

Cipriano da Cruz Formiga

**Comparação entre as modalidades de isquemia renal
isotérmica seletiva, não-seletiva e intermitente em coelhos**

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

Programa de: Urologia

Orientador: Prof. Dr. Anuar Ibrahim Mitre

(Versão corrigida. Resolução 5890 de 20 de
dezembro de 2010. Versão original disponível
na Biblioteca da Faculdade de Medicina USP)

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Formiga, Cipriano da Cruz

Comparação entre as modalidades de isquemia renal isotérmica seletiva, não-seletiva e intermitente em coelhos / Cipriano da Cruz Formiga. -- São Paulo, 2011.

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

Orientador: Anuar Ibrahim Mitre.

Descritores: 1.Isquemia quente 2.Clampeamento 3.Rim/cintilografia
4.Tecnécio Tc 99m mertiatida 5.Coelhos

USP/FM/DBD-100/11

Aos meus pais, **Chagas** e **Sônia**,
e aos meus irmãos,
Ricardo e **Nirvana**, pelo carinho, apoio e amor
que me proporcionaram sempre.

Às minhas queridas, **Betina** e **Clara**,
esposa e filha,
razão da minha felicidade,
por todo amor e alegria com que preenchem minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Miguel Srougi, Professor Titular da Disciplina de Urologia da Faculdade de Medicina da USP, pela oportunidade e pelas condições proporcionadas à realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Homero Bruschini, Coordenador da Pós-graduação da Disciplina de Urologia da FMUSP, pelo apoio em todas as fases desta tese.

Ao Professor Doutor Carlos Alberto Buchipguel, Diretor do Serviço de Medicina Nuclear do InRad do HCFMUSP, por toda a colaboração com o desenvolvimento deste estudo.

Ao Doutor Fábio Luiz Navarro Marques e ao Mestre Adriano Radin, pelo apoio, ajuda incondicional e, acima de tudo, pela amizade durante todo o projeto.

Aos Professores Doutores Francisco Tibor Dénes, Cássio Andreoni Ribeiro e José Roberto Colombo Jr., membros da banca do Exame de Qualificação, pelo auxílio valioso com suas correções, críticas e sugestões.

À Doutora Mabel Tatty Medeiros Fracassi, por sua preciosa ajuda com a análise anátomo-patológica dos espécimes.

Aos queridos amigos, Drs. Carlos Alberto dos Santos jr. e Marcos Alessandro Baeza, pela amizade e presença constante na minha vida.

Aos amigos, Drs. José Everton de Castro, Marcelo Zerati, Celso Heitor de Freitas Jr. e Marcus Vinícius Queiroz, pelo apoio mútuo nesta caminhada da pós-graduação.

À Divisão de Clínica Urológica e ao Serviço de Medicina Nuclear da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, professores, funcionários e residentes.

Ao Senhor Ítalo Medeiros de Azevedo, pelo auxílio na análise estatística dos dados.

À Sra. Ságena Cruz da Costa, pela revisão gramatical realizada.

À Sra. Elisa Cruz, secretária da Pós-graduação da Disciplina de Urologia, por toda a sua disponibilidade, dedicação, empenho e ajuda durante toda a minha pós-graduação.

Agradecimentos especiais

Ao Professor Doutor Anuar Ibrahim Mitre, meu orientador, por todo o conhecimento, paciência e amizade dedicados a mim. Com certeza, um “orientador” no mais amplo significado da palavra.

Ao Professor Doutor Lísias Nogueira Castilho, co-orientador desta tese, a quem devo toda minha formação urológica, meu mentor e amigo, pelo estímulo constante, orientações e oportunidades que permitiram a realização deste sonho.

**Este projeto foi financiado pela
Fundação de Amparo à Pesquisa
do Estado de São Paulo – FAPESP,
Processo N°- 2008/58420-7.**

“A vida é breve,
a ciência é perene,
a oportunidade é ardilosa,
a experimentação é perigosa,
o julgamento é difícil.”

Hipócrates

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação – SBD/FMUSP; 2005.

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

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Fisiopatologia da lesão isquêmica renal	4
1.2	Alterações histopatológicas da isquemia renal	7
1.3	Modalidades de isquemia renal.....	8
1.4	Modalidades de clampeamento do pedículo renal	13
2	OBJETIVOS	17
3	MÉTODOS	19
3.1	Desenho do estudo	20
3.2	Projeto-piloto	22
3.3	Análise cintilográfica	22
3.4	Critérios de inclusão ao método.....	25
3.5	Interpretação dos resultados cintilográficos	25
3.6	Procedimento cirúrgico	27
3.7	Sacrifício	29
3.8	Análise histopatológica	30
3.9	Análise estatística	31
4	RESULTADOS	32
4.1	Análise cintilográfica	33
4.2	Análise histopatológica	36
4.3	Análise laboratorial.....	37
5	DISCUSSÃO	40
6	CONCLUSÃO	48
7	REFERÊNCIAS	50

APÊNDICES

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%: por cento

>: maior que

AA: ácido aracdônico

ANOVA: análise de variância

ADP: adenosina difosfato

AMP: adenosina monofosfato

ATP: adenosina trifosfato

CAPPesq: Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Ca⁺⁺: íon cálcio

cm: centímetro

CI: cilindros intratubulares

Cr: creatinina

COBEA: Colégio Brasileiro em Experimentação Animal

D10^{''}: desclameamento de 10 segundos

DLT: dilatação tubular

ed.: edição

et al: e outros

FMUSP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

h: hora

HX: hipoxantina

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

H & E: hematoxilina – eosina

InRad: Instituto de Radiologia

IRA: insuficiência renal aguda

K⁺: íon potássio

KCL: cloreto de potássio

kg: quilograma

LEAP: *low-energy all-purpose*

MAG₃: mercaptoacetiltriglicina

MBq: megabecquerel

mg: miligrama

min: minuto

MÍN.: Mínimo

mL: mililitro

Na⁺: íon sódio

NC: necrose celular

ng/mL: nanogramas por mililitro

NP: nefrectomia parcial

NPL: nefrectomia parcial laparoscópica

NTA: Necrose Tubular Aguda

p.: página

PGE1: prostaglandina E1

PGE2: prostaglandina E2

PIP: *Portable Image Processing*

pH: potencial hidrogeniônico

PLA: fosfolipase A

pO₂: pressão parcial de oxigênio

ROI: *regions of interest*

SD: superóxido desmutase

SPSS: *Statistical Package for Social Science*

^{99m}Tc: tecnécio-99

VC: vacuolização celular

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Escala semiquantitativa do grau de necrose tubular aguda.....30
- Tabela 2 – Dados descritivos e respectivos testes estatísticos para função renal esquerda, por tipo de tratamento, segundo o período, definidos por cintilografia34
- Tabela 3 – Dados descritivos e respectivos testes estatísticos para creatinina sérica, por tipo de tratamento, segundo o período38

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Protocolo experimental: A) Cirurgia e B) Exames: Grupo 1 - controle, grupo 2 - clampeamento arterial seletivo, grupo 3 - clampeamento arteriovenoso, grupo 4 - clampeamento arteriovenoso intermitente, D10” – desclampeamento por 10 segundos, MAG3 – cintilografia renal com MAG3 e Cr – dosagem sérica de creatinina.....21
- Figura 2 – Câmara de cintilação Siemens – LEM – com coelho posicionado para exame24
- Figura 3 – Monitor com os dados fornecidos pelo software Image J®224
- Figura 4 – Imagem da captação com ROI (*regions of interest*)26
- Figura 5 – Exemplo de estudo cintilográfico basal normal.....26
- Figura 6 – Artéria renal esquerda (setas) sem (A) e com clampe microcirúrgico (B)29
- Figura 7 – Gráfico descritivo da função renal esquerda por período, segundo os tipos de tratamento35
- Figura 8 – Exemplo de estudo cintilográfico alterado35
- Figura 9 – A) Glomérulo e túbulos contornados proximais normais. B) Alterações celulares após dano isquêmico: edema celular, perda da “borda-em-escova” e modificações nucleares (H & E – 40x)37
- Figura 10 – A) Presença de cilindros intratubulares, alteração importante na NTA. B) Presença de regeneração tubular: núcleos volumosos e citoplasmas basófilos. Atividade regenerativa com a presença de mitoses (H & E – 40x)37
- Figura 11 – Gráfico descritivo da creatinina, por período, segundo os tipos de tratamento.....39

RESUMO

Formiga CC. *Comparação entre as modalidades de isquemia renal isotérmica seletiva, não-seletiva e intermitente em coelhos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 58p.

