As cinco soluções estudadas causaram

aumento da PAM e diminuição da frequência cardíaca sustentados até 30 minutos após a infusão das soluções. As medidas de diâmetro arteriolar e do fluxo e velocidade do fluxo nesses vasos não foram diferentes até 60 minutos após a infusão. Não foi detectada alteração significativa do RFG, no entanto a análise histológica revelou dano tubular associado à infusão das soluções. **Conclusão.** As soluções estudadas causaram lesão renal sem alterações do RFG. O aumento da PAM sem alterações uniformes da microcirculação pode sugerir que esse aumento seja decorrente de alterações em vasos de maior calibre.

Palavras-chave: taxa de filtração glomerular, substitutos sanguíneos, fluoresceína-isotiocianato sinistrina, lesão renal aguda.

ABSTRACT

Martucci AF. Microvascular findings and acute kidney function and toxicity following administration of hemoglobin based oxygen carriers [thesis]. Botucatu: Botucatu Medical School, UNESP-Univ. Estadual Paulista; 2016. 60p.

Introduction. There is a 0,138% incidence of adverse reactions related to blood transfusion. Synthetic oxygen carriers have been developed as an attempt to mitigate these reactions. So far, no solution is better than a regular blood transfusion. Nitric oxide (NO) has been implied to cause hypertension and may have influence on toxicity. As much as NO, hemoglobin (Hb) dissociation slope of oxygen and half-life have not been completely investigated regarding toxicity, microhemodynamics and systemic parameters. **Objective.** To determine if different oxygen and NO kinetics how toploads of Hb-based oxygen carriers (HBOC) with different half-life, oxygen and NO kinetics of Hb-based oxygen carriers (HBOC) affect microvascular hemodynamics and kidney function differently. **Design.** Prospective study done at Bioengineering Laboratory of University of California, San Diego, USA, using male Golden Syrian hamsters. Interventions: Hamsters implemented with a dorsal window chamber were given HBOC infusions characterized by five different Hb, oxygen, and NO kinetics and heme dissociation rates. Measurements: Systemic variables included mean arterial pressure, heart rate and free plasma Hb content. Microvascular hemodynamic measurements included arteriolar diameter and red blood cell flow velocity in vessels ranging from 50 to 100µm. Glomerular filtration rate (GFR) was estimated with fluorescein-isothiocyanate sinistrin clearance. Renal structure was investigated with histological analysis. **Main results.** All five HBOC solutions caused hypertension and bradycardia that were sustained up to 30 minutes after infusion. Microvascular diameter and blood flow velocity were not different from baseline up to 60 minutes after infusion. Acute changes in GFR were not detected however histological analysis performed 72 hours later revealed tubular damage. The characteristics of solution were only revealed after all the experiment was completed. **Conclusion.** All the rHb solutions resulted in kidney structural damage without change in GFR. There was no statistical uniform variation regarding arteriolar

diameter, velocity or flow. The mean arterial pressure increased without microhemodynamics uniform variations suggest a role to bigger vessels.

Keywords: glomerular filtration rate, blood substitutes, fluorescein-isothiocyanate sinistrin, acute kidney injury

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
bpm	Batimentos por minuto
CA	Califórnia
D	Diâmetro
DC	Débito cardíaco
DO ₂	Entrega de oxigênio aos tecidos
et al.	Colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
FC	Frequência cardíaca
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoresceína-isotiocianato
FITC-S	Sinistrina associada à fluoresceína-isotiocianato
g/dL	Grama por decilitro
Hb	Hemoglobina
HBOC	Carreadores de oxigênio baseados em hemoglobina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HO1	Heme-oxigenase 1
HPL	Hemoglobina plasmática livre
Htc	Hematócrito
KNOD	Constante de dissociação do óxido nítrico
LNAME	N-ômega-nitro-L-arginina-metil-éster-hidrocloreto
mcm	Micrômetro
mcm/s	Micrômetro por segundo
mg/Kg	Miligrama por quilograma
min	Minuto
ml	Mililitro
ml/min	Mililitro por minuto
mmHg	Milímetro de mercúrio
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio
P50-O2	Pressão parcial de saturação de 50% de oxigênio
PAM	Pressão arterial média
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio arterial
PEG	Polietilenoglicol
PIM	Pimonidazole
PLA	Polylactide
PO2	Pressão parcial de oxigênio arterial
Q	Fluxo

RFG	Ritmo de filtração glomerular
rHBOC	Carreadores de oxigênio baseados em hemoglobina recombinante
SO ₂	Saturação de oxigênio
TACO	Excesso de carga circulatória associada à transfusão
TL	Topload
TRALI	Lesão pulmonar aguda relacionada à transfusão
USA	<i>United States of America</i>
V	Velocidade
WF	<i>Window frame</i> ou janela de visualização

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1a	Foto do implante cirúrgico da janela de visualização (WF) com luz de fundo.....	25
Figura 1b	Foto do implante cirúrgico da janela de visualização (WF) com maior aproximação.....	26
Figura 2	Foto do implante dos cateteres.....	27
Figura 3	Foto da fixação dos cateteres na janela de visualização.....	27
Figura 4	Foto da janela de visualização (WF) sob luz de fundo a qual é posicionada no microscópio para visualização dos elementos da microcirculação.....	29
Figura 5	Medidas realizadas de acordo com o tempo (T) em minutos após o Topload.....	32
Figura 6	Procedimentos realizados de acordo com o tempo em dias (D) desde a instalação da janela de visualização até a nefrectomia. RFG = ritmo de filtração glomerular.....	32

Gráfico 1	Representação da pressão arterial média com referência aos valores basais separados por solução.....	34
Gráfico 2	Representação da frequência cardíaca com referência aos valores basais separados por solução.....	35
Gráfico 3	Representação da velocidade do fluxo arteriolar com referência aos valores basais separados por solução.....	35
Gráfico 4	Representação do diâmetro arteriolar com referência aos valores basais separados por solução.....	36
Gráfico 5	Representação do fluxo arteriolar com referência aos valores basais separados por solução.....	36
Gráfico 6	Representação da HPL por solução.....	37
Gráfico 7	Representação do RFG em unidades arbitrárias.....	37
Gráfico 8	Representação da análise histológica por intensidade, separados os resultados por solução.....	39

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Características das soluções de hemoglobina humana mutante, sintetizada a partir de bactéria.....	24
Quadro 2	Número de animais utilizados por solução.....	33
Tabela 1	Números de animais que apresentaram lesão tecidual distribuídos por grupo e intensidade da lesão.....	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 JUSTIFICATIVA.....	20
3 OBJETIVO.....	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
Animais.....	22
Soluções estudadas.....	22
Grupos.....	24
Preparação animal.....	24
Critérios de inclusão.....	28
Critérios de exclusão.....	28
Parâmetros sistêmicos.....	28
Topload.....	28
Avaliação da microcirculação.....	28
Amostras sanguíneas.....	29
Função renal.....	30
Análise tecidual renal.....	30
Medidas dos parâmetros estudados.....	31
Análise estatística.....	32
5 RESULTADOS.....	33
Homogeneidade.....	33
Pressão arterial.....	34
Frequência cardíaca.....	35
Velocidade arteriolar.....	35
Diâmetro arteriolar.....	36
Fluxo arteriolar.....	36
Hemoglobina plasmática livre.....	37
Ritmo de filtração glomerular.....	37
Análise renal tecidual.....	38
6 DISCUSSÃO.....	40
Pressão arterial média.....	40
Microcirculação.....	41
RFG e análise histológica renal.....	42
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS A MODO DE CONCLUSÃO.....	44
8 REFERÊNCIAS.....	45
APÊNDICE.....	53

1 INTRODUÇÃO

O primeiro relato médico de transfusão sanguínea bem-sucedida data de 1818. James Blundell realizou o procedimento, transfundindo experimentalmente em um paciente entre 30 e 40 anos, com vômitos incoercíveis, usando seringas (Blundell, 1819). Tratava-se de um paciente com taquicardia, pulsos finos, palidez cutânea, alteração do nível de consciência e que não conseguia se alimentar. Todo alimento dado ao paciente era regurgitado. Ao exame físico, nenhuma alteração foi descrita, assim como nenhum relato de dor. Já com alguns estudos bem-sucedidos em cães (Blundell, 1818), ele sugeriu a hemotransfusão aos colegas médicos e a esse paciente. Após a aceitação do procedimento, ele foi realizado sem intercorrências. Ao final do dia, o paciente encontrava-se disposto e alerta, porém faleceu três dias após o procedimento. A necropsia revelou um endurecimento do piloro. Mais tarde, em 1829, seu trabalho em mulheres que apresentavam hemorragia pós-parto (Blundell, 1829), usando seringas, foi considerado um sucesso. O primeiro banco de sangue, porém, foi criado somente em 1930.

A transfusão sanguínea não é livre de complicações. Segundo relatório do Reino Unido, a incidência de reações adversas relacionadas à transfusão chegou a 0,138% em 2014 (Bolton-Maggs e Poles, 2014). Lesão Pulmonar Aguda Relacionada à Transfusão (TRALI) (Land, 2013) é uma das possíveis complicações relacionadas à transfusão e destaca-se hoje como a maior causa de mortalidade relacionada a esse procedimento, cerca de 40%, segundo Marik e Corwin (2008), e a incidência de TRALI chega a 41% das complicações relacionadas à transfusão, segundo relatório anual do *FDA* (órgão competente nos Estados Unidos da América (EUA) (2014). Seguem a TRALI, o Excesso de Carga Circulatória Associada à Transfusão (TACO), com 22%, as reações hemolíticas transfusionais, com 21%, as infecções, com 8%, e as reações anafiláticas, com 6%. A transfusão de um concentrado de hemácias já é suficiente para aumento de complicações (Hajjar et al., 2010).

Atualmente, o balanço entre oferta e demanda de sangue é suficiente, porém a Organização Mundial de Saúde (OMS) alerta que esse balanço pode mudar com o envelhecimento esperado da população, uma vez que a parcela de doadores irá diminuir em relação à parcela da população mais suscetível de receber transfusões sanguíneas, os idosos (Zou et al., 2008).

Uma das funções mais importantes do sangue é o transporte de oxigênio aos tecidos, realizado pelas hemácias. Na prática clínica, a correção da volemia com expansores plasmáticos, sejam eles soluções cristaloides ou soluções coloides, pode compensar em parte a falta de hemoglobina (Hb), elevando o débito cardíaco e promovendo oferta de oxigênio adequada às necessidades metabólicas. Assim, o desenvolvimento de substitutos sanguíneos exige que esses produtos sejam também expansores plasmáticos eficazes (Palmer e Intaglietta, 2014). Atualmente, os substitutos sanguíneos são chamados de carreadores de oxigênio, visto que seu desenvolvimento tem se concentrado na função de transportar oxigênio (Novaretti, 2007).

A Hb é a proteína da hemácia responsável pela função de carrear oxigênio. Naturalmente, a Hb livre de estroma celular foi utilizada em diversos experimentos como solução alternativa à transfusão sanguínea. Von Stark, 1898, fez uso de Hb livre de estroma celular e sabe-se, desde então, de seu potencial nefrotóxico (Von Stark, 1898). Mais tarde, evidenciou-se, como causa da nefrotoxicidade, o acúmulo, em excesso nos túbulos renais, de ferro proveniente da Hb ou mioglobina e que não foi ligado à transferrina (Paller, 1988; Martines et al., 2013). Os estudos que se seguiram passaram a sugerir que modificações na estrutura da Hb fossem feitas para que seu uso como carreador de oxigênio ou como expansor plasmático pudesse ocorrer de maneira segura (Chang, 2013).

As primeiras modificações relatadas são o uso de ligações cruzadas entre as moléculas de globina, da mesma Hb e entre as moléculas de Hb, aumentando o tamanho da molécula e sua estabilidade. Uma série de experimentos passou a utilizar as ligações cruzadas como possível solução à toxicidade (Bunn e Jandl, 1968; Chang, 1971; Dudziak e Bonhard, 1980; Park et al., 1981; DeVenuto e Zegna, 1982; Wong, 1988; Przybelski et al., 1996). Estes autores exploraram o uso de Hb humana e de outros animais, mas nenhum produto foi melhor do que uma transfusão sanguínea quanto ao carregamento de oxigênio, e ainda ocorria toxicidade renal. A criação de microcápsulas semipermeáveis foi talvez o passo com maior impacto na diminuição da toxicidade renal. Essas microcápsulas têm a capacidade de conter enzimas ou proteínas em um ambiente semelhante ao intracelular. Essas membranas semipermeáveis previnem o contato com o meio externo de maneira abrupta da Hb e do conteúdo enzimático. Diminuem, assim, as chances de reações imunológicas e de hipersensibilidade, aumentam o tempo de circulação e

contribuem para reduzir a nefrotoxicidade (Chang, 1964). Apesar da menor toxicidade renal, ainda podem ocorrer complicações. Soluções em microcápsulas descritas por Chang, em 1964, apresentam toxicidade hepática quando administradas em doses que seriam usadas clinicamente. Outro passo importante no controle da toxicidade renal foi o encapsulamento da Hb com polietileno glicol (PEG) (Belcher et al., 2013). Esse encapsulamento aumentou a meia-vida significativamente, sendo que ainda passou a ocorrer metabolização hepática, com diminuição da toxicidade renal (Olofsson et al., 2011). O desenvolvimento dessas soluções teve apoio maior após 1980, quando transfusões sanguíneas foram associadas à contaminação pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

A afinidade, medida pela pressão parcial de saturação de 50% de oxigênio (P50-O₂), é característica crucial para rápida saturação e entrega de oxigênio aos tecidos (Varnado et al., 2013). A P50-O₂ ótima em hemácias é entre 20 e 40 mmHg (Bunn e Jandl, 1968; Huang e Olsen, 1994; Dou et al., 2002). Determinar a afinidade ideal para esses tipos de soluções é também desejável.

O aumento da pressão arterial parece ser comum a todos os carreadores de oxigênio baseados em Hb (HBOCs). Esse aumento da pressão arterial parece ter relação com a disponibilidade do óxido nítrico (NO). Em pesquisa com carneiros e ratos, a aplicação complementar de NO preveniu o aumento da pressão arterial induzido por essas soluções nos animais (Yu et al., 2010). Os autores ainda puderam observar que mesmo doses muito pequenas de carreador de oxigênio são capazes de induzir vasoconstrição aórtica e pulmonar, suprimidas também pela administração de NO. Outro estudo de 2009 também infere que a resposta vasoconstritora aórtica é decorrente da depleção do NO (Yu et al., 2009). Um estudo de 2006, talvez seja aquele com maior evidência da implicação do NO na vasoconstrição (Tsai et al., 2006). Neste estudo, os autores utilizaram N-ômega-nitro-L-arginina-metil-éster-hidrocloreto (LNAME), composto inibidor da NO sintetase, e mediram a quantidade de NO perivascular. Concluíram que a depleção de NO decorrente do uso dos carreadores de oxigênio é por extravasamento dessas soluções ao espaço perivascular.

Recentemente, um carreador de oxigênio baseado em Hb previamente aprovado para uso no homem foi retirado do mercado após relatos de maior mortalidade por eventos cardiovasculares (Natanson et al., 2008). Atualmente, apesar de algumas soluções

chegarem à fase em que se compara a eficácia do agente novo com o tratamento padrão existente (fase III da Agência Nacional de Vigilância Sanitária ou ANVISA), os resultados não são melhores do que os de uma transfusão sanguínea (Weiskopf, 2010). A margem econômica é grande, porém, para o desenvolvimento desses produtos. Apenas os custos com material e exames, segundo o Instituto Pontagrossense de Hemoterapia (por meio de contato telefônico com o administrador), é de aproximadamente R\$400,00. Se forem levados em conta todos os custos diretos de uma transfusão bem-sucedida, um concentrado de hemácias chega a custar até US\$1.183,00 dólares nos Estados Unidos (Shander et al., 2010).

Como vantagens dos carreadores de oxigênio, podem ser citados o armazenamento mais eficiente, a não transmissão de doenças infecciosas e ainda a disponibilidade em larga escala. As guerras e as instituições militares foram as grandes investidoras nesse tipo de produto. Destaca-se, porém, o uso não militar em regiões de catástrofes naturais, onde o acesso a mantimentos e a entrega dos mesmos são difíceis, no atendimento pré-hospitalar e hospitalar de vítimas de trauma (Njoku et al., 2015), na situação de recusa do paciente em receber sangue, em pacientes com anemia falciforme e ainda na proteção de órgãos para transplante (Blackbourne et al., 2012; Weiskopf, 2014).

As soluções testadas neste presente estudo variam quanto à constante de dissociação do óxido nítrico (KNOD) e também à P50-O₂ e à meia-vida da Hb. Entender como essas características afetam a capacidade de entrega de oxigênio, utilizando-se, para isso, alterações sistêmicas e microhemodinâmicas que ocorrerem, irá ajudar o desenvolvimento de compostos mais eficazes (Palmer e Intaglietta, 2014).

Utilizando HBOCs que variam quanto à meia-vida, KNOD e P50-O₂, investigou-se o quanto essas características influenciam a microcirculação e a função renal.

2 JUSTIFICATIVA

Segundo relatório do Reino Unido de 2014, a incidência de reações adversas relacionadas à transfusão sanguínea é de 0,14%, uma taxa que pode ser considerada alta. Além disso, para que haja a transfusão sanguínea, há necessidade de tempo para a realização de testes de compatibilidade e nem sempre existe estoque suficiente para as demandas clínicas. Soma-se à alta taxa de complicações, a provável diminuição da relação oferta/demanda e o alto custo, justificando, assim, a pesquisa e o desenvolvimento de agentes que possam substituir a transfusão de hemocomponentes com segurança e eficácia, com menores índices de reação adversa e com rapidez e disponibilidade.

3 OBJETIVO

Este estudo tem como objetivo determinar se as diferentes propriedades quanto à meia-vida, à dissociação de oxigênio e à cinética de NO de soluções de carreadores de oxigênio baseados em Hb (HBOC) afetam a microvasculatura e a função renal, diferentemente.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Animais. Os animais utilizados foram hamsters Sírios Dourados, machos, de quatro a seis semanas de vida, com peso entre 55g e 65g na data do experimento. O cuidado animal seguiu os padrões do *National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* e o protocolo experimental nº S04052 foi aprovado pelo comitê de ética local.

Soluções estudadas. As soluções utilizadas são compostos de Hb humana mutante produzidos a partir de clone de bactérias que se diferenciam quanto à P50-O₂, KNOD e meia-vida. Essas soluções foram cedidas por John Steven Olson do *Department of BioSciences, Rice University, Houston, TX, USA*. As soluções foram estocadas em frascos de 2 a 3 mL e refrigeradas à temperatura de -80°C. Na data da utilização, elas foram deixadas à temperatura ambiente para descongelar, processo que demorou aproximadamente 15 minutos. As características das soluções foram reveladas apenas após a realização do experimento. Todas as soluções eram providas de subunidades α geneticamente modificadas para conter ligação cruzada, utilizando uma glicina entre o terminal C de uma cadeia α e o terminal N de outra cadeia α , como descrito por Looker et al., 1992.

0.1WT

A rHb0.1WT (*wild-type*) tem sua estabilidade aumentada por uma ligação cruzada, α -gly- α , mantendo, porém, sua conformação tetramérica. Possui também mutação V1M para facilitar a expressão em *E. coli*. Trata-se da primeira modificação na Hb em soluções carreadoras de oxigênio, sendo assim utilizada em outros estudos como grupo controle (Snyder et al., 1987; Looker et al., 1992; Varnado et al., 2013).

Bethesda (beth)

A solução Bethesda tem uma mutação genética na Hb, apresentando uma variante na cadeia β , na qual a histidina é substituída por tirosina na posição 145. Foi assim chamada porque uma mutação genética na Hb humana com essas características já é assim denominada. A ineficiência dessa Hb em se dissociar do oxigênio comumente leva os pacientes à policitemia (Hayashi et al., 1971; Kawashima et al., 1994). Em alguns estudos,

foi postulado que a posição normalmente encontrada da tirosina seria essencial para a estrutura não ligada ao oxigênio. No entanto, essa mutação parece não alterar as reações intrínsecas, nem sua conformação de ligação, apenas alterando sua estrutura quaternária (Olson e Gibson, 1972).

3001

Diminuição da P50-O₂ por mutação nos sítios α L29F, α B10 e β E11, com diminuição da taxa de depleção de NO. Maior afinidade do oxigênio é associada à policitemia no cenário clínico (Hayashi et al., 1971; Kawashima et al., 1994; Mollan et al., 2012).

Providence (prov)

Além de V1M, apresenta alteração genética dessa Hb, na posição β K82D, que troca uma lisina por um aspartato, imitando a hemoglobinopatia Providence. O importante dessa mutação é a sua interação mais fraca com o 2-3, difosfoglicerato (2,3-DPG), promovendo um aumento da P50-O₂. Essa alteração genética também promove aumento da resistência à degradação oxidativa (Bonaventura et al., 1976; Moo-Penn et al., 1976; Abraham et al., 2011).

3011

A Hb recombinante rHBOC 3011 é também baseada na mutação V1M para expressão em bactérias, apresenta mutação α L29W e da cadeia de genes β , tem taxa de depleção de NO diminuída e curva de dissociação de oxigênio deslocada para a direita devido à mutação adicional α (L29W/H58Q) e β (V67W), como descrito em trabalhos anteriores (Looker et al., 1994; Doherty et al., 1998; Olson et al., 2004; Varnado et al., 2013).

O quadro 1 traz um resumo das características das soluções.

Quadro 1. Características das soluções de hemoglobina humana mutante, sintetizada a partir de bactéria

Hb recombinante	Mutação	P50-O ₂	KNOD	Meia-vida α/β
3011	Aumento da P50-O ₂ por alteração no sítio α L29W/H58Q; com diminuição da taxa de depleção do NO por mutação em β V67F, é instável, porém	65±4,1mmHg	5-10 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	~20/≥20
0.1WT	Ligação cruzada para aumentar a estabilidade do tetrâmero e mutação no V1M que permite replicação em <i>E. coli</i>	10±1,3 mmHg	60 a 80 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	3,0±0,8/0,25±0,02
Providence	Substituição da Lisina por Aspartato na posição β K82D, promovendo menor interação com 2,3-DPG e, assim, aumento da P50-O ₂ e maior resistência à degradação por peróxido	14±0,7 mmHg	60 a 80 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	6,1±0,8/0,45±0,04
3001	Diminuição da P50-O ₂ por mutação no sítio α L29F; redução da taxa de depleção de NO por mutação nos sítios α B10 e β E11	< 10 mmHg	<10 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	40'
Bethesda	Diminuição da P50-O ₂ Alteração na histidina, posição 145, cadeia β	2,7 mmHg	56 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	60'

Grupos. Os animais foram alocados em cada grupo de acordo com a solução de carreador utilizada, totalizando 32 animais: G0.1WT com 6 animais, Gprov com 6 animais, Gbeth com 4 animais, G3001 com 3 animais, G3011 com 5 animais e Gc, grupo controle, com 8 animais. O número de animais correspondeu ao volume total de solução disponível. O grupo controle recebeu apenas solução salina. Os dados de microcirculação foram colhidos de grupo controle histórico (Tsai et al., 2006).

Preparação animal. O experimento foi realizado no laboratório de Bioengenharia da Universidade da Califórnia San Diego. O experimento de preparação animal descrito foi publicado pela primeira vez por Endrich et al. (1980). Hamsters Sírios Dourados machos foram, então, submetidos a procedimento cirúrgico de colocação da janela de visualização ou *window frame* (WF) e implante de cateteres jugular e carotídeo. O protocolo cirúrgico foi realizado em duas partes: a) colocação da WF e b) implante dos cateteres. A colocação da WF foi realizada primeiro e o implante dos cateteres foi realizado dois a três dias após a primeira cirurgia. Somente depois de dois a três dias do implante dos cateteres é que os experimentos foram realizados. No biotério, os animais foram sempre mantidos com alimentação e hidratação *ad libitum*.

O animal foi anestesiado com cetamina/xilasina, na dose de 200mg/10mg/kg, pela via intraperitoneal. O plano anestésico foi confirmado por ausência de reflexo à punção dolorosa com pinça cirúrgica na pata traseira do animal. Uma vez em plano anestésico, o pelo do dorso foi removido com creme depilatório - área aproximada de 5 x 2cm – e esse dorso foi enxaguado. Logo em seguida, foi aplicada técnica asséptica para preparação cirúrgica. A pele do dorso foi gentilmente puxada por sutura nas bordas da dobra de pele em um suporte que segurou o animal e a dobra de pele. Uma área de pele em forma de disco de aproximadamente 12 mm de diâmetro foi retirada com subcutâneo, gordura, fáscia, músculo subcutâneo e músculo retrator da pele, mas apenas de um lado da dobra de pele, enquanto o outro lado foi mantido intacto. O tecido exposto foi coberto com um vidro acoplado a um molde de titânio que fixou a dobra de pele (Figuras 1a e 1b). Durante a realização desse procedimento, o nível de anestesia foi constantemente avaliado e quando houve retorno dos reflexos dolorosos, doses suplementares de cetamina/xilasina, 100mg/5mg/kg, por via intraperitoneal foram realizadas. O procedimento demorava aproximadamente de 15 a 30 minutos. Os animais receberam buprenorfina, na dose de 0,05mg/kg, por via subcutânea, no pós-operatório imediato. Quando despertou, os animais voltavam ao biotério e eram avaliados duas vezes ao dia.

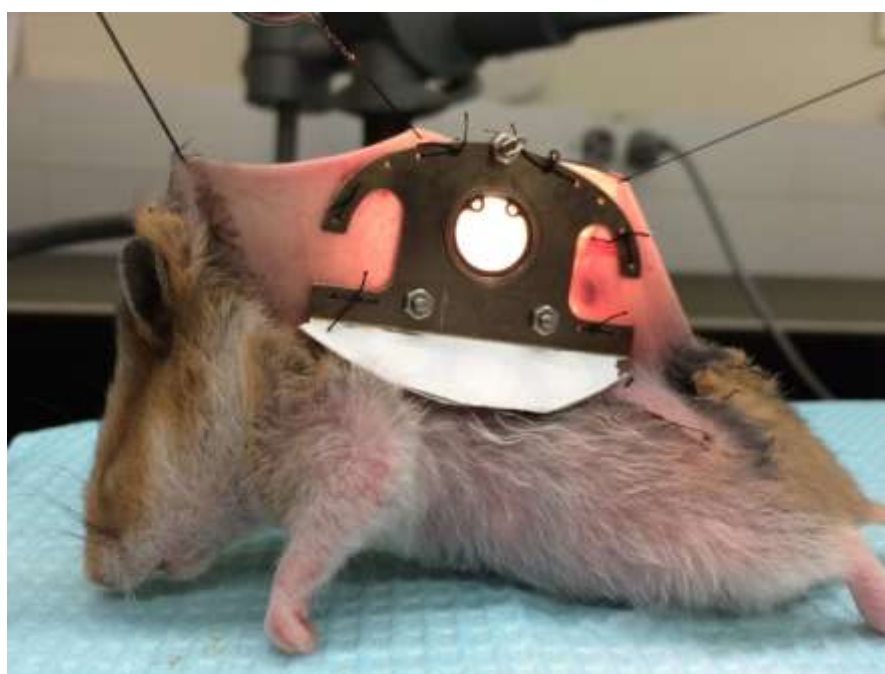


Figura 1a. Foto do implante cirúrgico da janela de visualização (WF) com luz de fundo

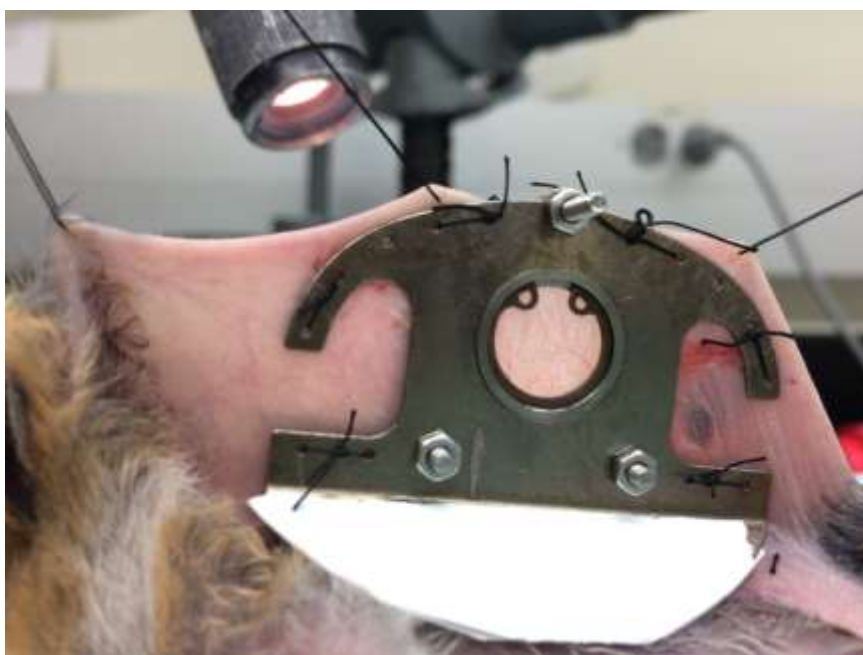


Figura 1b. Foto do implante cirúrgico da janela de visualização (WF) com maior aproximação.