INTRODUÇÃO: O limite de tempo de isquemia renal sem causar um dano permanente à função ainda é um questionamento pertinente na prática cirúrgica urológica. Algumas cirurgias requerem um campo cirúrgico menos sangrante, necessitando de uma interrupção temporária do fluxo sanguíneo para o parênquima renal através de clampeamento do pedículo. Este estudo objetivou avaliar qual técnica de clampeamento em isquemia isotérmica é superior, em termos de preservação da função renal. **MÉTODOS:** Neste estudo, foram utilizados 28 coelhos da raça *New Zealand* distribuídos em quatro grupos de forma randomizada e submetidos à laparotomia com interrupção do fluxo sanguíneo renal esquerdo, conforme grupo: grupo 1 - Controle, sem isquemia (4 animais), grupo 2 - Isquemia seletiva (8 animais), grupo 3 - Isquemia não-seletiva (8 animais) e grupo 4 - Isquemia não-seletiva intermitente (8 animais). Os animais foram submetidos à análises cintilográficas da função renal com mercaptoacetiltriglicina (MAG_3) e dosagens séricas de creatinina no pré-operatório, no primeiro, terceiro e sétimo dias pós-operatórios. Após 15 dias da cirurgia, os animais foram sacrificados e os rins submetidos à análise histológica. **RESULTADOS:** A análise cintilográfica da função renal mostrou que os três grupos submetidos à isquemia apresentaram um agravamento semelhante, nas primeiras 24 horas; não havendo diferença estatística entre eles no tocante a perda de função renal do rim esquerdo ($p= 0,165$), neste período. No exame do terceiro dia pós-operatório, houve diferença estatística ($p= 0,006$) entre os grupos não-seletivo (3) e o intermitente (4), mostrando uma superioridade do fator desclampeamento na proteção à função renal. No sétimo dia pós-operatório, o grupo do clampeamento seletivo (2) mostrou-se superior ($p < 0,001$) ao grupo não-seletivo (3), mas não apresentou diferença estatística em relação ao grupo intermitente (4). Este último, por sua vez, também apresentou-se superior ao grupo 3, com diferença estatística ($p < 0,001$). Após sete dias não foi observada diferença estatística entre os grupos 2 e 4. A histologia e a creatinina não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos isquêmicos. Do ponto de vista funcional, a isquemia seletiva e a intermitente foram superiores em relação a não-seletiva. **CONCLUSÃO:** O modelo utilizado neste estudo mostrou uma superioridade da isquemia isotérmica seletiva e da intermitente em relação a não-seletiva na proteção da função renal. Não houve diferença entre o clampeamento seletivo e o intermitente não-seletivo na função do rim.

Descritores: 1.Isquemia quente 2.Clampeamento 3.Rim/cintilografia
4.Tecnécio Tc 99m mertiatida 5.Coelhos

SUMMARY

FORMIGA CC. *Comparison among modalities of normothermic renal ischemia selective, non-selective and intermittent in rabbits* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011. 58p.

INTRODUCTION: The time limit of renal ischemia with no permanent damage to renal function still remains as a pertinent question in urologic surgical practice. Several procedures require a bloodless surgical field most of time needing an interruption of blood flow to the renal parenchyma and they can require hilum control and clamping. This study assessed which normothermic clamping technique is superior in order to preserve kidney function. **METHODS:** In this project, 28 New Zealand rabbits were distributed in four groups by randomization and submitted to laparotomy and blood flow interruption of left kidney: Group 1 - Control, no ischemia (four animals), Group 2 – Selective ischemia (eight animals), Group 3 – Nonselective ischemia (eight animals) e Group 4 – intermittent nonselective ischemia (eight animals). The animals were submitted to renal scintigraphy with mercaptoacetiltriglicin (MAG3) and serum creatinine analysis preoperatively and at days 1, 3 and 7 after left hilum clamping. The animals were submitted to nephrectomy and immediately sacrificed and the kidneys subjected to blinded evaluation by a nephropathologist. **RESULTS:** Renal scintigraphy showed equal damage in the three groups in first 24 hours, with no statistical difference in loss of left kidney function ($p= 0,165$) in this period. At third day examination, there was statistical difference ($p= 0,006$) between the nonselective group (3) and intermittent one (4), demonstrating a superiority of declamping factor in renal function protection. At seventh postoperative day, selective group (2) proved to be better ($p< 0,001$) than nonselective one (3), however there was not statistical difference between group 2 and the intermittent group (4). The intermittent clamping group was also superior to group 3 ($p< 0,001$). Histopathology and serum creatinine did not demonstrate statistical difference among groups. Functionally, selective and intermittent warm ischemia techniques are better than nonselective one. **CONCLUSION:** The model used in this study presented a superiority of selective clamping and intermittent arteriovenous clamping in shielding the renal function. No difference occurred between selective clamping and intermittent nonselective one.

Descriptors: 1.Warm ischemia 2.Clamping 3.Kidney/Radionuclide imaging 4.Tchnetium TC 99m mertiatide 5. Rabbits

1 INTRODUÇÃO

O questionamento sobre qual o limite de tempo que o rim suporta a uma interrupção do fluxo sanguíneo, sem prejuízo da sua função, ainda não tem resposta definitiva. No início do século XX, começaram os estudos para se determinar o período de isquemia que um rim suportaria sem apresentar perda irreversível em sua função ⁽¹⁾. A isquemia renal é utilizada não apenas nas cirurgias oncológicas, mas em inúmeros outros procedimentos como transplantes, cirurgias renovasculares e cirurgias para litíase ^(2;3).

Após 1933, com o início do transplante renal entre humanos por Yuri Voronoy ⁽⁴⁾, houve a necessidade do conhecimento do tempo limite de isquemia para que o rim não apresentasse perda de função e, portanto, aumentaram os experimentos científicos nesta linha de pesquisa. No caso dos doadores falecidos, foram desenvolvidas as soluções de preservação que ajudam a manter a viabilidade funcional renal por até 48 horas em alguns casos ^(5;6). Nos doadores vivos, dado o caráter eletivo, a isquemia é bem menor, pois em geral o órgão é perfundido e enxertado logo em seguida. Neste caso, são de relevante importância a experiência e a destreza da equipe cirúrgica na obtenção do menor tempo de isquemia possível ⁽⁷⁾.

As cirurgias ablativas parciais requerem um campo cirúrgico sem hemorragia, por questões de perda sanguínea e em razão da visibilização precisa das estruturas para permitir a retirada de tumores com uma margem

de segurança e síntese adequada das estruturas. Nestes casos, por questões técnicas, não são utilizadas soluções de preservação, mas apenas uma interrupção no fluxo sanguíneo para o parênquima renal.

Com o diagnóstico cada vez mais precoce de tumores renais graças à difusão do uso de exames de imagem, a indicação de cirurgias renais parciais passou a ser uma opção mais presente na prática cirúrgica. Mais de 60% das lesões renais diagnosticadas atualmente são incidentais e cerca de 39% de todos os tumores renais têm diâmetro de até quatro centímetros, sendo consideradas lesões adequadas para ressecções parciais, com preservação do restante do parênquima renal. A incidência de tumor renal está aumentando e seu tamanho médio está diminuindo ⁽⁸⁾. Estes procedimentos parciais tornaram-se mais rotineiros e passaram a ser feitos por laparoscopia ⁽⁹⁾. Pacientes, mesmo com lesões renais maiores e mais complexas, estão sendo submetidos à nefrectomia parcial laparoscópica (NPL) em centros avançados de laparoscopia. Até pouco tempo, apenas lesões até 4 cm (lesões T1a) tinham indicação para NPL, mas algumas publicações recentes já mostram séries com tumores renais também entre 4,1 e 7 cm (lesões T1b) e, ainda, lesões centrais ou hilares, sendo tratadas também por este método com bom resultado oncológico, em mãos de cirurgiões experientes ^(9;10). Nessas cirurgias, com preservação de parênquima, a interrupção do fluxo sanguíneo muitas vezes é necessária.

1.1 Fisiopatologia da lesão isquêmica renal

A isquemia renal é a principal causa da necrose tubular aguda (NTA) e por sua vez, da insuficiência renal aguda (IRA) em pacientes clínicos e cirúrgicos ⁽¹¹⁾. A incidência de IRA resultante de lesão por isquemia-reperfusão perfaz mais de 50% dos casos e apresenta índices de mortalidade geral a longo prazo entre 50 e 70%. Esta mortalidade pouco foi alterada ao longo dos últimos quinze anos apesar do desenvolvimento dos protocolos de tratamento clínico e das técnicas de diálise. Esta morbimortalidade demanda, cada vez, mais experimentos sobre a proteção contra a lesão isquêmica e preservação de função renal pós-operatória ⁽¹²⁾.

As alterações decorrentes da ausência de fluxo sanguíneo vão muito além da hipóxia. A falta de substratos metabólicos se soma à falta de oxigênio e leva à alterações bioquímicas, estruturais e genômicas nas células renais ⁽¹³⁾. Já foi bem descrito que em um rim em condições normais a oferta e o gasto de oxigênio diminuem proporcionalmente da região cortical para a medular, isto influenciado por inúmeros fatores como hematócrito, fluxo sanguíneo renal, grau de difusibilidade do oxigênio, pH e temperatura corpórea ⁽¹⁴⁾.

Durante a isquemia, algumas alterações metabólicas são evidenciadas e já bem descritas em experimentos prévios ⁽¹⁵⁾. De acordo com os modelos clássicos, a isquemia aguda leva à produção de radicais livres, liberação de citocinas inflamatórias e à ativação de mediadores da resposta imune inata, ocasionando dano tecidual. A principal alteração na

anóxia é a degradação dos estoques de adenosina trifosfato (ATP) e a queda na sua produção, levando ao acúmulo de adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP), este último, se convertendo em adenosina, inosina e hipoxantina (HX). Paralelo a isto, ocorre a queda dos gradientes de cálcio e eletrólitos, pois devido a falta de ATP, há a falência da bomba de sódio-potássio (Na^+/K^+), com o acúmulo de sódio intracelular e a saída de potássio da célula, além da perda de magnésio pela célula e influxo de cálcio e cloro, levando a uma perda do equilíbrio eletrolítico e edema celular importante ⁽¹⁶⁾.