O implante dos cateteres iniciou-se com procedimento anestésico com solução de cetamina/xilasina, na dose de 200mg/10mg/kg, pela via intraperitoneal. O plano anestésico foi confirmado por ausência de reflexo à punção dolorosa com pinça cirúrgica na pata traseira do animal. Uma vez em plano anestésico, a região cervical ventral do animal foi depilada e técnica asséptica foi utilizada. Incisão medial de aproximadamente 2 cm e dissecação dos planos para cateterização da veia jugular direita e da artéria carótida esquerda foram realizadas (Figura 2). Os dois cateteres foram, então, tunelizados para a parte posterior, com saída junto à WF. Sutura foi realizada na pele e junto aos cateteres para melhor fixação. A parte externa dos cateteres foi, então, enrolada e fixada junto à WF com fita adesiva (Figura 3). Os cateteres foram preenchidos com solução de NaCl 0,9% e heparina 30U/mL, totalizando 0,1mL em cada cateter. O procedimento demorava aproximadamente de 15 a 30 minutos. Durante a realização desse procedimento, o nível de anestesia foi constantemente avaliado e quando houve retorno dos reflexos dolorosos, doses suplementares de cetamina/xilasina, 100mg/5mg/kg, por via intraperitoneal, foram realizadas. Os animais receberam buprenorfina, na dose de 0,05mg/kg, por via subcutânea, no pós-operatório imediato. Quando despertados, os animais voltavam ao biotério, sendo avaliados duas vezes ao dia. Os animais foram avaliados diariamente até cinco a seis dias após a primeira cirurgia e aqueles com complicações foram excluídos (Tsai et al., 1998).



Figura 2. Foto do implante dos cateteres.



Figura 3. Foto da fixação dos cateteres na janela de visualização.

Critérios de inclusão. Todos os animais já preparados cirurgicamente com peso corporal entre 55 e 65 gramas e parâmetros sistêmicos dentro dos padrões de referência de estudos anteriores, isto é, frequência cardíaca (FC) maior que 340 batimentos por minuto (bpm) e pressão arterial média (PAM) entre 80 e 130mmHg, medidas por meio de transdutor na linha arterial, bem como hematócrito (Htc) maior que 45%.

Critérios de exclusão. Animais com edema ou sangramento na *WF*. Animais com algum sinal de doença, como letargia, ausência de ganho de peso após as cirurgias e PAM abaixo de 80mmHg.

Parâmetros sistêmicos. PAM e FC foram medidas continuamente durante o experimento por meio do cateter arterial carotídeo (*Spectramed Pressure Transducer, Biopac; Santa Barbara, CA, USA*).

Topload (TL). Trata-se de um protocolo utilizado para investigar características e toxicidades de soluções para testes, tendo sido iniciado de cinco a seis dias após a primeira cirurgia a que foram submetidos os animais. Utiliza-se como padrão a infusão das soluções i.v. a uma velocidade de 0,1ml/min em volume igual a 10% do volume sanguíneo. Este volume sanguíneo é estimado como sendo igual a 7% do peso corporal do animal. Este presente estudo utiliza um grupo controle histórico com infusão de NaCl 0,9% (Tsai et al., 2006). Em estudos prévios, a administração de solução de NaCl 0,9% não resultou em alterações significativas de PAM e também não apresentou alterações significativas da microcirculação (Tsai et al., 2006).

Avaliação da microcirculação. As mensurações da microcirculação foram feitas na *WF* e podem ser bem compreendidas pela figura 4. A avaliação dessa microcirculação deu-se por meio de um microscópio óptico com lente de imersão de 40 aumentos. No início do procedimento, cinco arteríolas foram escolhidas de acordo com seu tamanho (50 a 100µm de diâmetro) e facilidade de localização sob o microscópio. Para que o vaso fosse caracterizado como arteríola, foram determinantes a direção do fluxo e a velocidade acima de 400µm/s. Fluxo sanguíneo arteriolar foi medido por meio de um fotodiodo (*Photo Diode/Velocity Tracker 102B; Vista Electronics, San Diego, CA, USA*) (Intaglietta et al., 1975). A velocidade do fluxo medida na parte central das arteríolas (V) foi corrigida de acordo com o tamanho do vaso para obtenção da velocidade média das hemácias

(Lipowsky e Zweifach, 1978). Aparelho *Video image-shearing* foi utilizado para medir o diâmetro dos vasos (D) (*Image Shearing Monitor; Vista Electronics, San Diego, CA, USA*) (Intaglietta e Tompkins, 1972). Fluxo sanguíneo (Q) foi calculado como $Q = V \cdot \pi \cdot (D/2)^2$.

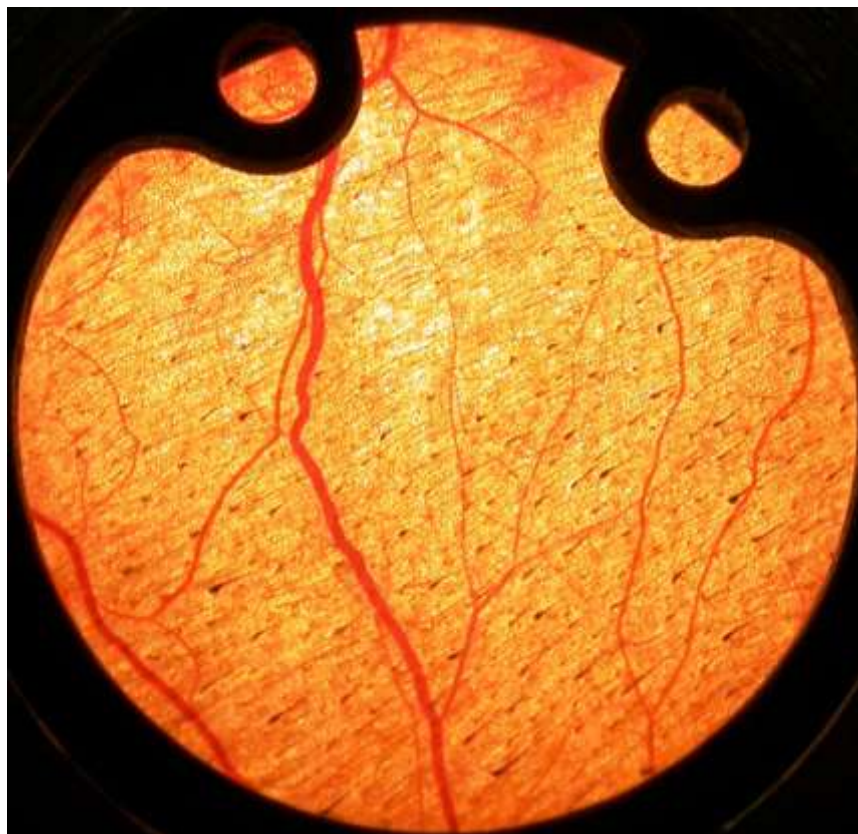


Figura 4. Foto da janela de visualização (WF) sob luz de fundo a qual é posicionada no microscópio para visualização dos elementos da microcirculação.

Amostras sanguíneas. Amostras sanguíneas foram colhidas pelo cateter arterial nos tempos *baseline* (aproximadamente 20 minutos antes do TL), 30 minutos após TL (TL30) e 90 minutos após TL (TL90). O Htc foi medido por centrifugação de amostras arteriais colhidas em tubos capilares heparinizados (*Readacrit Centrifuge, Clay Adams, Division of Becton and Dickinson; Parsippany, NJ, USA*). A concentração de Hb foi medida utilizando sangue total em fotômetro portátil (*B-Hemoglobin; Hemocue, Sweden*). Hemoglobina plasmática livre (HPL) foi medida com o mesmo aparelho a partir das amostras plasmáticas dos tubos capilares após centrifugação para medida do Htc e ela determina a quantidade de Hb livre de estroma celular no animal proveniente das soluções infundidas.

Função renal. O ritmo de filtração glomerular (RFG) foi estimado empregando sinistrina associada à fluoresceína-isotiocianato (FITC-S) (*Fresenius Kabi Linz, Austria*). A sinistrina é um agente que é totalmente filtrado, não reabsorvido e não excretado pelo rim. A associação FITC-S, um marcador fluorescente, não altera nem suas características farmacocinéticas e nem as farmacodinâmicas. Esse método estima o RFG pela meia-vida de FITC-S. A meia-vida de FITC-S tem uma relação inversa com o RFG e é calculada por um método transcutâneo que mede a curva de caimento da concentração tecidual de FITC-S. Esse método é eficaz e mostrou boa correlação com RFG quando foi medido concomitantemente com a concentração sanguínea (Schreiber et al., 2012; Zollner et al., 2013). FITC-S 1% foi injetada no cateter venoso, na dose de 5mg/100g de peso corporal do animal, sendo o cateter lavado em seguida com 0,1mL de NaCl 0,9% em cada mensuração. Uma câmera fotográfica de alta sensibilidade à luz acoplada a um microscópio óptico de fluorescência com lente de quatro aumentos foi utilizada para capturar imagens seriadas da WF por 2h. As medidas de intensidade da fluorescência foram feitas pelo programa ImageJ v1.47 (*National Institutes of Health* - domínio público) e plotadas em função do tempo para criar a curva de caimento (Abramoff et al., 2004). Com essa curva, a meia-vida de FITC-S foi então calculada pelo programa Prism v7 (*GraphPad software*), pelo cálculo da curva de caimento de uma fase. Em estudos com outras espécies de roedores, a correlação com o RFG deu-se por meio de um coeficiente. Este coeficiente é encontrado, fazendo-se a medida simultânea com inulina endovenosa (Schock-Kusch et al., 2009). Ainda não foram publicados estudos em hamsters que validem esse coeficiente, portanto, nesta pesquisa atual, foi utilizado um coeficiente para facilitar as unidades e manteve-se o valor apenas em unidades. A estimativa do RFG foi realizada em três momentos: 2h, 24h e 72h após o uso de cada solução de teste. O grupo controle foi utilizado para definir um valor normal de RFG. Para isso, fez-se a medida de RFG de oito animais em três tempos diferentes e considerou-se o valor normal igual à média $\pm$ um desvio padrão.

Análise tecidual renal. Após a última mensuração do RFG, o animal foi anestesiado novamente com cetamina e xilasina, na dose de 200mg/10mg/kg, por via intraperitoneal. O plano anestésico foi confirmado por ausência de reflexo à punção dolorosa com pinça cirúrgica na pata traseira do animal. Uma vez em plano anestésico, creme depilatório foi utilizado no dorso e o animal, submetido à nefrectomia esquerda,

sendo em seguida sacrificado com excesso de dose de tiopental sódico i.v.. O rim esquerdo de cada animal foi incluído em formaldeído a 4% e depois, incluído em resina. Esse método é excelente para visualização estrutural (Lacy e Schmidt-Nielsen, 1979). Os cortes das peças foram de 1,5mcm e foram corados com azul de toluidina. As lesões foram classificadas, segundo a intensidade, como 0 (zero) quando não houve lesão aparente; 1 (um) quando houve dilatação tubular; 2 (dois) quando houve necrose tubular com estruturas adjacentes intactas e 3 (três) quando houve necrose tubular com perda da estrutura adjacente com ou sem infiltrado inflamatório. Para se determinar o grau de lesão, foi usada a lesão de maior intensidade encontrada. A procura por lesão deu-se por no mínimo três lâminas com no mínimo seis cortes em cada lâmina. A gradação da lesão encontrada criada foi baseada em Jablonski et al. (1983), que dividiu as alterações morfológicas em 1 (um) quando foi visualizado mitose e necrose de células individuais, 2 (dois) quando foi visualizado necrose de todas as células adjacentes ao túbulo proximal, 3 (três) quando houve necrose do terço distal do túbulo proximal e 4 (quatro) quando houve necrose afetando os três segmentos do túbulo proximal. Foi realizada essa adaptação por entender-se que agentes que podem ser tóxicos ao rim podem afetar mais que apenas o túbulo proximal. Outro fator importante para essa adaptação realizada nesta pesquisa é a dificuldade em conseguir-se determinar, pelo método em resina, as diferentes partes do túbulo proximal, especialmente quando há agressão e as estruturas estão danificadas.

Medidas dos parâmetros estudados. PAM e FC foram monitoradas continuamente até 2h após o *TL* e registradas nos tempos *baseline*, 10 minutos, 30 minutos e 60 minutos. A microcirculação foi avaliada até 60 minutos após o *TL*. A Hb, o Htc e a HPL foram monitorados nos tempos *baseline*, 30 minutos e 90 minutos. As figuras 5 e 6 ilustram as medidas realizadas e os procedimentos realizados.

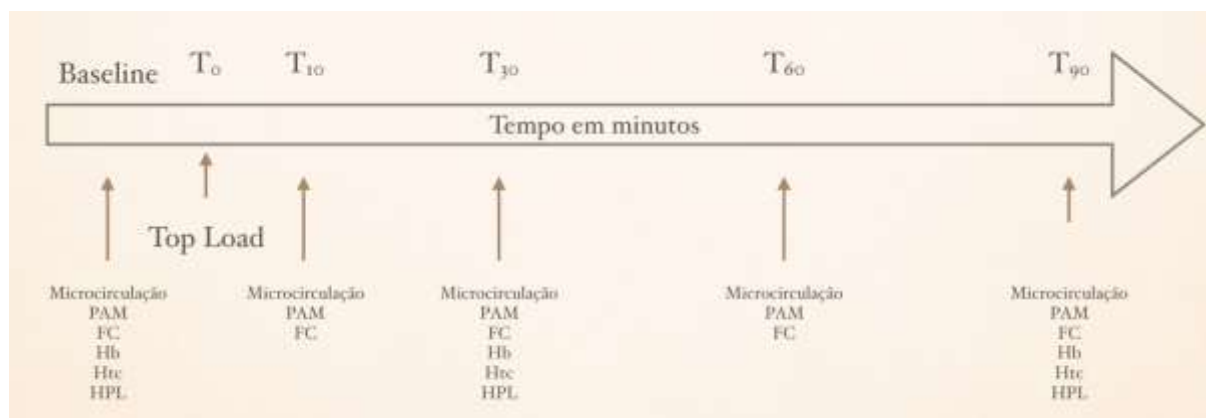


Figura 5. Medidas realizadas de acordo com o tempo (T) em minutos após o Topload

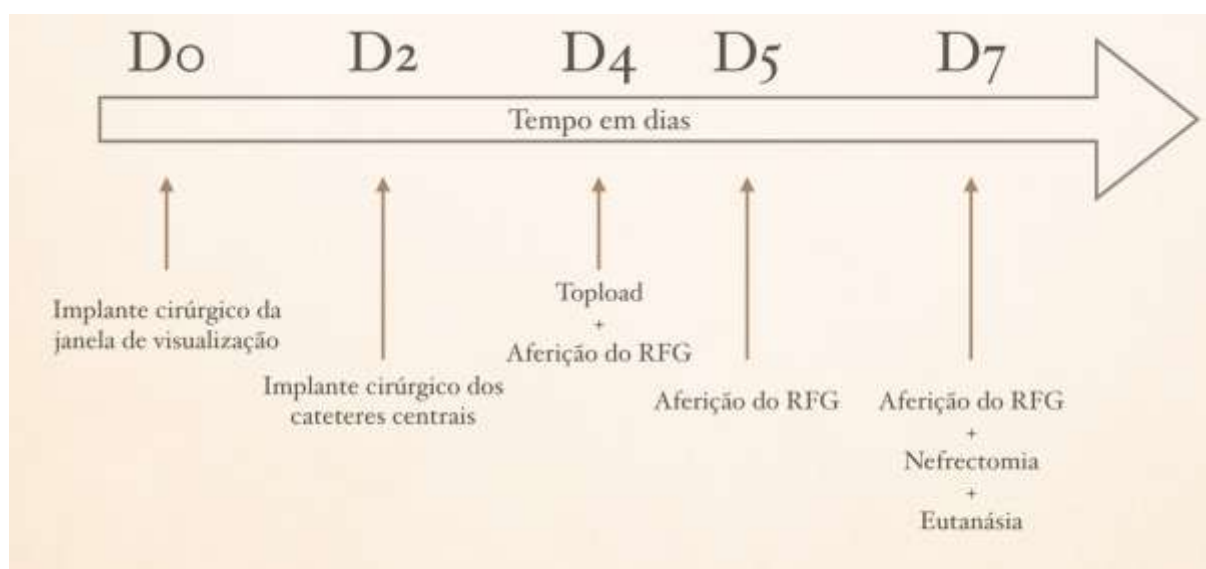


Figura 6. Procedimentos realizadas de acordo com o tempo em dias (D) desde a instalação da janela de visualização até a nefrectomia. RFG = ritmo de filtração glomerular.

Análise Estatística. A análise estatística testou as possibilidades de diferença entre os tempos T₁₀, T₃₀, T₆₀ e T₉₀ e o *baseline* e também entre os grupos para um mesmo tempo. Comparações entre os grupos foi testada pela análise variância (ANOVA). Pós-teste Bonferroni foi utilizado se significância estatística foi encontrada. Quando da comparação de dois grupos em relação a variáveis quantitativas foi considerado o teste t de Student para amostras independentes. A análise da diferença quanto à lesão renal foi testada por Mann-Whitney não pareado. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional Prism v.7.

5 RESULTADOS

O experimento foi realizado entre junho e dezembro de 2014. Foram avaliados 32 animais distribuídos nos grupos de acordo com a solução estudada e apresentados no quadro 2.

Quadro 2. Número de animais utilizados por solução

Solução	Número de animais utilizados
3011	5
0.1WT	6
Providence	6
3001	3
Bethesda	4
Controle	8

Após o *TL*, apenas dois animais morreram antes de completar 72 horas do experimento, sendo um animal do Gbeth e um animal do Gprov. Eles foram encontrados mortos na manhã do tempo completado de 72 horas. Seus dados acerca da análise histológica foram desprezados pois já estavam mortos no momento da nefrectomia.

Homogeneidade. Os animais apresentaram homogeneidade, confirmada pela análise de variância, no período inicial quanto à PAM, à FC e ao D arteriolar.

Pressão Arterial. O aumento significativo da PAM ocorreu nos grupos G3011, G0.1WT, Gprov e Gbeth (Gráfico 1). Os dados comparados referem-se aos mesmos animais estudados ao longo do tempo. Observa-se também que houve aumento de maior intensidade se comparados G3011 em 30 minutos com G0.1WT, Gprov e Gbeth, também em 30 minutos. Houve também aumento significativo quando do uso das soluções G3011 em 30 minutos, G0.1WT em 30 minutos, Gprov em 10, 30 e 60 minutos e Gbeth em 30 minutos, quando são comparados ao grupo controle histórico.

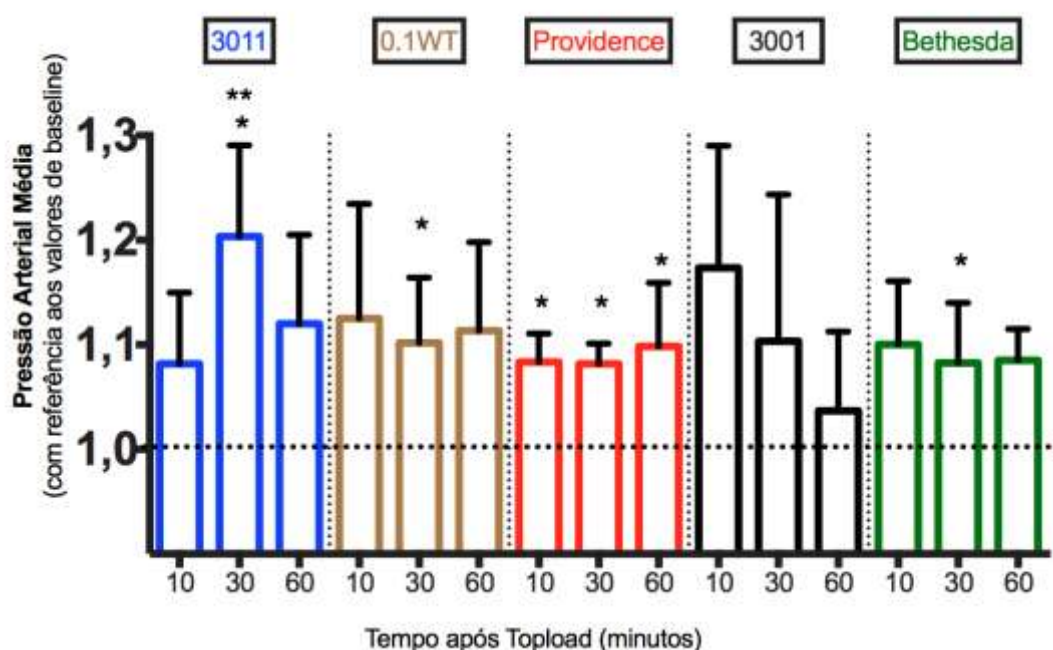


Gráfico 1. Representação da pressão arterial média com referência aos valores basais separados por solução. *Significância estatística se comparado ao *baseline* e ao grupo controle histórico. **Significância estatística comparando soluções em um mesmo tempo. A linha pontilhada representa os valores de *baseline* normalizados para 1,0.

Frequência Cardíaca. Houve diminuição significativa da FC após a infusão de todas as soluções, exceto a solução 3001 (Gráfico 2).

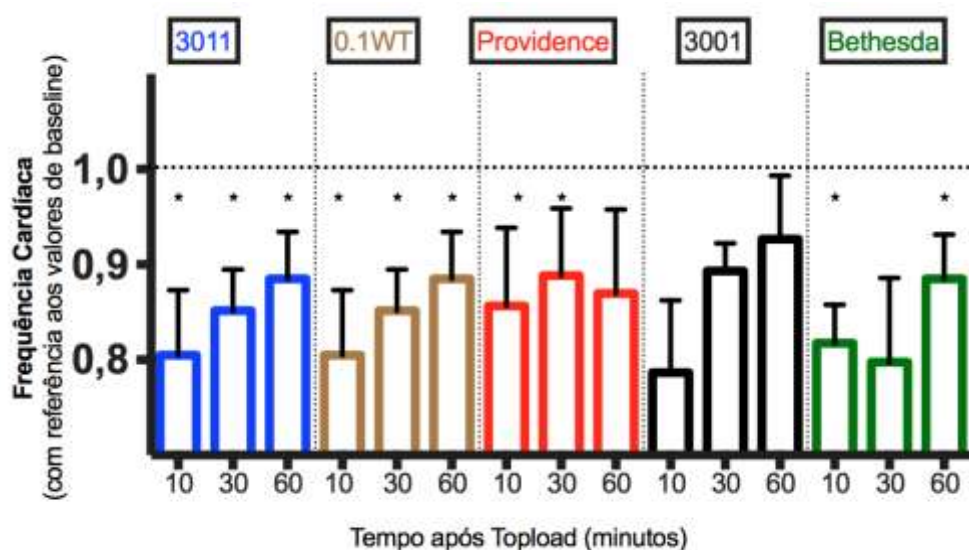


Gráfico 2. Representação da frequência cardíaca com referência aos valores basais separados por solução. *Significância estatística se em comparação ao do *baseline* e ao do grupo controle histórico.

Velocidade Arteriolar. A velocidade do fluxo arteriolar não apresentou alterações estatisticamente significativas (Gráfico 3).

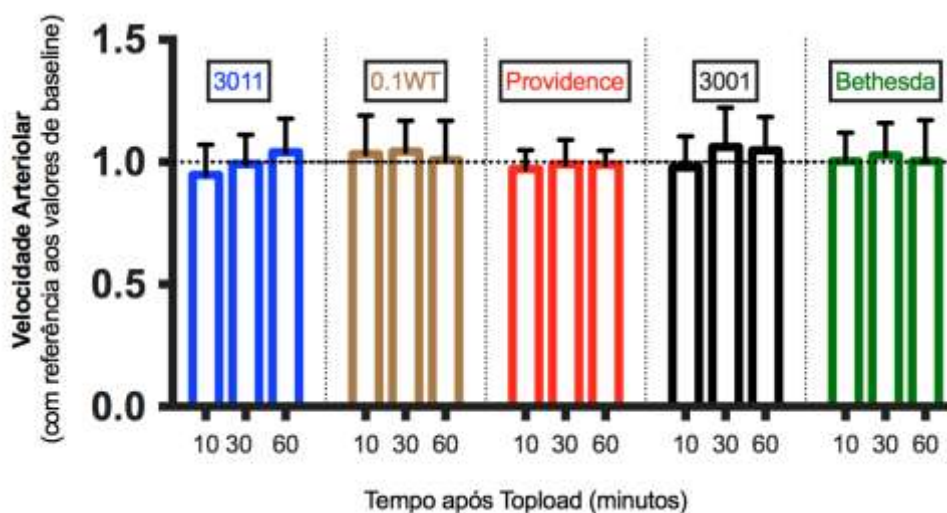


Gráfico 3. Representação da velocidade do fluxo arteriolar com referência aos valores basais separados por solução. *Significância estatística se em comparação ao do *baseline*.

Diâmetro Arteriolar. Alterações no D das arteríolas comparadas com o *baseline* foram utilizadas como indicativas de mudança no tônus vascular (Tsai et al., 2006). Não foi encontrada, porém, diferença estatisticamente significativa entre as medidas de D arteriolar (Gráfico 4).

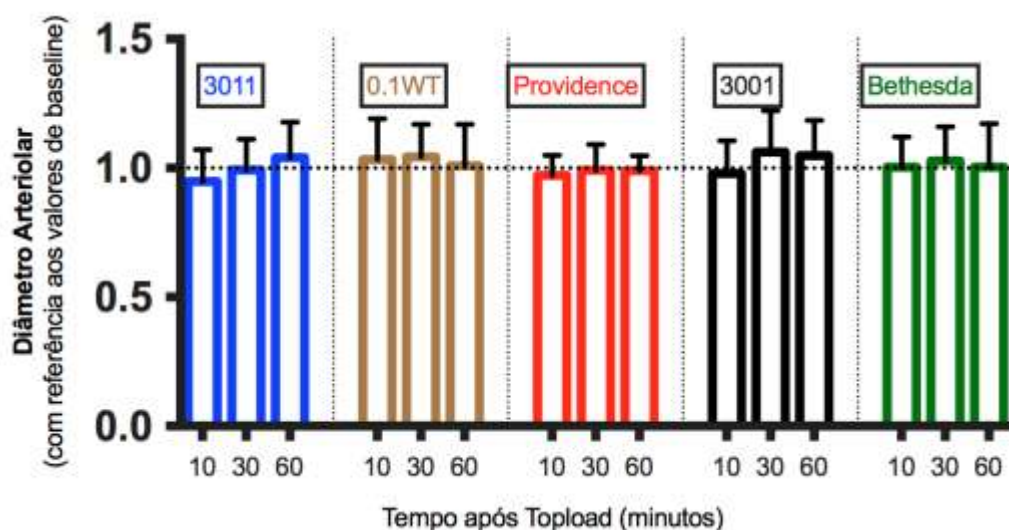


Gráfico 4. Representação do D arteriolar com referência aos valores basais separados por solução. *Significância estatística se em comparação ao do *baseline*.

Fluxo Arteriolar. O fluxo arteriolar não apresentou diferença significativa em relação ao tempo inicial, exceto aos 10 minutos para a solução 3011 (Gráfico 5).

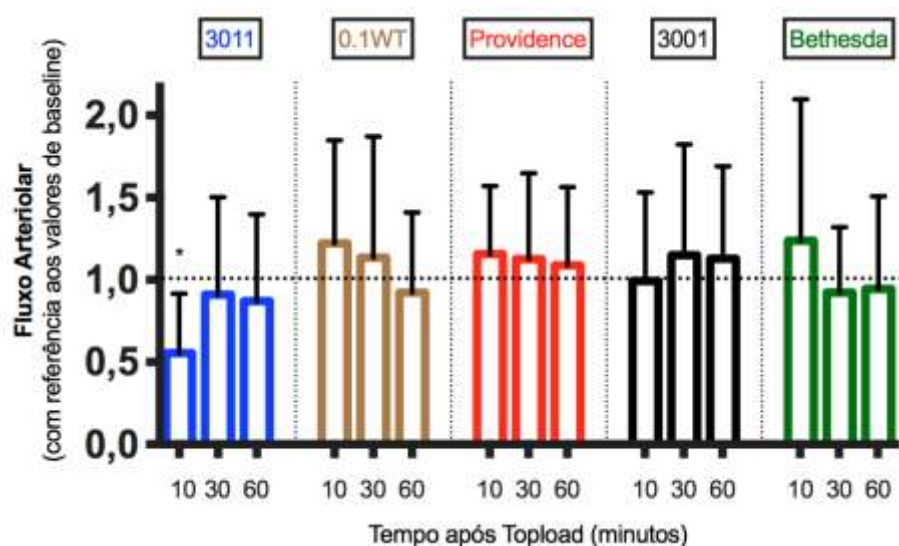


Gráfico 5. Representação do fluxo arteriolar com referência aos valores basais separados por solução. *Significância estatística se em comparação ao do *baseline*.

Hemoglobina Plasmática Livre. A HPL é diretamente proporcional à solução injetada. Assim, sua queda ao longo do tempo refere-se à eliminação ou distribuição da solução. G3011 apresentou concentração de HPL significativamente maior no tempo 30 minutos se em comparação a $G_{0.1WT}$, G_{Beth} e G_{Prov} . O gráfico 6 ilustra essas alterações da concentração.