O aumento do cálcio intracelular (Ca^{++}) leva à ativação de algumas proteases, em especial, a fosfolipase A (PLA) que causa lesão da membrana celular. Como o metabolismo anaeróbico se mantém, existe o acúmulo de lactato, levando à acidose que acarreta instabilidade da membrana lisossomal e liberação de enzimas lisossomais líticas, além de afetar a função de várias enzimas intracelulares ⁽¹⁷⁾.

Além da isquemia em si, a reperfusão tecidual também leva a uma série de alterações danosas já bem descritas por Cotterill et al, em 1990, e Grace et al, em 1994 ^(18;19). Como citamos, na isquemia ocorre a degradação do ATP e progressiva formação de AMP e sua transformação em hipoxantina com incremento do cálcio intracelular, ativação de proteases e produção de xantina-oxidase. Durante a reperfusão, o principal mecanismo de lesão é a oxidação da hipoxantina, levando à produção e ao acúmulo de radicais livres como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os superóxidos, em especial, pela ação da enzima superóxido desmutase (SD). O H_2O_2 reage

com o ferro livre produzindo o radical hidroxil, muito lesivo para a membrana celular. O ferro livre se apresenta aumentado a nível intracelular em situações de anaerobiose, servindo de substrato a este mecanismo de lesão de membrana. O radical hidroxil causa a lipoperoxidação das membranas celulares e ativa a cascata inflamatória do ácido aracdônico (AA) descrita por Grace et al ⁽¹⁹⁾, em 1994, levando a lesões endoteliais provocadas pela ativação de diversos marcadores inflamatórios, através da degradação do AA pela cicloxigenase como tromboxanos, prostaglandinas, especialmente a PGE1 e PGE2 e pela lipoxigenase produzindo os leucotrienos B4, C4, D4 e E4. Os radicais livres também estimulam a quimiotaxia e ativação de neutrófilos levando a um comprometimento importante da microcirculação, compondo também a lesão por reperfusão. Esta lesão endotelial faz com que as arteríolas renais mantenham um tônus aumentado, tornando-as mais sensíveis a fatores humorais vasoconstritores como angiotensina II, tromboxano A2, endotelina e leucotrienos, e com resposta diminuída a agentes vasodilatadores. Este desequilíbrio na regulação do fluxo sanguíneo contribui para a redução da taxa de filtração glomerular e perpetuação da insuficiência renal ⁽²⁰⁾.

Um outro mecanismo de lesão descrito por Welbourn et al, em 1991, é a inibição da enzima óxido nítrico sintetase, o que diminui a formação de óxido nítrico a partir da L-arginina, o qual teria um efeito protetor através da degradação dos superóxidos e ação vasodilatadora ⁽²¹⁾.

1.2 Alterações histopatológicas da isquemia renal

Algumas alterações são características da lesão isquêmica, como: edema celular e da “borda-em-escova” das células do túbulo contornado proximal, sendo estas últimas as células mais sensíveis à isquemia. Eventos bioquímicos provocados pela depleção de ATP, como perda da polaridade celular e a redistribuição da enzima Na^+/K^+ -ATPase, na porção apical das células tubulares após ruptura do citoesqueleto, são considerados irreversíveis à célula.

Outros achados microscópicos considerados fatais à célula são as calcificações mitocondriais, picnose nuclear, marginalização da cromatina e ruptura da membrana celular. Algumas destas alterações são decorrentes do processo de apoptose – morte programada celular. Racusen et al, em 1991, demonstraram que algumas células expostas a isquemia, mesmo ainda vivas, são desprendidas para a luz tubular ⁽²²⁾.

De acordo com o agravo isquêmico, as alterações celulares podem ser classificadas em ⁽²³⁾:

- Subletais – edema, vacuolização celular, perda da borda em escova, perda da polaridade celular, alterações ultraestruturais do citoesqueleto.
- Letais – apoptose, necrose, perda da viabilidade celular.
- Regenerativas – reconstituição do citoesqueleto, mitoses, acúmulo de moléculas de adesão.

1.3 Modalidades de isquemia renal

As modalidades técnicas de isquemia renal podem ser divididas em dois grandes grupos: quente (isotérmica) e fria (também conhecida como hipotermia).

Isquemia quente

A técnica de isquemia isotérmica ou quente consiste em se realizar o procedimento com o rim sob temperatura orgânica normal, sem qualquer intervenção no sentido de diminuir o metabolismo através da queda na temperatura do órgão.

Inúmeros estudos, ao longo do tempo, tentaram definir o tempo limite de isquemia quente que um rim poderia ser submetido sem impacto permanente na sua função. No caso dos mamíferos, esta resistência pode variar de acordo com a espécie. Um estudo experimental com transplante renal em ovelhas definiu que as mesmas apresentavam uma boa tolerância a até 90 minutos de isquemia quente ⁽²⁴⁾. Koletsky ⁽²⁵⁾, em 1954, mostrou, em seu estudo em ratos, uma tolerância ao clampeamento bilateral até 30 minutos e, ao ser ultrapassado o limite de 90 minutos, uma mortalidade de 73%. Após 120 minutos havia 100% de mortalidade. Laven et al ⁽²⁶⁾, em 2004, demonstraram uma recuperação renal acima do limite tradicional de 30 minutos, em um modelo suíno com rim único. Um tempo de isquemia quente prolongado alterou a função renal nas primeiras 72 horas, mas, após

duas semanas, a função renal retornou ao padrão basal. Os animais foram submetidos a tempos de isquemia de 30, 60 e 90 minutos. Neste mesmo estudo, o tempo de isquemia de 120 minutos levou a um dano funcional permanente. Já em outros modelos, com coelhos de rim único, mostraram alguma recuperação da função renal em até 120 minutos de isquemia ⁽²⁷⁾. Tyrizis et al ⁽²⁸⁾, em 2007, compararam coelhos submetidos a isquemia quente e fria utilizando oclusão total do pedículo renal e acharam um limite de tempo seguro de 60 minutos para a isquemia quente e de 120 minutos para a isquemia fria.

Em seres humanos, um limite de 30 minutos tem sido considerado seguro por muitos autores. Estudos experimentais mostraram que a oclusão arterial a partir de 30 minutos levaria a algum dano renal permanente ^(26;29). Embora Miller et al ⁽³⁰⁾ tenham observado que a nefrectomia radical laparoscópica ainda é realizada de uma forma excessiva, mesmo em casos que seriam ideais para uma cirurgia preservadora de néfrons e que mais de 90% das nefrectomias parciais laparoscópicas (NPL) eram realizadas em instituições acadêmicas, as indicações para as nefrectomias parciais têm aumentado, com a abordagem de tumores cada vez maiores e com reconstruções mais complexas, demandando um tempo de clampeamento cada vez maior. Na nefrectomia parcial laparoscópica, geralmente é necessário um tempo de isquemia maior do que na aberta ⁽³¹⁾. Shekarriz et al ⁽³²⁾ estudaram pacientes com dois rins funcionantes, submetidos à isquemia quente em NPL, por um tempo de até 44 minutos, e não observaram alteração na função renal a longo prazo. Desai et al ⁽³³⁾ estudaram 179

pacientes submetidos a NPL; destes, 15 tinham rim único, com um tempo médio de isquemia quente e a porcentagem média de massa renal retirada de 29 min e 30%, respectivamente, e a creatinina média pré e pós-operatória foi 1,3 mg/dL e 1,8 mg/dL e em 12 pacientes, com dois rins com cintilografia renal prévia, a perda de função se correlacionou exatamente com a perda de tecido renal. Thompson et al ⁽³⁴⁾, em 2007, mostraram em um estudo com pacientes apresentando rim único, uma tolerância de 20 minutos para isquemia quente e 35 para isquemia fria. De um modo geral, existem bons trabalhos mostrando tempos cada vez maiores de isquemia quente com uma recuperação funcional satisfatória. As variáveis para uma previsão da evolução funcional em um paciente seriam a quantidade de parênquima renal ressecado, se já existe algum grau de doença renal crônica, a presença do rim contralateral, a idade e as comorbidades ⁽⁷²⁾.

Isquemia Fria

A isquemia fria ou hipotermia confere uma proteção à função renal por promover uma diminuição no metabolismo das células corticais, ou seja, no consumo de oxigênio e na degradação de ATP. Em cirurgia aberta é a técnica mais utilizada de proteção ao dano isquêmico. Esta proteção ocorre tanto na fase de isquemia como na reperfusão. Zager et al ⁽³⁶⁾, em 1989, demonstraram um efeito protetor da hipotermia maior na fase de isquemia do que na fase de reperfusão e, nesta última, sua eficiência se daria em até 30 minutos do início da reperfusão, ou seja, em sua fase precoce. A própria

hipotermia também causa uma diminuição do fluxo sanguíneo renal e pode gerar uma inativação da bomba de sódio/potássio, ocasionando edema celular importante; no entanto, até um limite de 5 °C estas alterações são reversíveis. Estudos mostraram que, em reduções de 7°C na temperatura renal, o consumo de oxigênio cai para menos de 10%. Uma redução de 10°C na temperatura do rim já reduz para 75% o metabolismo ^(37;38). Em outros estudos, foi demonstrado que, ao se utilizar uma temperatura estável entre 20 e 25°C, se consegue uma manutenção da função renal para até 3 horas de clampeamento ^(39; 40).