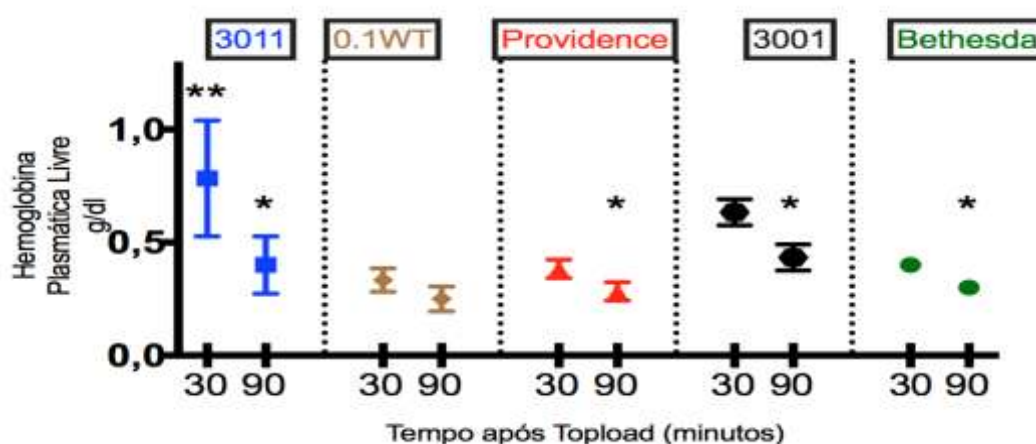


Gráfico 6. Representação da HPL por solução. *Significância estatística entre as concentrações de HPL medidas entre 30 e 90 minutos. **Significância estatística comparando a concentração de HPL da solução 3011 em 30 minutos com a das soluções 0.1WT, Providence e Bethesda, também em 30 minutos.

Ritmo de Filtração Glomerular. As alterações no RFG estão representadas no gráfico 7.

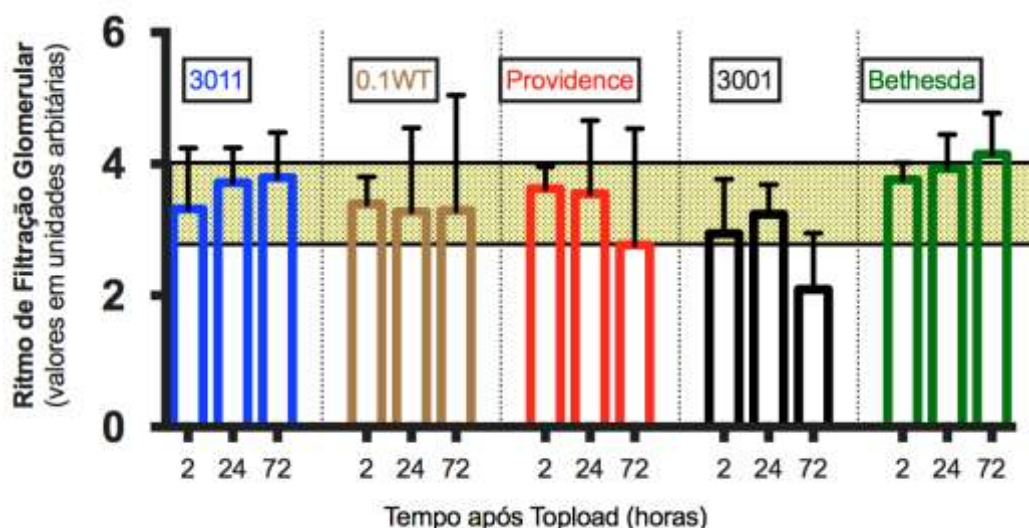


Gráfico 7. Representação do RFG em unidades arbitrárias. A área sombreada em amarelo representa a média $\pm$ um desvio padrão ($3,4 \pm 0,6$) obtidos do grupo controle.

Com relação às lesões histológicas: 0 (zero) quando não houve lesão aparente; 1 (um) quando houve dilatação tubular; 2 (dois) quando houve necrose tubular com estruturas adjacentes intactas e 3 (três) quando houve necrose tubular com perda da estrutura adjacente com ou sem infiltrado inflamatório.

Tabela 1. Número de animais que apresentaram lesão tecidual distribuída por grupo e intensidade da lesão

Intensidade	3011 (n=5)	0.1 WT (n=6)	Providence (n=5)	3001 (n=3)	Bethesda (n=3)	Controle (n=8)
0	2	0	1	0	2	8
1	0	1	1	1	1	0
2	0	2	0	2	0	0
3	3	3	3	0	0	0
Total	5	6	5	3	3	8

Análise Renal Tecidual

A intensidade da lesão tecidual foi estatisticamente significativa se comparados os grupos G_{prov}, G_{0.1WT}, G₃₀₁₁ e G₃₀₀₁ e grupo controle. Não houve diferença significativa com relação à intensidade da lesão tecidual entre essas soluções. A lesão renal encontrada no G_{beth} apresentou-se sem diferença estatisticamente significativa à do grupo controle e do G₃₀₀₁. A lesão tecidual foi classificada e está representada no gráfico 8. As imagens obtidas da histologia estão representadas individualmente nas fotos de 1 a 44.

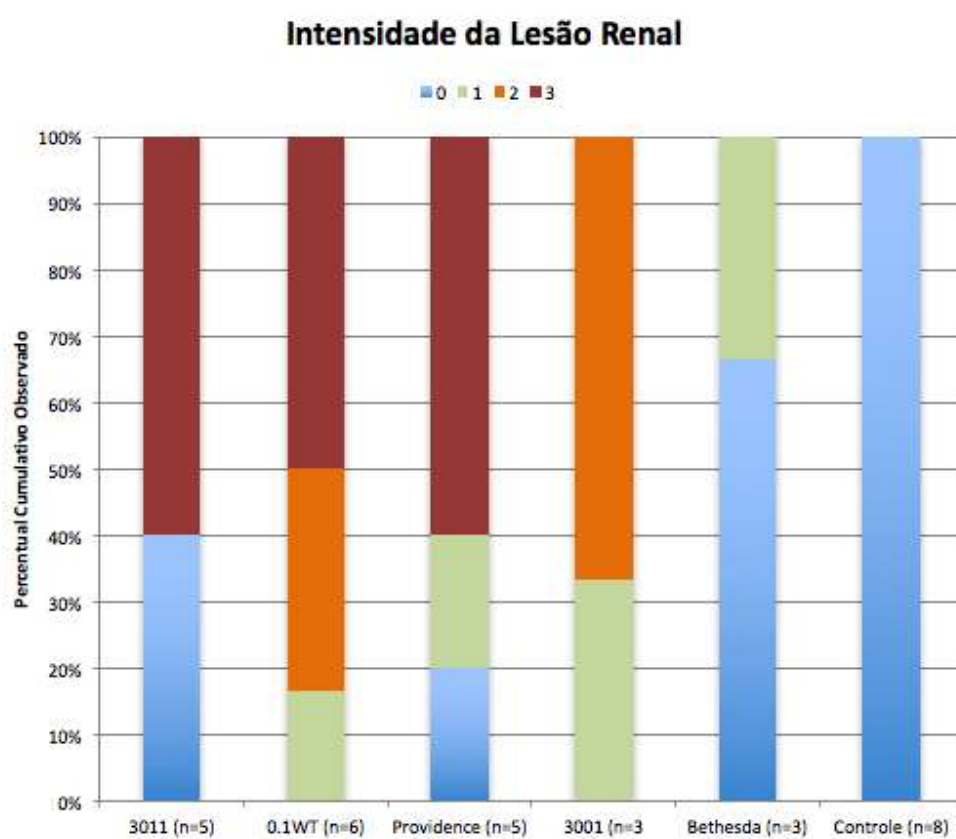


Gráfico 8. Representação da análise histológica por intensidade, separados os resultados por solução.

6 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi identificar se há associação entre as características bioquímicas de soluções carreadoras de oxigênio com alterações da microcirculação, PAM e toxicidade renal. Os resultados mostram hipertensão e bradicardia com todas as soluções, independentemente da KNOD, da P50-O2 e da meia-vida. A hipertensão parece não ter relação com o D arteriolar periférico. O fluxo arteriolar sofreu alterações de aumento e diminuição no mesmo animal, sugerindo que não houve padrão de alteração. A análise tecidual mostrou aumento da incidência de toxicidade renal com a utilização dessas soluções. O RFG não sofreu alterações estatisticamente significativas.

Pressão Arterial Média

Analisando os resultados obtidos, observa-se aumento da PAM sustentado até o fim do experimento, exceto no grupo G3011. Isto poderia ser explicado pela queda mais rápida da HPL. Uma vez que a solução é eliminada mais rapidamente, seus efeitos são percebidos em menor intensidade. Da mesma forma ocorre com as alterações da FC. Esse fato sugere, então, efeito dose-dependente. Em estudos com infusão de solução salina, seguindo o mesmo protocolo de *TL*, não foi observada alteração significativa da PAM do começo ao fim do protocolo (Tsai et al., 2006; Tsai et al., 2012). O fato de não se encontrarem diferenças significativas quanto ao fluxo ou ao D arteriolar sugere que o aumento da PAM seja decorrente de alterações de vasos de maior calibre (Sakai et al., 2000).

G3011 apresentou aumento da PAM em níveis mais elevados se comparados aos dos outros grupos. Esse grupo tem baixo KNOD e elevada P50-O2 e foi também aquele com maior concentração de HPL. Esse é um resultado inesperado se for considerada apenas a KNOD, já que se esperava maior aumento da PAM nos grupos das soluções com maior KNOD. A P50-O2 poderia também contribuir para aumento da PAM, já que disponibilizaria maior quantidade de oxigênio, que tem efeito vasoconstritor. O aumento da concentração de HPL poderia explicar esse maior aumento da PAM, porém, em estudo recente, a elevação adicional da quantidade de solução carreadora de oxigênio baseada em Hb livre de estroma celular não causou aumento adicional da PAM (Tsai et al., 2006).

Microcirculação

O estudo da microcirculação tem o objetivo de aperfeiçoar a entrega de oxigênio aos tecidos (DO_2). Calcula-se a entrega com a seguinte fórmula: $DO_2 = DC \times SO_2 \times 1.34 \times Hb + PaO_2 \times 0,0031$, sendo DC = débito cardíaco, SO_2 = saturação arterial da Hb pelo O_2 , PaO_2 = pressão parcial de oxigênio arterial, Hb = quantidade de Hb do animal, $1,34$ = quantidade de O_2 que um grama de Hb conduz, $0,0031$ = volume de O_2 dissolvido em 100 dL de sangue. Utilizou-se o fluxo arterial para estimar o débito sanguíneo em tecido periférico. É esperado que um concentrado de hemácias tenha Htc de 70% e Hb de 23g/dL. A concentração de Hb das soluções infundidas foi de $3,7 \pm 0,5$ g/dL. Assim, o aumento na Hb circulante seria de aproximadamente 3%, um valor menor do que a própria acurácia do método. Considerando-se, então, o animal acordado sem doença prévia, espera-se que a SO_2 e a PaO_2 sejam constantes, assim o aumento do fluxo pode ser considerado como aumento da entrega do O_2 aos tecidos, a DO_2 , e a diminuição do fluxo como diminuição da DO_2 . Os resultados mostram um padrão de variação de fluxo sem associação com KNOD ou P50- O_2 . Resultado diferente foi observado no estudo de Cabrales (2009), em que houve aumento de fluxo arteriolar com diminuição da KNOD.

O valor normal da P50- O_2 no homem é de 26,7mmHg e o valor normal em hamsters é de 28mmHg, valores muito próximos. Especula-se haver um valor ideal da P50- O_2 para uma solução carreadora de oxigênio. Determinar esse valor pode ser de grande valia. Quando a P50- O_2 é maior que a normal, essa solução teria a capacidade de entregar oxigênio em regiões mais isquêmicas. Por outro lado, uma afinidade alta poderia roubar oxigênio dos tecidos. Gundersen et al., 2009, quantificaram a quantidade de oxigênio entregue aos tecidos na presença de HBOCs recombinantes. Seus resultados provaram que HBOCs recombinantes aumentam a entrega de oxigênio aos tecidos em modelo experimental de perda sanguínea, porém não conseguiram atingir a mesma entrega quando se comparou com a quantidade equivalente de concentrado de hemácias. Importante também ressaltar que nesse estudo não foi possível diferenciar a DO_2 das soluções com relação a sua P50- O_2 . Os autores concluíram que as alterações da DO_2 foram relacionadas à KNOD e não comprovaram relação das alterações da microcirculação com alterações da P50- O_2 (Gundersen et al., 2009).

A depleção de NO chegou a ser especulada como causa de lesão tecidual em ensaio clínico realizado na Holanda. Neste estudo, foi encontrada associação entre a depleção de NO e a lesão de órgãos após cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea. (Vermeulen Windsant et al., 2014). Loeb et al., 1997, observaram queda do DC e do fluxo sanguíneo renal (neste de até 30%) após o uso de HBOCs. Alterações morfológicas encontradas em miocárdio após infusão de HBOC são compatíveis com lesão de isquemia e reperfusão (Burhop et al., 2004). Para avaliar se essa diminuição do fluxo sanguíneo é suficiente para causar isquemia, um estudo com pimonidazole (PIM) poderia ser realizado. Este PIM é rádio sensível e liga-se a tecidos com PO₂ abaixo de 10mmHg, evidenciando a isquemia (Terada et al., 2007; Rosenberger et al., 2009).

RFG e Análise Histológica Renal

Diferenças entre os resultados da análise histológica renal e do RFG podem acontecer. Espera-se grande alteração da função renal se uma alteração morfológica é importante. Por outro lado, nem toda alteração da função é decorrente de alteração morfológica que seja visível em microscopia óptica. O método com resina e azul de toluidina foi escolhido por ser de baixo custo e eficaz para alterações morfológicas tubulares (Lacy e Schmidt-Nielsen, 1979), já que, uma vez filtradas pelo glomérulo, a Hb e a mioglobina são reabsorvidas pelas células epiteliais no túbulo proximal e heme é então liberado no intracelular. A enzima anti-inflamatória heme-oxigenase 1 (HO1) catalisa a degradação parcial do heme, liberando ferro livre intracelular (Martines et al., 2013), promovendo, então, lesão tubular.

Chan et al., 2000, estudando as alterações morfológicas em rins de ratos após o uso de rHBOC, perceberam que elas são diferentes das encontradas após lesão de isquemia e reperfusão. Os autores sugeriram que a lesão renal seja decorrente da liberação de heme. Heme contém íon ferro, o qual, quando livre, pode promover reações de oxidação e formação de radicais livres, como a peroxidação de lipídeos, atuando como catalizador na formação de radicais hidroxila, de agregados proteicos, com consequente lesão tecidual (Rohlf et al., 1998; Tsai et al., 2006). O segmento S1 dos túbulos proximais é o segmento mais atingido após a liberação de heme. Nas lâminas desta atual pesquisa, também pode ser observado que a área mais atingida é a área cortical e, em especial, os túbulos proximais, o que pode ser indicativo de lesão relacionada ao heme e

não isquemia ou alterações de fluxo (Beerli et al., 1995).

O grupo controle não apresentou nenhum tipo de alteração morfológica, sugerindo então que todos os achados são, sim, referentes à solução infundida e não relacionados ao método. O Gbeth apesar de não apresentar diferença quanto a lesão renal se comparado ao grupo controle, é um grupo pequeno e, portanto, seus resultados têm significado restrito, especialmente se for levado em conta que um animal morreu antes mesmo das 72 horas.

PolyHeme (Hb polimerizada, Laboratório *Northfield*), uma solução carreadora em fase III (Moore et al., 2009), tem sua meia-vida em torno de 24h enquanto estas soluções estudadas têm uma meia-vida em torno de 60 minutos. Clinicamente, essa diferença é significativa. Com uma meia-vida maior, o heme livre seria filtrado em concentrações menores, fato desejado já que a toxicidade do heme é dose-dependente (Chan et al., 2000). A adição de “polyethylene glycol” (PEG) e “polylactide” (PLA) aumentou a meia-vida consideravelmente, e quando estes composto foram utilizados, também não se observou lesão renal (Conover et al., 1997; Malhotra et al., 2003; Liu e Chang, 2008).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS A MODO DE CONCLUSÃO

As soluções estudadas causaram lesão renal. As conclusões quanto ao RFG são limitadas pois este é o primeiro estudo a avaliar RFG com FITC-S em hamsters. Outros fatores limitantes são o uso de um grupo controle para medida do RFG e o pequeno número de animais. As alterações de D, velocidade e fluxo não foram uniformes. O aumento da PAM sem alterações uniformes da microcirculação sugere que esse aumento seja decorrente de alterações em vasos de maior calibre. Outras pesquisas deverão ser desenvolvidas, com número maior de animais, para corroborar os achados ora apresentados.

8 REFERÊNCIAS

Abraham B, Hicks W, Jia Y, Baek JH, Miller JL, Alayash AI. Isolated Hb Providence beta82Asn and beta82Asp fractions are more stable than native HbA(0) under oxidative stress conditions. *Biochemistry*. 2011;50(45):9752-66.

Abramoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*. 2004;11(7):36-42.

Beerli R, Symon Z, Brezis M, Ben-Sasson SA, Baehr PH, Rosen S, et al. Rapid DNA fragmentation from hypoxia along the thick ascending limb of rat kidneys. *Kidney Int*. 1995;47(6):1806-10.

Belcher JD, Young M, Chen C, Nguyen J, Burhop K, Tran P, et al. MP4CO, a pegylated hemoglobin saturated with carbon monoxide, is a modulator of HO-1, inflammation, and vaso-occlusion in transgenic sickle mice. *Blood*. 2013;122(15):2757-64.

Blackbourne LH, Baer DG, Eastridge BJ, Kheirabadi B, Bagley S, Kragh JF, Jr., et al. Military medical revolution: prehospital combat casualty care. *J Trauma Acute Care Surg*. 2012;73(6 Suppl 5):S372-7.

Blundell J. Experiments on the Transfusion of Blood by the Syringe. *Med Chir Trans*. 1818;9(Pt 1):56-92.

Blundell J. Observation on transfusion of blood. *Lancet*. 1829;12(302):321-4.

Blundell J. Some account of a Case of Obstinate Vomiting, in which an attempt was made to prolong Life by the Injection of Blood into the Veins. *Med Chir Trans*. 1819;10(Pt 2):296-311.

Bolton-Maggs P, Poles D. Participation in UK Haemovigilance Reporting 2014. Disponível em: <<http://www.shotuk.org/wp-content/uploads/report-2014.pdf>>. Acesso em: 19/06/2016.

- Bonaventura J, Bonaventura C, Sullivan B, Ferruzzi G, McCurdy PR, Fox J, et al. Hemoglobin providence. Functional consequences of two alterations of the 2,3-diphosphoglycerate binding site at position beta 82. *J Biol Chem*. 1976;251(23):7563-71.
- Bunn HF, Jandl JH. Exchange of heme among hemoglobins and between hemoglobin and albumin. *J Biol Chem*. 1968;243(3):465-75.
- Burhop K, Gordon D, Estep T. Review of hemoglobin-induced myocardial lesions. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 2004;32(3):353-74.
- Cabrales P. Low dose nitrite enhances perfusion after fluid resuscitation from hemorrhagic shock. *Resuscitation*. 2009;80(12):1431-6.
- Chan WL, Tang NL, Yim CC, Lai FM, Tam MS. New features of renal lesion induced by stroma free hemoglobin. *Toxicol Pathol*. 2000;28(5):635-42.
- Chang TM. From Hemoglobin Based Oxygen Carrier to Oxygen Therapeutics, Blood Substitutes, Nanomedicine and Artificial Cells. In: Kim HW, Greenburg AG, editors. *Hemoglobin-Based Oxygen Carriers as Red Cell Substitutes and Oxygen Therapeutics*. New York: Springer; 2013. p. 3-26.
- Chang TM. Semipermeable Microcapsules. *Science*. 1964;146(3643):524-5.
- Chang TM. Stabilisation of enzymes by microencapsulation with a concentrated protein solution or by microencapsulation followed by cross-linking with glutaraldehyde. *Biochem Biophys Res Commun*. 1971;44(6):1531-6.
- Conover CD, Linberg R, Gilbert CW, Shum KL, Shorr RG. Effect of polyethylene glycol conjugated bovine hemoglobin in both top-load and exchange transfusion rat models. *Artif Organs*. 1997;21(10):1066-75.
- DeVenuto F, Zegna A. Blood exchange with pyridoxalated and polymerized hemoglobin solution. *Surg Gynecol Obstet*. 1982;155(3):342-6.

- Doherty DH, Doyle MP, Curry SR, Vali RJ, Fattor TJ, Olson JS, et al. Rate of reaction with nitric oxide determines the hypertensive effect of cell-free hemoglobin. *Nat Biotechnol.* 1998;16(7):672-6.
- Dou Y, Mailliet DH, Eich RF, Olson JS. Myoglobin as a model system for designing heme protein based blood substitutes. *Biophys Chem.* 2002;98(1-2):127-48.
- Dudziak R, Bonhard K. The development of haemoglobin preparations for various indications. *Anaesthesist.* 1980;29(4):181-9.
- Endrich B, Asaishi K, Gotz A, Messmer K. Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med (Berl).* 1980;177(2):125-34.
- Fatalities Reported to FDA Following Blood Collection and Transfusion. Annual Summary for Fiscal Year 2014. 2014. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/ReportaProblem/TransfusionDonationFatalities/UCM459461.pdf>>. Acesso em: 18/06/2016.
- Gundersen SI, Chen G, Palmer AF. Mathematical model of NO and O₂ transport in an arteriole facilitated by hemoglobin based O₂ carriers. *Biophys Chem.* 2009;143(1-2):1-17.
- Hayashi A, Stamatoyannopoulos G, Yoshida A, Adamson J. Haemoglobin Rainier: beta-145 (HC2) tyrosine leads to cysteine and haemoglobin Bethesda: beta-145 (HC2) tyrosine leads to histidine. *Nat New Biol.* 1971;230(17):264-7.
- Huang H, Olsen KW. Thermal stabilities of hemoglobins crosslinked with different length reagents. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 1994;22(3):719-24.
- Intaglietta M, Silverman NR, Tompkins WR. Capillary flow velocity measurements in vivo and in situ by television methods. *Microvasc Res.* 1975;10(2):165-79.
- Intaglietta M, Tompkins WR. On-line measurement of microvascular dimensions by television microscopy. *J Appl Physiol.* 1972;32(4):546-51.

- 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(3):198-204.
- Kawashima I, Arima K, Hanada T, Harano T, Harada K, Matsuoka Y, et al. Hemoglobin Bethesda causing polycythemia in a Japanese family. *Intern Med*. 1994;33(4):242-7.
- Lacy ER, Schmidt-Nielsen B. Ultrastructural organization of the hamster renal pelvis. *Am J Anat*. 1979;155(4):403-23.
- Land WG. Transfusion-Related Acute Lung Injury: The Work of DAMPs. *Transfus Med Hemother*. 2013;40(1):3-13.
- Lipowsky HH, Zweifach BW. Application of the "two-slit" photometric technique to the measurement of microvascular volumetric flow rates. *Microvasc Res*. 1978;15(1):93-101.
- Liu ZC, Chang TM. Effects of PEG-PLA-nano artificial cells containing hemoglobin on kidney function and renal histology in rats. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 2008;36(5):421-30.
- Loeb A, McIntosh LJ, Raj NR, Longnecker D. Regional vascular effects of rHb1.1, a hemoglobin-based oxygen carrier. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1997;30(6):703-10.
- Looker D, Abbott-Brown D, Cozart P, Durfee S, Hoffman S, Mathews AJ, et al. A human recombinant haemoglobin designed for use as a blood substitute. *Nature*. 1992;356(6366):258-60.
- Looker D, Mathews AJ, Neway JO, Stetler GL. Expression of recombinant human hemoglobin in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol*. 1994;231:364-74.
- Malhotra AK, Kelly ME, Miller PR, Hartman JC, Fabian TC, Proctor KG. Resuscitation with a novel hemoglobin-based oxygen carrier in a Swine model of uncontrolled perioperative hemorrhage. *J Trauma*. 2003;54(5):915-24.

- Martines AM, Masereeuw R, Tjalsma H, Hoenderop JG, Wetzels JF, Swinkels DW. Iron metabolism in the pathogenesis of iron-induced kidney injury. *Nat Rev Nephrol*. 2013;9(7):385-98.
- Mollan TL, Abraham B, Strader MB, Jia Y, Lozier JN, Olson JS, et al. Familial secondary erythrocytosis due to increased oxygen affinity is caused by destabilization of the T state of hemoglobin Brigham ($\alpha(2)\beta(2)(\text{Pro100Leu})$). *Protein Sci*. 2012;21(10):1444-55.
- Moo-Penn WF, Jue DL, Bechtel KC, Johnson MH, Schmidt RM. Hemoglobin Providence. A human hemoglobin variant occurring in two forms in vivo. *J Biol Chem*. 1976;251(23):7557-62.
- Moore EE, Moore FA, Fabian TC, Bernard AC, Fulda GJ, Hoyt DB, et al. Human polymerized hemoglobin for the treatment of hemorrhagic shock when blood is unavailable: the USA multicenter trial. *J Am Coll Surg*. 2009;208(1):1-13.
- Natanson C, Kern SJ, Lurie P, Banks SM, Wolfe SM. Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis. *JAMA*. 2008;299(19):2304-12.
- Njoku M, St Peter D, Mackenzie CF. Haemoglobin-based oxygen carriers: indications and future applications. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2015;76(2):78-83.
- Novaretti MCZ. Importância dos carreadores de oxigênio livre de células. *Rev Bras Hematol Hemater*. 2007;29(4):394-405.
- Olofsson CI, Gorecki AZ, Dirksen R, Kofranek I, Majewski JA, Mazurkiewicz T, et al. Evaluation of MP4OX for prevention of perioperative hypotension in patients undergoing primary hip arthroplasty with spinal anesthesia: a randomized, double-blind, multicenter study. *Anesthesiology*. 2011;114(5):1048-63.
- Olson JS, Foley EW, Rogge C, Tsai AL, Doyle MP, Lemon DD. No scavenging and the hypertensive effect of hemoglobin-based blood substitutes. *Free Radic Biol Med*. 2004;36(6):685-97.

- Olson JS, Gibson QH. The functional properties of hemoglobin Bethesda (2 2 145His). *J Biol Chem*. 1972;247(11):3662-70.
- Paller MS. Hemoglobin- and myoglobin-induced acute renal failure in rats: role of iron in nephrotoxicity. *Am J Physiol*. 1988;255(3 Pt 2):F539-44.
- Palmer AF, Intaglietta M. Blood substitutes. *Annu Rev Biomed Eng*. 2014;16:77-101.
- Park YK, Abuchowski A, Davis S, Davis F. Pharmacology of Escherichia coli-L-asparaginase polyethylene glycol adduct. *Anticancer Res*. 1981;1(6):373-6.
- Przybelski RJ, Daily EK, Kisicki JC, Mattia-Goldberg C, Bounds MJ, Colburn WA. Phase I study of the safety and pharmacologic effects of diaspirin cross-linked hemoglobin solution. *Crit Care Med*. 1996;24(12):1993-2000.
- Rohlfes RJ, Bruner E, Chiu A, Gonzales A, Gonzales ML, Magde D, et al. Arterial blood pressure responses to cell-free hemoglobin solutions and the reaction with nitric oxide. *J Biol Chem*. 1998;273(20):12128-34.
- Rosenberger C, Rosen S, Paliege A, Heyman SN. Pimonidazole adduct immunohistochemistry in the rat kidney: detection of tissue hypoxia. *Methods Mol Biol*. 2009;466:161-74.
- Sakai H, Hara H, Yuasa M, Tsai AG, Takeoka S, Tsuchida E, et al. Molecular dimensions of Hb-based O(2) carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(3):H908-15.
- Schock-Kusch D, Sadick M, Henninger N, Kraenzlin B, Claus G, Kloetzer HM, et al. Transcutaneous measurement of glomerular filtration rate using FITC-sinistrin in rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(10):2997-3001.
- Schreiber A, Shulhevich Y, Geraci S, Hesser J, Stsepankou D, Neudecker S, et al. Transcutaneous measurement of renal function in conscious mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;303(5):F783-8.

- Shander A, Hofmann A, Ozawa S, Theusinger OM, Gombotz H, Spahn DR. Activity-based costs of blood transfusions in surgical patients at four hospitals. *Transfusion*. 2010;50(4):753-65.
- Snyder SR, Welty EV, Walder RY, Williams LA, Walder JA. HbXL99 alpha: a hemoglobin derivative that is cross-linked between the alpha subunits is useful as a blood substitute. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(20):7280-4.
- Terada N, Ohno N, Saitoh S, Ohno S. Immunohistochemical detection of hypoxia in mouse liver tissues treated with pimonidazole using "in vivo cryotechnique". *Histochem Cell Biol*. 2007;128(3):253-61.
- Tsai AG, Cabrales P, Manjula BN, Acharya SA, Winslow RM, Intaglietta M. Dissociation of local nitric oxide concentration and vasoconstriction in the presence of cell-free hemoglobin oxygen carriers. *Blood*. 2006;108(10):3603-10.
- Tsai AG, Friesenecker B, McCarthy M, Sakai H, Intaglietta M. Plasma viscosity regulates capillary perfusion during extreme hemodilution in hamster skinfold model. *Am J Physiol*. 1998;275(6 Pt 2):H2170-80.
- Tsai AG, Intaglietta M, Sakai H, Delpy E, La Rochelle CD, Rousselot M, et al. Microcirculation and NO-CO studies of a natural extracellular hemoglobin developed for an oxygen therapeutic carrier. *Curr Drug Discov Technol*. 2012;9(3):166-72.
- Varnado CL, Mollan TL, Birukou I, Smith BJ, Henderson DP, Olson JS. Development of recombinant hemoglobin-based oxygen carriers. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(17):2314-28.
- Vermeulen Windsant IC, de Wit NC, Sertorio JT, van Bijnen AA, Ganushchak YM, Heijmans JH, et al. Hemolysis during cardiac surgery is associated with increased intravascular nitric oxide consumption and perioperative kidney and intestinal tissue damage. *Front Physiol*. 2014;5:340.
- Von Stark G. Die resorborbarkeit des haimatins und die bedeutungder hemoglobinpreparate. *Dtsche Med Wochenschr*. 1898;24:805-8.