Em cirurgia aberta, a hipotermia pode ser conseguida com resfriamento externo do parênquima renal que por vezes pode dificultar a ressecção da lesão. A técnica mais utilizada é o uso do gelo triturado por ser relativamente simples, com um resfriamento rápido, eficaz e com pouco risco de lesão vascular ⁽⁴¹⁾. Outro método é o resfriamento intravascular, no qual o rim é perfundido com soluções salinas ou mesmo sangue gelados, introduzidos diretamente na artéria renal ou por cateterização da mesma por outros acessos como as artérias ilíaca ou femoral. Este, também, é uma técnica bastante efetiva, rápida e com uma hipotermia uniforme, sem a necessidade da colocação de gelo no campo operatório. No entanto, apresenta um risco potencial de lesão arterial. Além disso, é um método com limitações de custos, dependente de profissionais experientes em radiologia intervencionista e com dificuldades anatômicas, como no caso de multiplicidade arterial ou presença de estenoses ⁽⁴²⁾. Houve, também,

experimentos com perfusão hipotérmica retrógrada através da veia renal, sem muitos benefícios ⁽⁴³⁾.

Com o desenvolvimento da laparoscopia, multiplicaram-se os experimentos almejando-se conseguir métodos eficazes de produzir isquemia fria nesta via de acesso, muitos deles baseados nas técnicas já descritas para a cirurgia aberta. Estas técnicas vão desde resfriamento externo do parênquima renal, até resfriamento retrógrado através da via excretora, mas em cirurgia laparoscópica o resfriamento renal é muito mais complexo e, apenas, experimentalmente utilizado. Gill et al ⁽⁴⁴⁾, em 2003, reproduziram para a laparoscopia o uso do gelo triturado, utilizando-se de invólucro plástico próprio para se conter o gelo e necessitando da liberação de todo o rim e pedículo, mas ainda com risco de lesão vascular criogênica. Há relatos, também, do uso do gelo, sem proteção alguma, em retroperitoneoscopia, o que aumenta o risco de lesões em órgãos adjacentes intraperitoneais, além de um campo operatório mais restrito ⁽⁴⁵⁾. Uma outra dificuldade do uso do gelo triturado em laparoscopia é a dificuldade de se visualizar e manipular o pedículo com a presença do gelo. Também já foi utilizada a técnica de resfriamento intravascular, porém, com as mesmas dificuldades e riscos da cirurgia aberta ⁽⁴⁶⁾.

A isquemia fria, por perfusão retrógrada transureteral, também pode ser usada em laparoscopia ⁽⁴⁷⁾. Alguns inconvenientes existem nesta técnica como o não resfriamento adequado do córtex renal, permanecendo com uma diferença de temperatura significativa em relação à medular, mesmo quando as células mais sensíveis ao agravo isquêmico estão na cortical. Há

ainda o fato de poder ocorrer um vazamento da solução de perfusão e perda da hipotermia se houver abertura de via excretora ⁽⁴⁸⁾. Outro aspecto a ser considerado é a necessidade de uma abordagem endoscópica adicional para a cateterização ureteral.

Os tempos de isquemia fria com preservação da função renal são classicamente maiores do que com isquemia quente. Novick relatou uma recuperação completa da função renal após 60 minutos de isquemia fria ⁽²⁹⁾.

1.4 Modalidades de clampeamento do pedículo renal

Os tipos de controle do pedículo renal podem ser: arterial ou seletivo, não-seletivo ou em bloco e intermitente.

O método mais utilizado ainda é o clampeamento arterial exclusivo ⁽³⁴⁾. Estudos experimentais, nas décadas de 60 e 70, mostraram que quando era ocluída apenas a artéria renal, o impacto da isquemia na função renal era menor do que no clampeamento simultâneo de artéria e veia. A teoria mais aceita é que o fluxo sanguíneo retrógrado, através da veia renal patente, manteria algum aporte de oxigênio e outros substratos ao metabolismo renal. Schirmer et al demonstraram em seu estudo clássico com cães que, após uma hora de clampeamento, o metabolismo caía pela metade, tanto na oclusão seletiva como em bloco, mas após cinco horas, no grupo não-seletivo, o metabolismo estava próximo de zero e no grupo arterial havia se mantido ⁽³⁸⁾. Este fluxo venoso retrógrado é estimado em 1

a 5% do fluxo renal normal. Orvieto et al ⁽⁴⁹⁾, recentemente, compararam em porcos o clampeamento seletivo e não-seletivo no acesso aberto e laparoscópico. Seus resultados mostraram uma superioridade do clampeamento arterial na abordagem aberta, mas não houve diferença entre os dois tipos de clampeamento na laparoscopia. A explicação é que, talvez, a compressão pelo pneumoperitônio tenha impedido a perfusão retrógrada pela veia renal.

No clampeamento não-seletivo, a perda sanguínea é menor e possibilita boas condições cirúrgicas. Guillonneau et al compararam NPL com e sem controle do pedículo ⁽⁵⁰⁾. Os grupos foram formados por 12 pacientes com clampeamento em bloco e 16 sem controle do pedículo. Os resultados foram uma menor perda sanguínea média no grupo com controle do pedículo (121 x 179 mL) e alterações da creatinina média semelhantes (1,3 x 1,45 mg/dL) em ambas as situações. O tempo operatório também diferiu, sendo maior nas cirurgias sem clampeamento (179 x 121 min) ⁽⁵⁰⁾. O impacto na função dos grupos sem clampeamento se deve, provavelmente, ao trauma cirúrgico em si e ao montante de parênquima funcionante ressecado. Orvieto et al ⁽⁵¹⁾ descreveram em suas séries o clampeamento do pedículo em 90% (37 pacientes) utilizando o clampeamento arterial seletivo e o arteriovenoso em 63% e 27%, respectivamente, e relataram uma melhor visualização dos tumores e sistema coletor adjacente em lesões menos exofíticas, permitindo também um melhor controle das margens cirúrgicas por se ter um campo relativamente exangue. Obtiveram uma recuperação completa da função renal com uma isquemia média de 29,7 min.

O clampeamento intermitente já é uma técnica de preservação tecidual utilizada em isquemia, bastante utilizada em cirurgia hepatobiliar. A teoria mais aceita é que o fluxo intermitente permitiria uma retirada dos metabólitos da anaerobiose e permitiria uma reoxigenação tecidual ^(52;53).

Existem, também, os nefroprotetores, substâncias que apresentam a propriedade de proteger ou de minimizar os danos isquêmicos ao tecido renal. O nefroprotetor mais comumente utilizado pelos cirurgiões é o manitol. Sua propriedade principal é o potencial osmótico, levando à expansão do volume intravascular e diminuindo o edema celular que ocorre no endotélio e no tecido após a isquemia/reperfusão. Ao se diminuir o edema celular, o fluxo sanguíneo renal é restabelecido de forma mais eficiente após o término da isquemia ⁽⁵⁴⁾.

Um outro nefroprotetor, que vem sendo bastante estudado, é a N-acetilcisteína. A mesma possui, além de uma ação vasodilatadora, uma atividade antioxidante importante ⁽⁵⁵⁾. Um dos mecanismos principais de sua atividade na melhoria da circulação renal é o estímulo à expressão da enzima óxido nítrico sintetase pelo endotélio, diminuindo o colapso microcirculatório renal que faz parte da síndrome isquemia/reperfusão ⁽⁵⁵⁾.

Algumas substâncias de ação vasodilatadoras também já foram pesquisadas e mostraram atividade de proteção à lesão isquêmica como: Nitroprussiato de sódio, sildenafil, bloqueadores dos canais de cálcio entre outros ⁽⁵⁶⁾.

Há ainda, na literatura, experimentos utilizando clorpromazina, L-arginina, pentoxifilina, antioxidantes, nicotina, bloqueadores de canal de

cálcio, dipiridamol, entre outros. Estas substâncias apresentavam alguma atividade de nefroproteção nos estudos ^(12; 56; 57).

Considerando a importância clínica da isquemia renal na prática cirúrgica, foi proposto este estudo em coelhos, comparando-se as técnicas isotérmicas de clampeamento seletiva, não-seletiva e intermitente.

2 OBJETIVOS

O presente estudo em coelhos visa esclarecer:

1. Se o clampeamento vascular seletivo é superior ao não-seletivo na manutenção da função renal.
2. Se o clampeamento intermitente é superior ao contínuo na preservação da função renal.

3 *MÉTODOS*

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo de pesquisa 0715/07).

Os animais foram tratados em conformidade com os artigos do Colégio Brasileiro em Experimentação Animal (COBEA), editado em junho de 1991 e com a Lei Federal nº. 6638 de 08 de maio de 1979, ambos estabelecendo normas para a prática científica com animais.