Weiskopf RB. Hemoglobin-based oxygen carriers: compassionate use and compassionate clinical trials. *Anesth Analg*. 2010;110(3):659-62.

Weiskopf RB. Hemoglobin-based oxygen carriers: disclosed history and the way ahead: the relativity of safety. *Anesth Analg*. 2014;119(4):758-60.

Wong JT. Rightshifted dextran-hemoglobin as blood substitute. *Biomater Artif Cells Artif Organs*. 1988;16(1-3):237-45.

Yu B, Bloch KD, Zapol WM. Hemoglobin-based red blood cell substitutes and nitric oxide. *Trends Cardiovasc Med*. 2009;19(3):103-7.

Yu B, Shahid M, Egorina EM, Sovershaev MA, Raher MJ, Lei C, et al. Endothelial dysfunction enhances vasoconstriction due to scavenging of nitric oxide by a hemoglobin-based oxygen carrier. *Anesthesiology*. 2010;112(3):586-94.

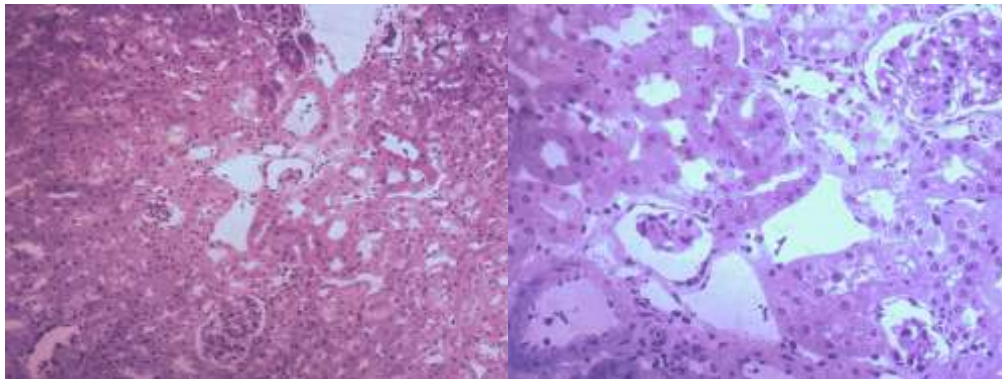
Zollner FG, Schock-Kusch D, Backer S, Neudecker S, Gretz N, Schad LR. Simultaneous measurement of kidney function by dynamic contrast enhanced MRI and FITC-sinistrin clearance in rats at 3 tesla: initial results. *PLoS One*. 2013;8(11):e79992.

Zou S, Musavi F, Notari EPt, Fang CT, Group AR. Changing age distribution of the blood donor population in the United States. *Transfusion*. 2008;48(2):251-7.

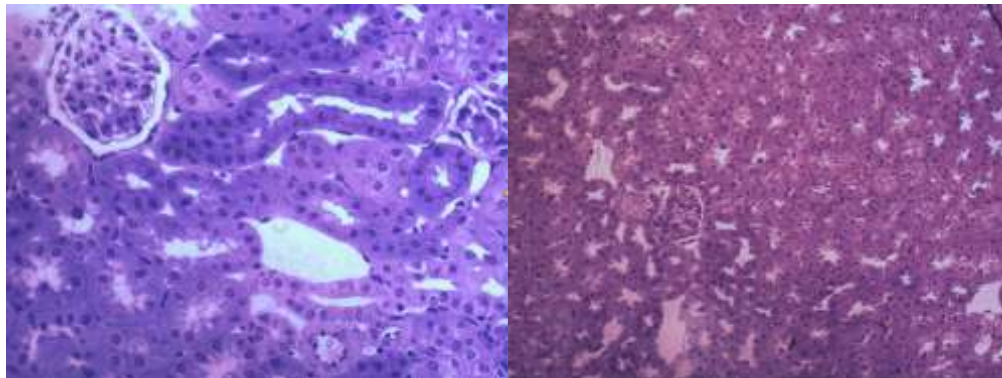
BETHESDA

Intensidade de lesão grau 0 – sem lesão aparente

Hamster C308

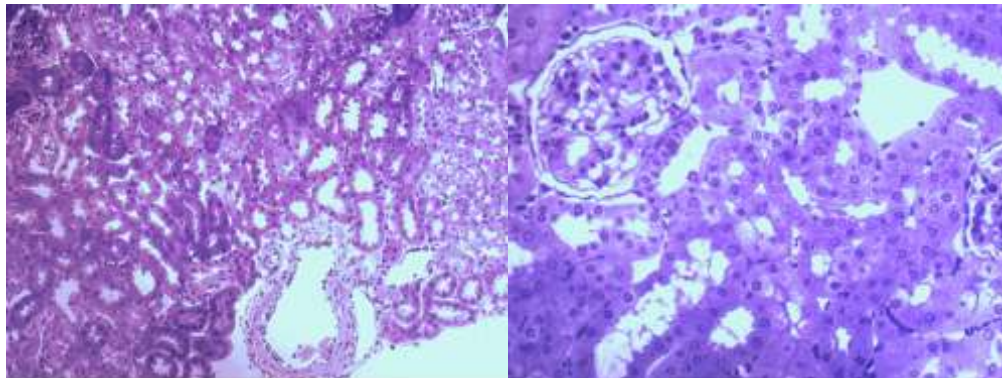


Hamster C302



Intensidade Grau 1 – dilatação tubular

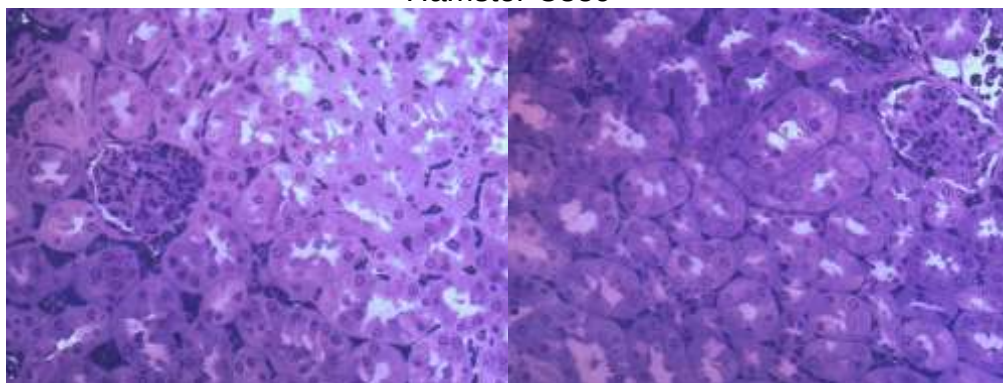
Hamster C312



PROVIDENCE

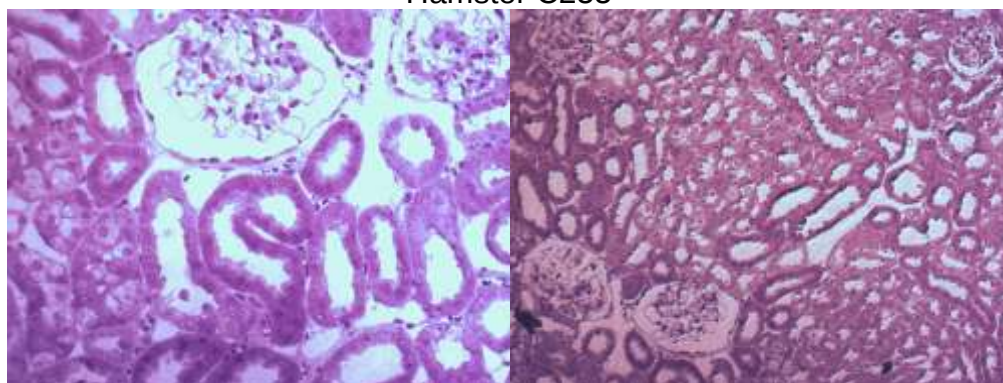
Intensidade Grau 0 - sem lesão aparente

Hamster C359



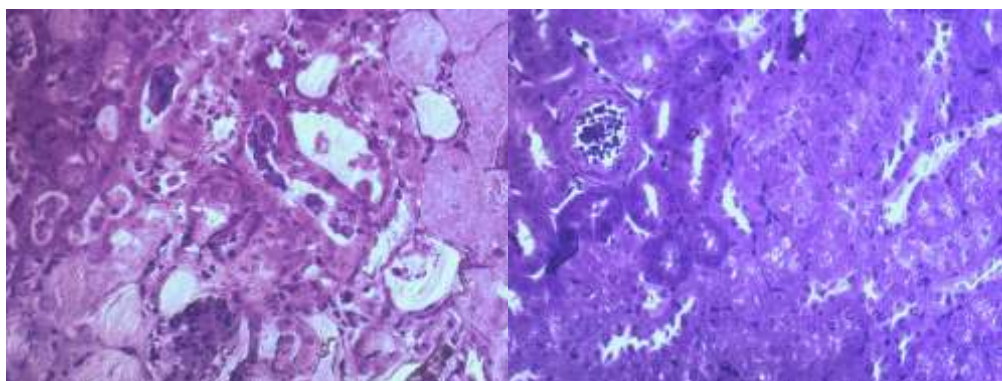
Intensidade Grau 1 – Dilatação tubular

Hamster C255

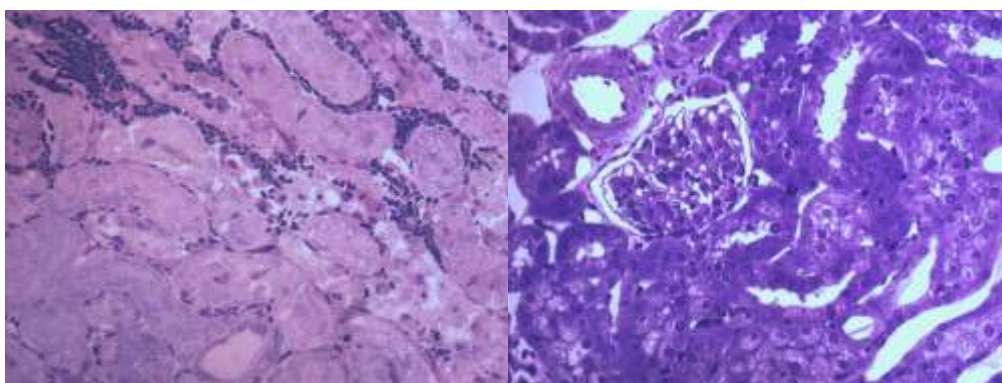


Intensidade Grau 3 – Lesão tubular com destruição da estrutura adjacente

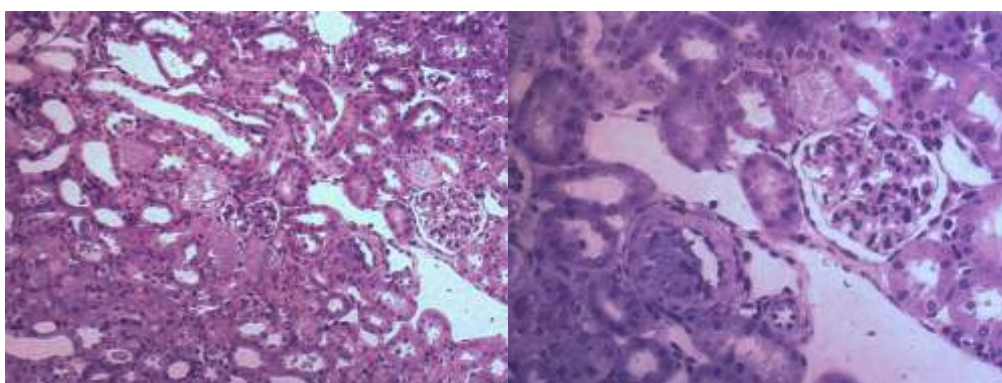
Hamster C258



Hamster C265



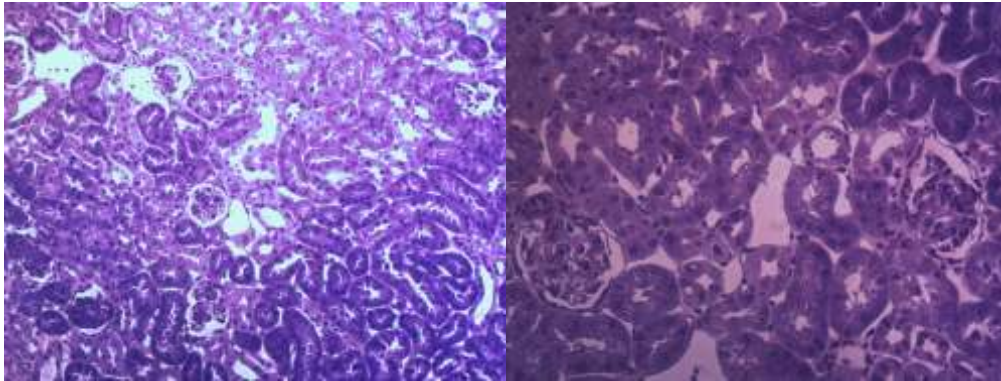
Hamster C266



0.1WT

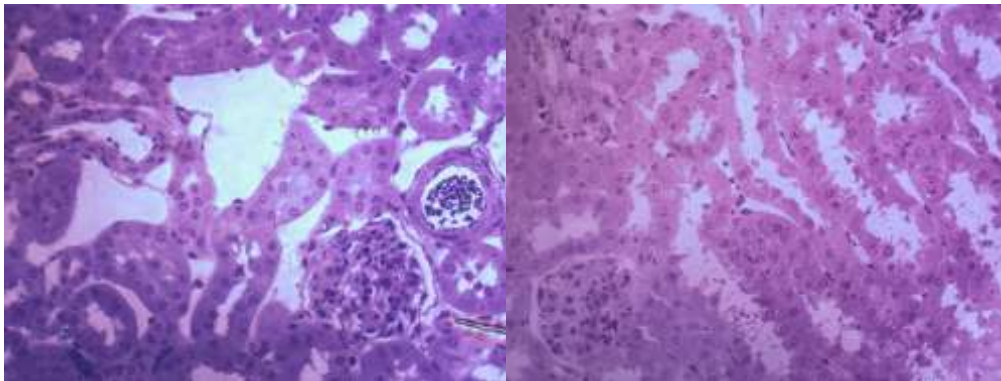
Intensidade Grau 1 – Dilatação tubular

Hamster C234

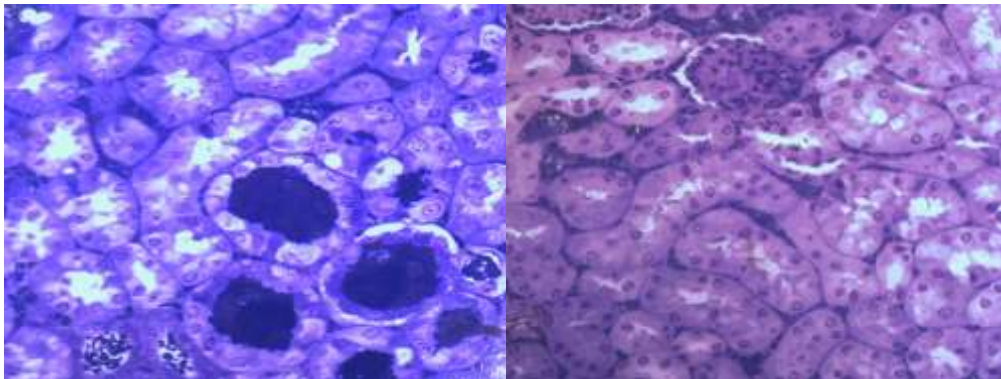


Intensidade Grau 2 – Necrose tubular com preservação das estruturas adjacentes

Hamster C286

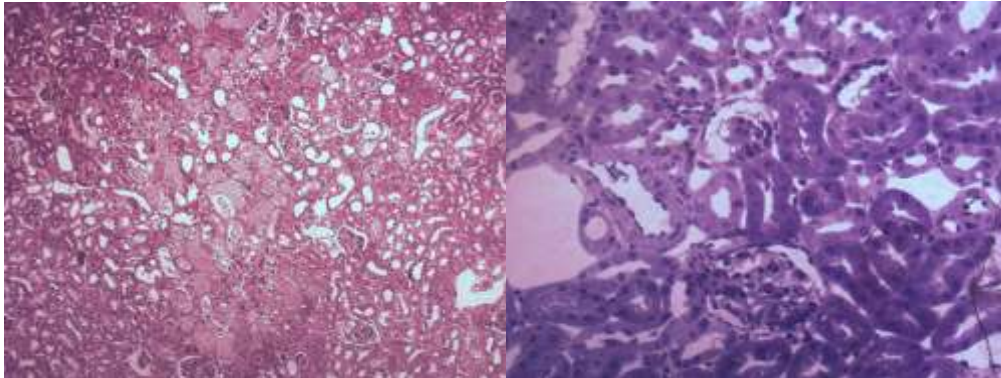


Hamster C232

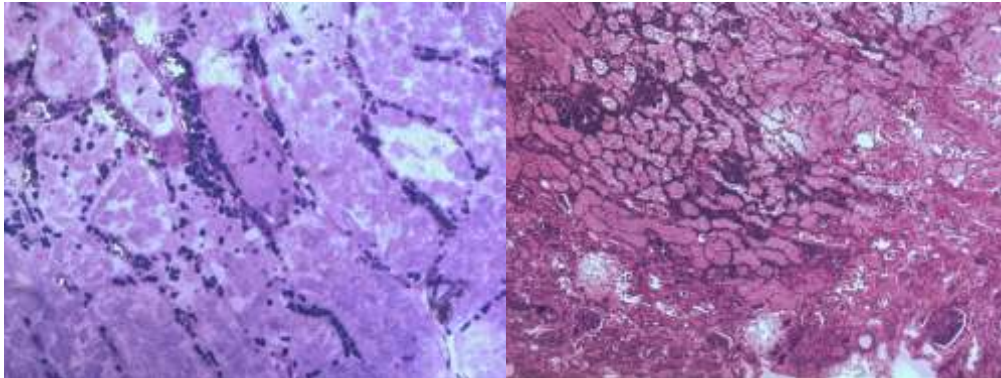


Intensidade Grau 3 – Lesão tubular com destruição da estrutura adjacente

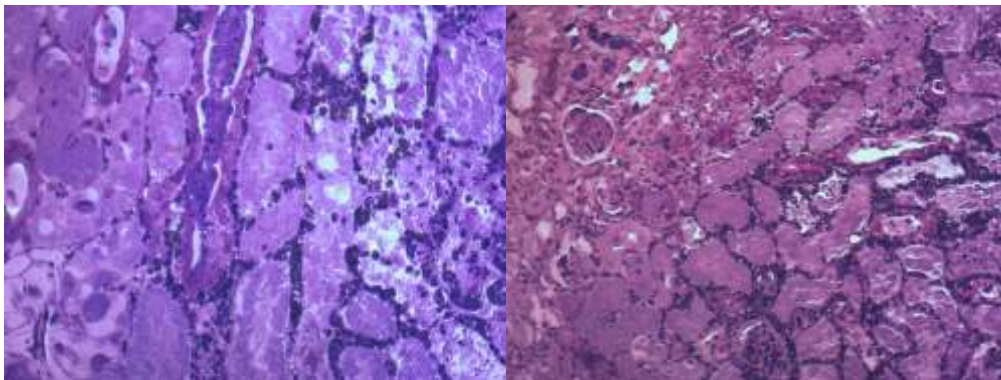
Hamster C237



Hamster C290



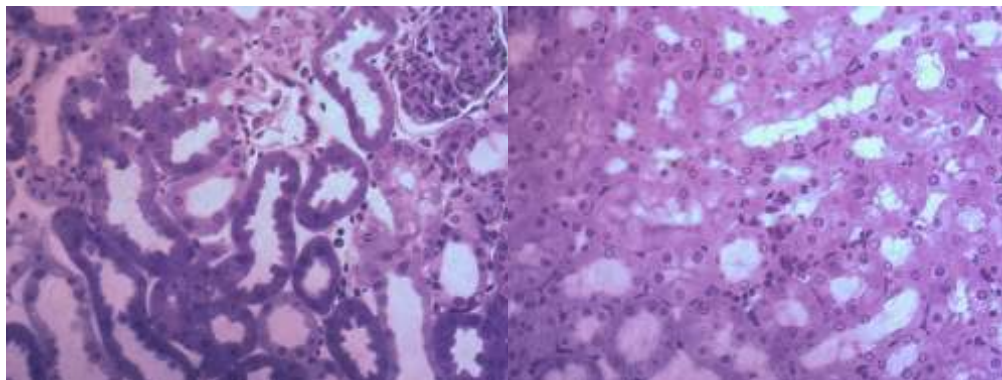
Hamster C293



SOLUÇÃO 3001

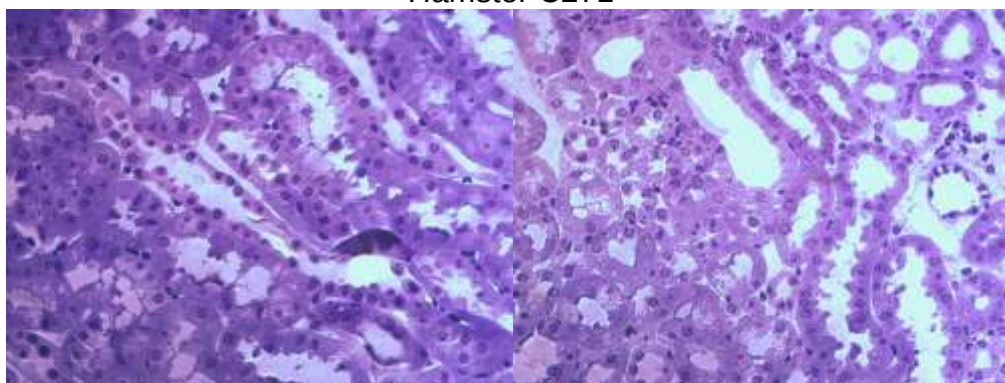
Intensidade Grau 1 – Dilatação tubular

Hamster C282

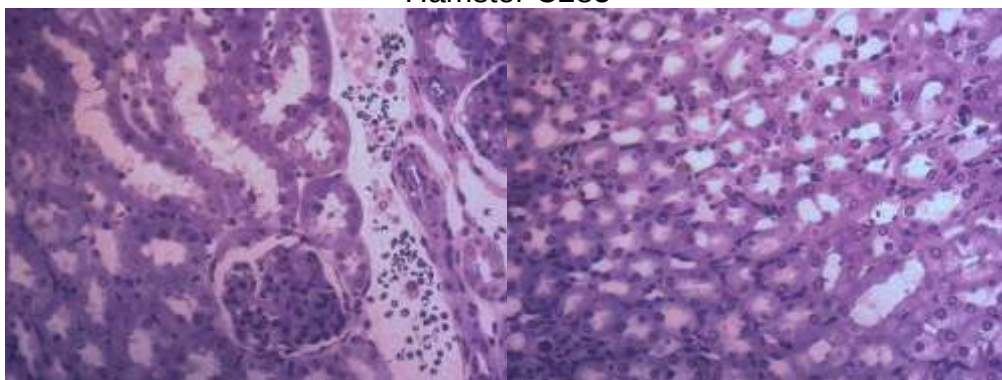


Intensidade Grau 2 – Necrose tubular com preservação das estruturas adjacentes

Hamster C271



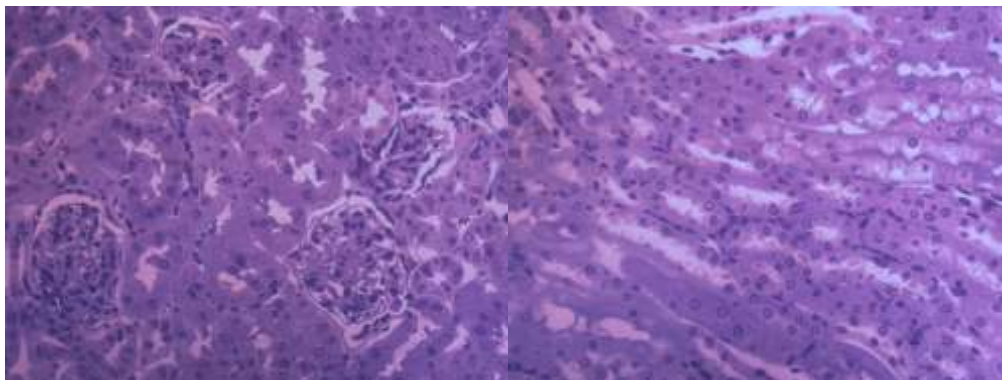
Hamster C285



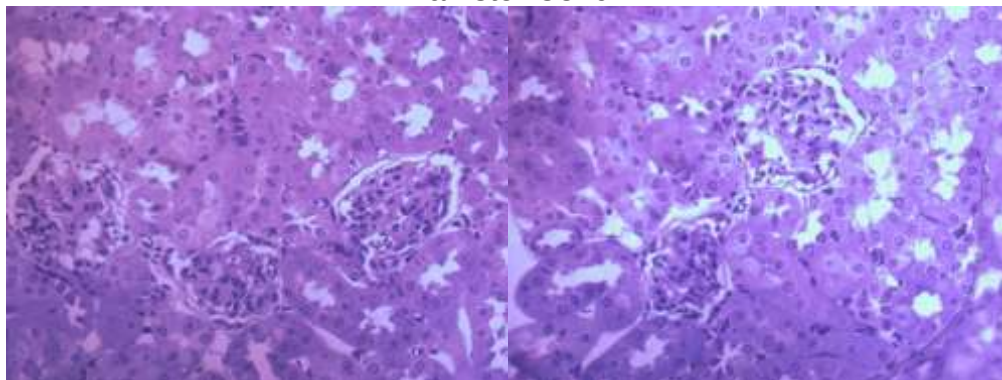
SOLUÇÃO 3011

Intensidade de lesão grau 0 – sem lesão aparente

Hamster C315

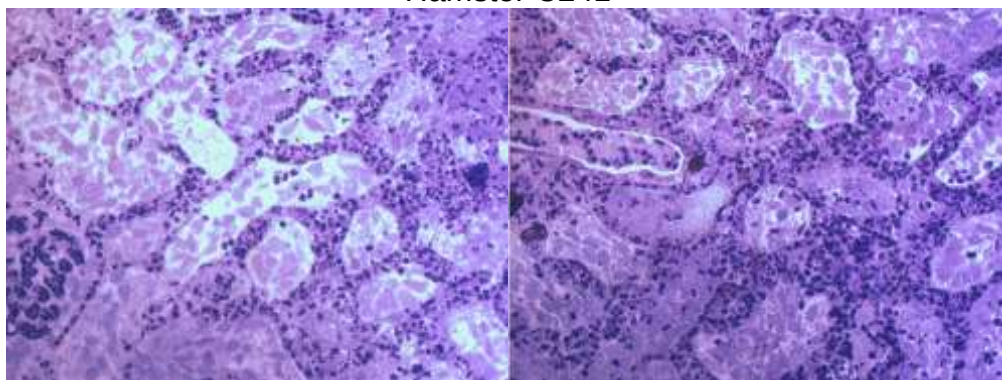


Hamster C319

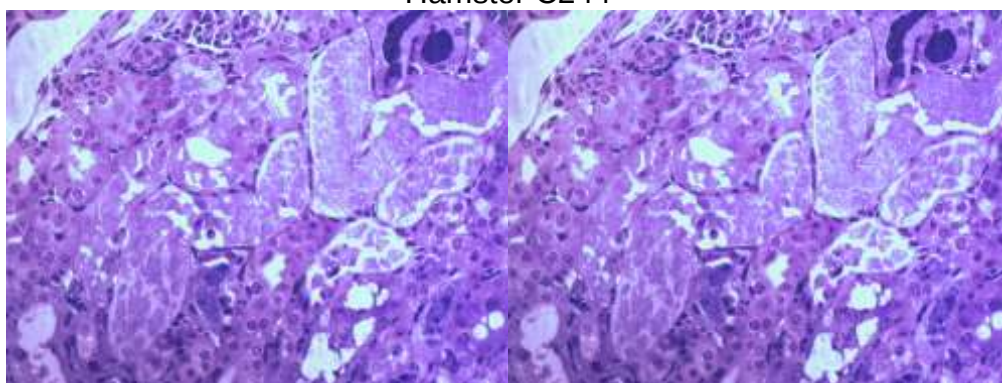


Intensidade Grau 3 – Lesão tubular com destruição da estrutura adjacente

Hamster C241



Hamster C244



Hamster C313