3.1 Desenho do estudo

Neste projeto, foram utilizados 28 coelhos albinos, machos, da raça *New Zealand*, saudáveis, com idade de aproximadamente três meses, com peso de 2,6 Kg (\pm 0,69) e creatinina sérica basal média 0,58 ng/mL (\pm 0,19), cedidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP e mantidos no Biotério do Serviço de Medicina Nuclear do Instituto de Radiologia, acondicionados em gaiolas, em ambiente climatizado adequado, com água e ração própria *ad libitum*, sendo classificados em quatro grupos, de acordo com o tipo de intervenção a que foram submetidos, conforme protocolo experimental (Figura 1):

Grupo 1 - Controle, sem isquemia (quatro animais)

Grupo 2 - Isquemia seletiva (oito animais)

Grupo 3 - Isquemia não-seletiva (oito animais)

Grupo 4 - Isquemia não-seletiva intermitente (oito animais)

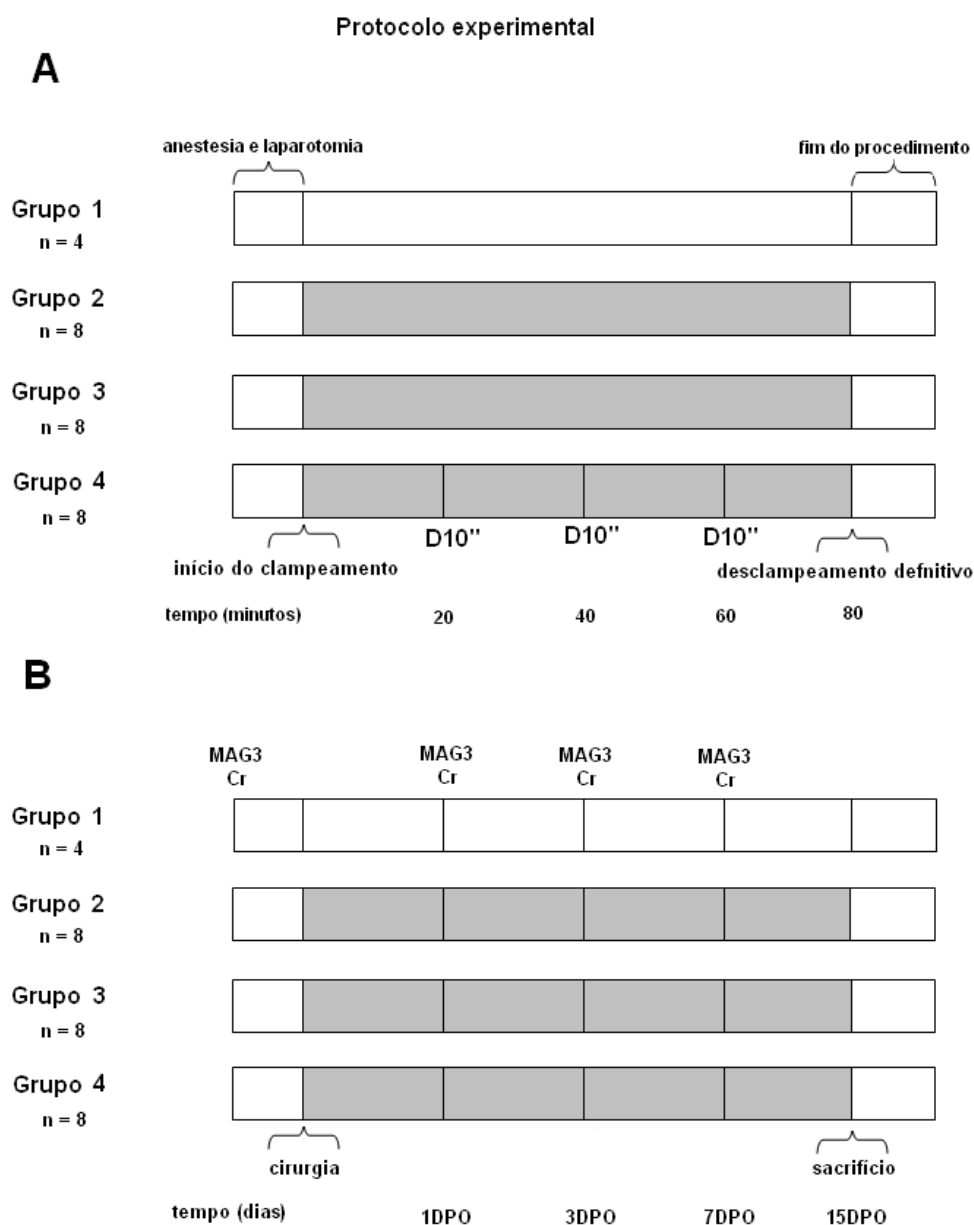


Figura 1 – Protocolo experimental: A) Cirurgia e B) Exames: Grupo 1 - controle, grupo 2 - clameamento arterial seletivo, grupo 3 - clameamento arteriovenoso, grupo 4 - clameamento arteriovenoso intermitente, D10'' – desclameamento por 10 segundos, MAG3 – cintilografia renal com MAG3 e Cr – dosagem sérica de creatitina

Os animais foram analisados por cintilografia renal e dosagens de creatinina sérica nos períodos pré-operatório, primeiro, terceiro e sétimo dia pós-operatório.

Os experimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Cirurgia Experimental do Serviço de Medicina Nuclear – LIM 43 – InRad. Os estudos cintilográficos foram realizados na γ -câmara, também do Serviço de Medicina Nuclear – InRad. As lâminas para análise histopatológica foram preparadas e analisadas nos laboratórios da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da FMUSP.

3.2 Projeto-piloto

Durante o projeto-piloto, cinco animais foram submetidos à intervenção cirúrgica e aos exames cintilográficos para padronização do procedimento: anestésico, cirúrgico e cintilográfico.

3.3 Análise cintilográfica

Utilizou-se a cintilografia renal dinâmica para avaliação morfofuncional de todos os animais. Foi realizada análise basal (pré-operatória) e análises após o procedimento cirúrgico. O radiofármaco utilizado foi a mercaptoacetiltriglicina (MAG3), esta marcada com tecnécio-99 (^{99m}Tc),

através de reconstituição, com o conjunto de preparação TechneScan MAG3® (Mallinckrodt Medical, Inc. St. Louis, MO, 63134 - USA). O MAG3 é um radiofármaco excretado em cerca de 98% por secreção tubular. O radiofármaco já marcado (MAG3 - 99mTc) foi separado em seringa de 1mL com uma atividade máxima de 0,5 mCi (18,5 MBq) em um volume não superior a 0,1 mL. Como teste de verificação de qualidade para a marcação do radiofármaco, foi utilizada a metodologia descrita por Coveney et al, a qual considera eficiente a radiomarcagem quando esta atinge acima de 95% ⁽⁵⁸⁾.

Para o preparo do exame cintilográfico, era obtido o acesso venoso por meio da veia auricular lateral dos coelhos; os quais foram sedados com xilasina 2% na dose de 5mg/kg, após a qual o animal era contido em decúbito ventral horizontal, apropriadamente posicionado, fixo à mesa de exame pelos quatro membros em canaleta de madeira apropriada e mantido em ventilação espontânea.

A aquisição das imagens era dinâmica e composta por duas fases. A primeira constava de uma frequência de uma imagem a cada três segundos, durante um minuto, específica para registro da perfusão sanguínea. A segunda fase de registro era composta de uma imagem a cada um minuto durante trinta minutos. Utilizamos a câmara de cintilação Siemens, modelo LEM, equipada com colimador LEAP (*low-energy all-purpose*) e as imagens eram adquiridas pelo programa PIP Imagamma Acquisition Driver (National Institute of Oncology, Cuba, versão 1.1 - 1995,1997) e processadas pelo software Image J® (Wayne Rasband National Institutes of Health, EUA, versão 1.30v – 2002) (Figuras 2 e 3).



Figura 2 – Câmara de cintilação Siemens – LEM – com coelho posicionado para exame



Figura 3 – Monitor com os dados fornecidos pelo software Image J[®]

3.4 Critérios de inclusão ao método

Os animais apresentaram critérios de inclusão à padronização do estudo cintilográfico, quais sejam:

1. Possuir rins tópicos, em número de dois e apresentarem morfologia habitual com volumes simétricos.
2. Durante o exame cintilográfico, apresentar padrões de imagem da primeira fase (fase perfusional) com rins simétricos e normais, mostrando uma perfusão similar aos grandes vasos a partir do sexto segundo de aquisição e a segunda fase (funcional), mostrando-se habitual, com produção e excreção de urina bilateral de forma simétrica e, ainda, uma marcação máxima do córtex renal entre o primeiro e o segundo minutos.

3.5 Interpretação dos resultados cintilográficos

Após a aquisição das imagens, a quantificação perfusional consistiu na leitura dos valores obtidos nas áreas delimitadas durante a primeira fase do exame e a relação entre estas contagens, por unidade de tempo, desde a chegada de radioatividade ao rim até o ponto máximo da curva do traçado de fluxo.

Para a análise funcional, foi feita a medição da radioconcentração relativa em cada rim entre o primeiro e o segundo minuto do exame. Estas áreas de concentração de radiofármaco foram avaliadas através de

demarcações que são chamadas de regiões de interesse (*regions of interest* – ROI). É a leitura destas áreas que dá origem aos gráficos de atividade radioativa nos rins que são os chamados renogramas (Figuras 4 e 5).

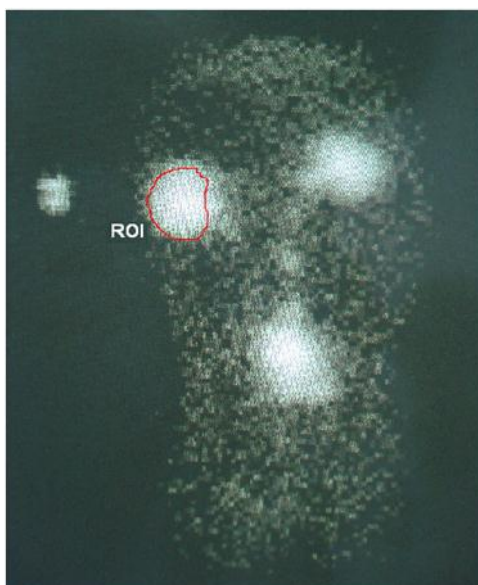


Figura 4 – Imagem da captação com ROI (*regions of interest*)

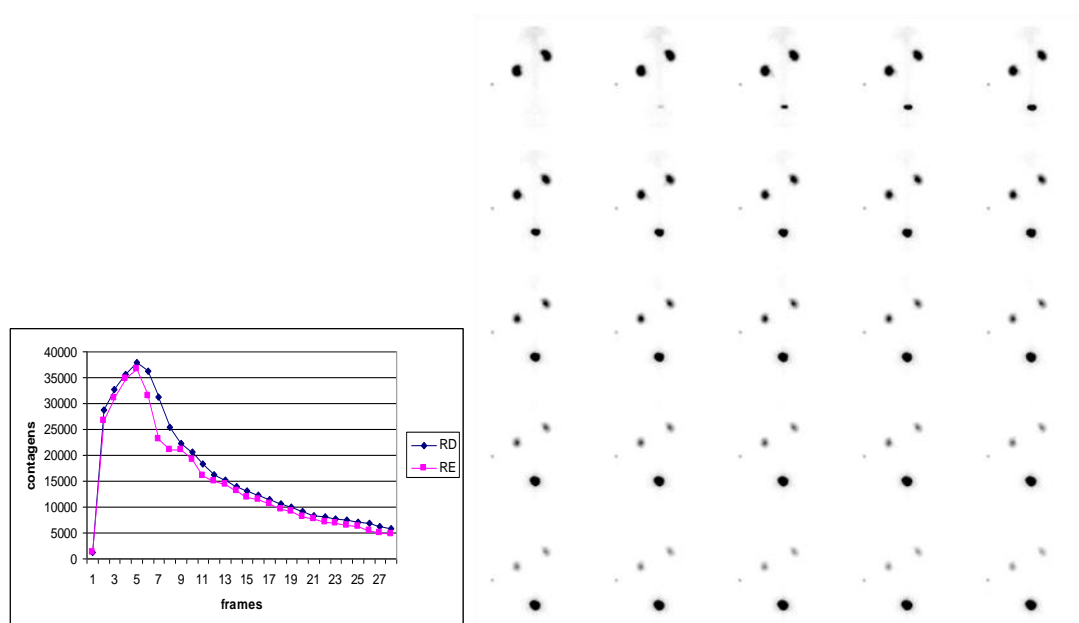


Figura 5 – Exemplo de estudo cintilográfico basal normal.

3.6 Procedimento cirúrgico

Na manhã da cirurgia, os animais foram pesados em balança de precisão e coletou-se sangue, antes do início do experimento, através da punção da veia auricular lateral para a dosagem de creatinina. Após a indução anestésica, aplicou-se por via intramuscular benzilpenicilina benzatina na dose de 50.000 UI/Kg para antibioticoprofilaxia. Realizou-se analgesia pós-operatória através da administração, pela via intramuscular, de cloridrato de xilasina 2%, na dose de 2 mg/kg, mantida a dose a cada 12 horas por três dias consecutivos.

Durante as cirurgias, os animais foram mantidos em decúbito dorsal horizontal nas canaletas operatórias, sendo fixados pelas patas com cadarços apropriados e mantidos em ventilação espontânea com cateter nasal de oxigênio a 3 l/min. A indução e manutenção anestésica foi realizada com xilasina 2%, cetamina 10 % e acepromazina 1%, nas doses de 10 mg/kg, 50 mg/kg e 2 mg/kg, respectivamente, por via venosa. Em todos os animais foram monitoradas a frequência cardíaca e a saturação de oxigênio. A anestesia foi realizada por um veterinário.

Realizou-se tricotomia na região abdominal, numa área de 10 x 5 cm e foi utilizada antissepsia com iodo-povidona e assepsia com panos operatórios esterilizados. Os coelhos foram submetidos a laparotomia mediana com bisturi de lâmina 15, pinça e tesoura, com abertura por planos até a cavidade peritoneal. Foi realizado um inventário da cavidade à procura de variações anatômicas e inspeção dos rins. Afastou-se as alças intestinais

para a direita a fim de se visibilizar o pedículo renal esquerdo, o qual foi dissecado minimamente, apenas o suficiente para a identificação da artéria e veia renais e para descartar múltipla irrigação. Os passos seguintes diferiram de acordo com o grupo.

Grupo 1 – Grupo controle. Neste, foi apenas realizada a identificação da artéria sem clampeamento ou manipulação da mesma. Após o período de 80 minutos era realizado fechamento da incisão.

Grupo 2 - Após isolamento da artéria, a mesma foi ocluída com clampe microcirúrgico e iniciada a contagem do tempo de isquemia. A oclusão total da artéria foi mantida por 80 minutos (Figura 6).

Grupo 3 - O mesmo procedimento foi empregado para este grupo, entretanto, o clampeamento era não-seletivo, ou seja, foi realizada a oclusão total de todo o pedículo (inclusão da veia renal), este permanecendo também por 80 minutos.

Grupo 4 – Neste grupo, o clampeamento também foi não-seletivo, com a diferença que foi intermitente, isto é, a cada 20 minutos de isquemia, o clampe foi aberto por 10 segundos. Ao final de 80 minutos, o mesmo foi retirado em definitivo.

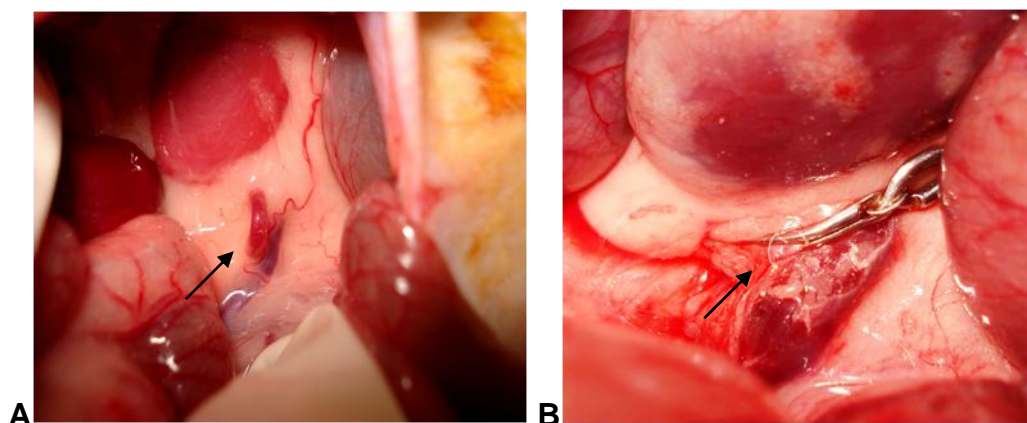


Figura 6 – Artéria renal esquerda (setas) sem (A) e com clampe microcirúrgico (B)

Todos os animais foram submetidos a um estudo radioisotópico basal, pré-operatório e a estudos pós-isquêmicos no primeiro, terceiro e sétimo dias de pós-operatórios. No décimo quinto dia após a cirurgia os animais foram novamente anestesiados e foi realizada a nefrectomia bilateral. Após a retirada dos rins, foi imediatamente realizado o sacrifício.

3.7 Sacrifício

Os animais foram mantidos sob cuidados diários de alimentação e submetidos à temperatura ambiente controlada, até serem nefrectomizados sob anestesia e sacrificados com injeção endovenosa de 2,0 mL de cloreto de potássio (KCL) a 20%, após anestesia, de acordo com o tempo determinado previamente.

3.8 Análise histopatológica

Após a nefrectomia, no décimo quinto dia pós-operatório, os rins eram dissecados e seccionados transversalmente junto ao hilo e cada unidade fixada em formol, a 10% (aldeído fórmico) e em solução de Dubosq-Brasil (ácido pícrico + formaldeído + ácido acético glacial + álcool etílico) e, posteriormente, processados em parafina e corados com hematoxilina-eosina.

Foi utilizada uma escala semiquantitativa do grau de necrose tubular aguda para quantificar as alterações microscópicas causadas pela isquemia. Esta escala continha pontuação (escore), de acordo com a intensidade, para alterações como: necrose tubular, dilatação tubular, vacuolização celular tubular e cilindros intratubulares ⁽⁸¹⁾. Com este escore de zero a quatro pôde ser feita uma análise quantitativa e estatística do padrão histopatológico (Tabela 1). As lâminas foram avaliadas e revisadas pelo mesmo patologista, com experiência em patologia renal, sem conhecimento do grupo ao qual o animal pertencia.

Tabela 1 – Escala semiquantitativa do grau de necrose tubular aguda ⁽⁸¹⁾

Pontuação (“escore”)	Padrão Histomorfométrico
0	Normal
1	Envolvimento de < 5% da cortical
2	Envolvimento de 5 a 25%
3	Envolvimento de 25 a 75%
4	Lesão extensa, com envolvimento de >75%

Durante a análise anatomopatológica, a avaliação do rim direito serviu como controle do esquerdo e como fator de exclusão para os animais que apresentassem alterações histomorfométricas neste rim.

3.9 Análise estatística

Foi utilizado o teste de variância ANOVA, com base nos dados de função renal, nos exames basais (sem intervenção) e nos pós-intervenção, analisando os grupos entre si. A análise da função renal, nos momentos distintos, em um mesmo animal, ao se comparar dois grupos, foi feita com teste Tukey. A significância estatística foi considerada quando o α era inferior a 5% ($p < 0,05$). As pontuações obtidas por escore histopatológico foram abordadas com análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis.

Os dados foram digitados em planilha Excel[®] e foi utilizado o programa estatístico SPSS[®], versão 13 (SPSS[®] Inc; Ilinois, EUA), para análise dos dados.

4 RESULTADOS

4.1 Análise cintilográfica

Os dados mostraram que os três grupos submetidos à isquemia apresentaram um dano semelhante nas primeiras 24 horas, não havendo diferença estatística entre eles, no tocante a diminuição de função renal esquerda, demonstrando um dano agudo de mesma intensidade, independente da modalidade de isquemia a que foi submetido o rim.

No exame do terceiro dia pós-operatório, houve diferença estatística entre os grupos 3 e 4 ($p = 0,006$), onde a intermitência foi a única diferença entre os grupos.

No sétimo dia pós-operatório, o grupo do clampeamento seletivo (2) mostrou ser superior ao grupo 3 ($p < 0,001$), mas não se evidenciou diferença estatística para o grupo 4. Este último, por sua vez, também se mostrou superior ao grupo 3, com diferença estatisticamente significativa. No sétimo dia pós-isquemia, não havia diferença estatística entre os grupos 2 e 4. (Figuras 7 e 8)

A tabela 2 mostra, descritivamente, os resultados encontrados nos rins esquerdos, por grupo, como também os testes para investigar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre órgãos e

grupos. Não representamos em tabelas as funções renais à direita, pois estes só refletiram a perda relativa de função dos rins contralaterais.

Tabela 2 – Dados descritivos e respectivos testes estatísticos para função renal esquerda, por tipo de tratamento, segundo o período, definidos por cintilografia

Grupo	Função Renal Esquerda (%)			
	Pré¹	1º dia	3º dia¹	7º dia¹
Grupo 1	51,5 ± 2,08	50,8 ± 1,71	50,5 ± 2,08 [£]	50,5 ± 2,52 [§]
Grupo 2	51,0 ± 2,37	39,8 ± 8,04	44,0 ± 6,75	51,2 ± 3,54 [£]
Grupo 3	47,5 ± 2,88	41,2 ± 3,70	32,4 ± 9,81 ^{§£}	39,8 ± 3,71 ^{§£¥}
Grupo 4	53,0 ± 1,77	43,5 ± 9,55	45,0 ± 6,35 [§]	51,9 ± 5,19 [¥]
P-valor*	0,082	0,165	0,006	<0,001

Grupos: **1** – Controle; **2** – Isquemia seletiva; **3** - Isquemia não-seletiva; **4** – Isquemia não-seletiva intermitente.

Média ± Desvio Padrão

* P-valor da análise de variância (ANOVA).

1 – Valores seguidos de pelo menos um símbolo na coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

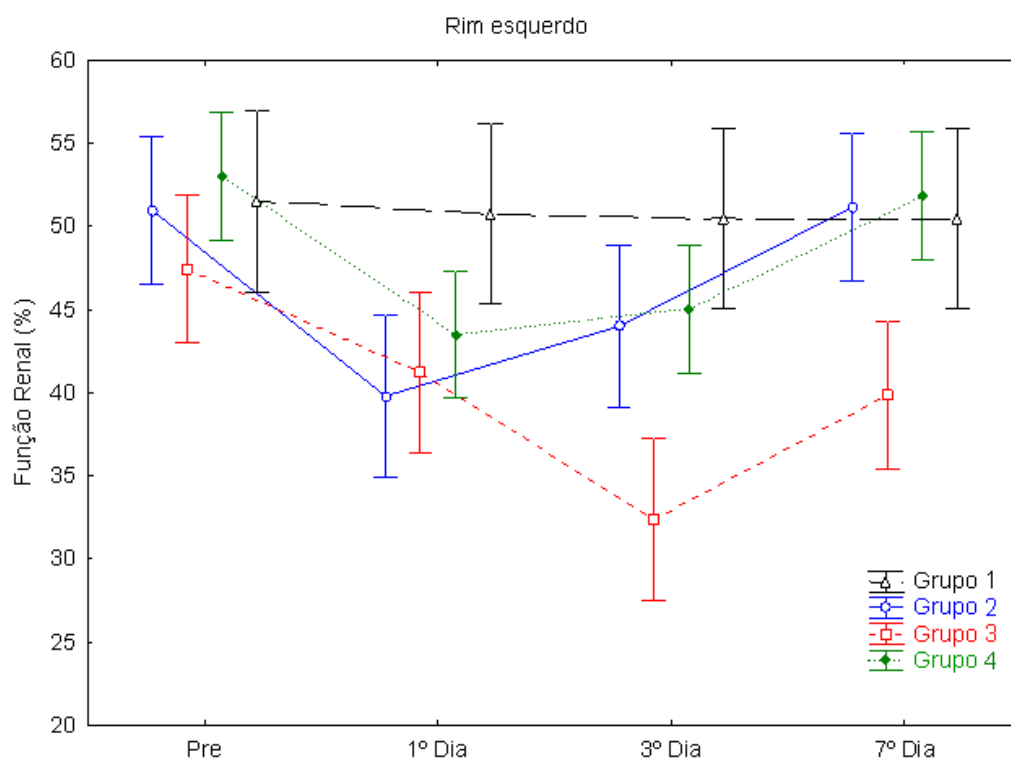


Figura 7 – Gráfico descritivo da função renal esquerda por período, segundo os tipos de tratamento

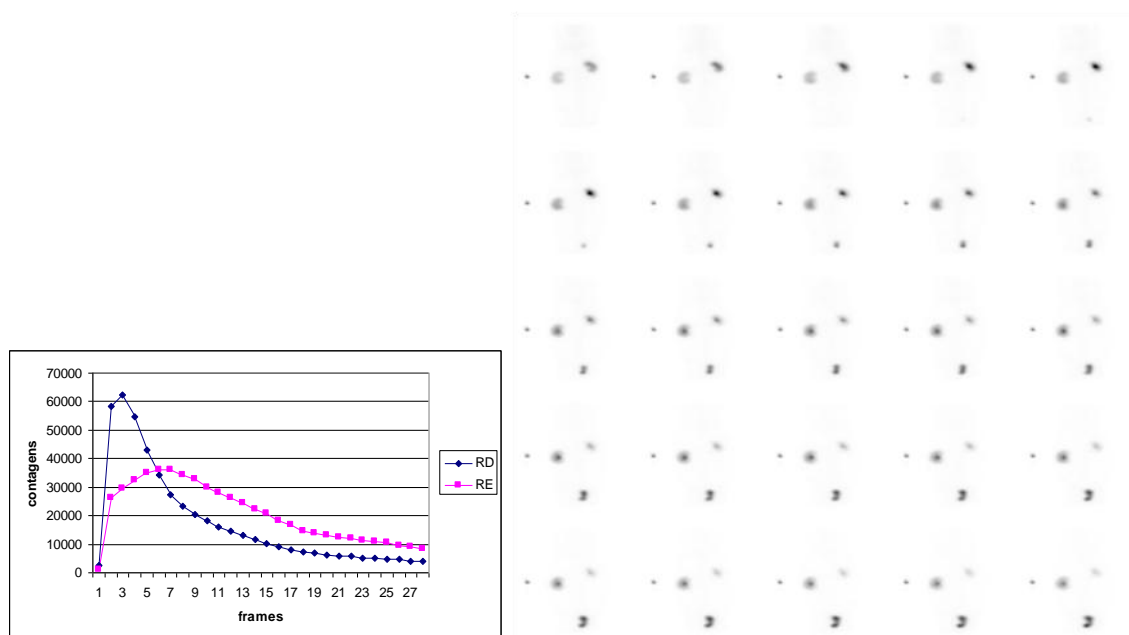


Figura 8 – Exemplo de estudo cintilográfico alterado

4.2 Análise histopatológica

No tocante ao aspecto histopatológico, em todos os grupos submetidos à isquemia, a maior parte dos animais apresentaram alterações teciduais extensas nos rins esquerdos relacionadas à NTA, como presença de dilatação da luz tubular (DLT), vacuolização celular (VC), cilindros intratubulares (CI) e necrose celular (NC). Maior parte deles pontuando como 2 ou 3, isto é, com alterações decorrentes de agravo isquêmico, envolvendo de 5 a 25% e de 25 a 75% da cortical dos órgãos, respectivamente, no entanto não diferiu entre os grupos clampeados.

Em relação às alterações histológicas individualmente (NC, DLT, VC e CI), estas também não se mostraram com diferença estatística nos rins isquemiados ($p > 0,05$). Foi observada a presença de pequenas áreas de fibrose intersticial nos rins esquerdos, entretanto, também sem diferença entre os grupos isquêmicos.

Nos animais, do grupo controle, não foram evidenciadas alterações significativas compatíveis com NTA. Os rins direitos, de todos os animais, serviram como controle para o contralateral para excluir outras causas eventuais NTA, como baixo débito cardíaco ou hipóxia, não evidenciadas no ato operatório. Estes se apresentaram normais ao exame histopatológico.

Todos apresentaram alterações difusas como edema celular e tubular, necrose tubular, nefrite intersticial focal e difusa e perda da “borda-em-escova”. Alguns dos aspectos microscópicos encontrados podem ser vistos nas figuras 9 e 10.

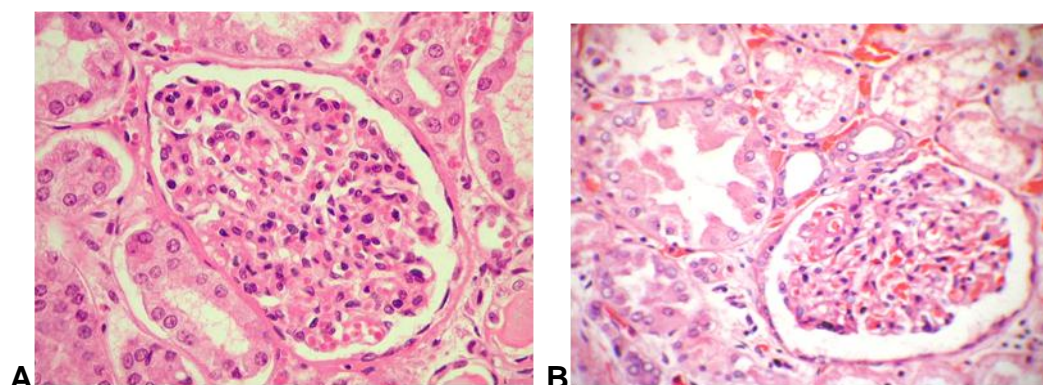


Figura 9 – A) Glomérulo e túbulos contornados proximais normais. B) Alterações celulares após dano isquêmico: edema celular, perda da “borda-em-escova” e modificações nucleares (H & E – 40x)

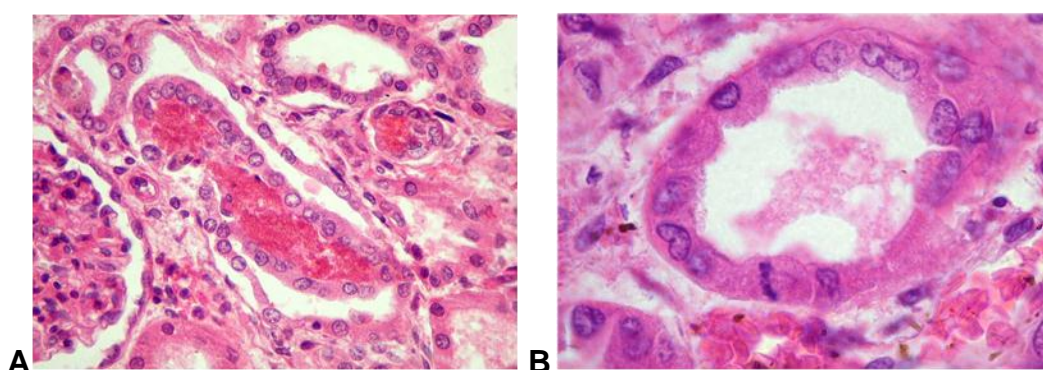


Figura 10 – A) Presença de cilindros intratubulares, alteração importante na NTA. B) Presença de regeneração tubular: núcleos volumosos e citoplasmas basófilos. Atividade regenerativa com a presença de mitoses (H & E – 40x)

4.3 Análise laboratorial

A dosagem de creatinina sérica apresentou variações significativas nos grupos que sofreram isquemia, com aumentos no primeiro e terceiro dias pós-operatórios ($p = 0,002$ e $p < 0,001$, respectivamente). As dosagens

médias de creatinina nos grupos em que houve clampeamento no primeiro, terceiro e sétimo dias foram 1,26 mg/dL (+ 0,24), 1,51 mg/dL (+ 0,27) e 0,87 mg/dL (+ 0,2), respectivamente, oscilando, também, de maneira uniforme; não apresentando diferença estatística entre os tipos de clampeamento (Tabela 3). No sétimo dia pós-operatório, os níveis séricos de creatinina séricas apresentaram uma tendência a retornar aos patamares basais ($p = 0,06$) (Figura 11).

Tabela 3 – Dados descritivos e respectivos testes estatísticos para creatinina sérica, por tipo de tratamento, segundo o período

Grupo	Creatinina (mg/dL)			
	Pré	1º dia¹	3º dia¹	7º dia
Grupo 1	0,62 ± 0,15	0,68 ± 0,17 ^{§£¥}	0,72 ± 0,17 ^{§£¥}	0,64 ± 0,09
Grupo 2	0,68 ± 0,21	1,33 ± 0,26 [§]	1,52 ± 0,26 [§]	0,91 ± 0,16
Grupo 3	0,53 ± 0,13	1,19 ± 0,21 [£]	1,47 ± 0,12 [£]	0,86 ± 0,16
Grupo 4	0,58 ± 0,21	1,26 ± 0,26 [¥]	1,48 ± 0,27 [¥]	0,84 ± 0,07
P-valor*	0,512	0,002	<0,001	0,062

Grupos: **1** – Controle; **2** – Isquemia seletiva; **3** - Isquemia não-seletiva; **4** – Isquemia não-seletiva intermitente.

Média ± Desvio Padrão

* P-valor da análise de variância (ANOVA).

¹ – Valores seguidos de pelo menos um símbolo na coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

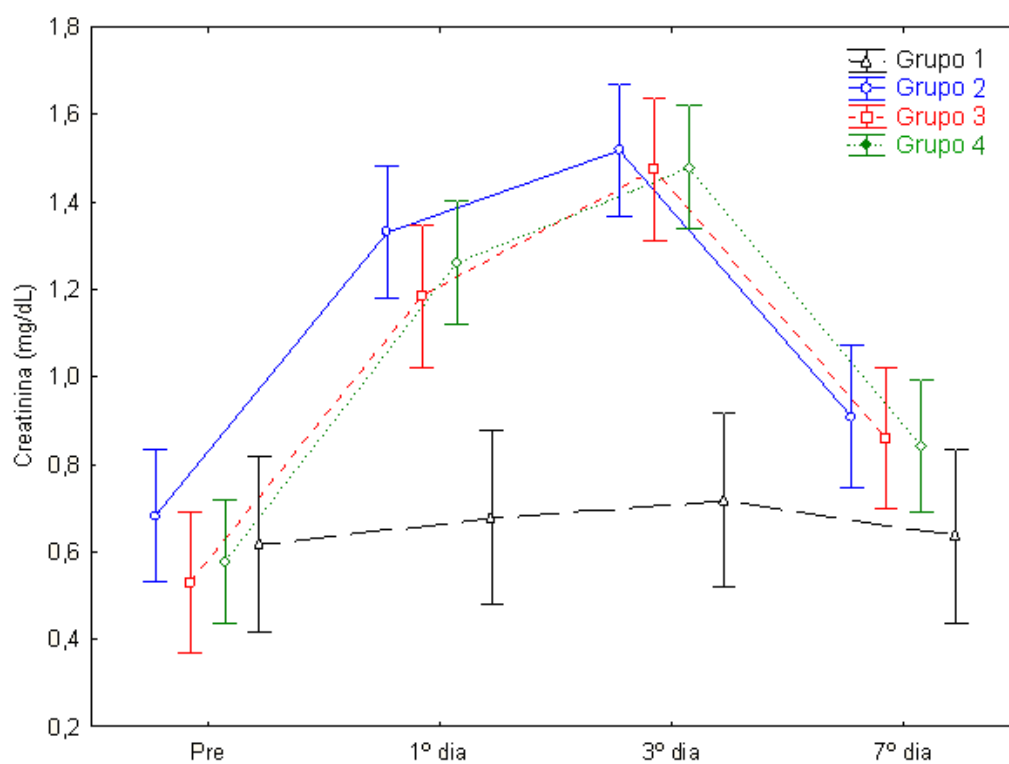


Figura 11 – Gráfico descritivo da creatinina, por período, segundo os tipos de tratamento

5 *DISCUSSÃO*

Desde 1991, com a primeira nefrectomia laparoscópica descrita por Clayman et al ⁽⁵⁹⁾, a cirurgia laparoscópica urológica, em especial a renal, desenvolveu-se muito nos últimos vinte anos. Com a sofisticação nos métodos de imagem e a sua utilização mais frequente, as lesões renais passaram a ser descobertas mais precocemente, gerando um contingente imenso de pacientes com tumores menores e em pacientes cada vez mais jovens ⁽⁶⁰⁾. Na década de 70, cerca de 10% dos tumores renais eram incidentais, esta porcentagem passou a 60% no final da década de 90 ⁽⁶¹⁾.

Com o conceito de cirurgia preservadora de néfrons, cada vez mais presente e pertinente, as técnicas aberta, laparoscópica pura e, mais recentemente, a robótica, necessitaram de um aprimoramento no sentido da retirada das lesões poupando ao máximo o tecido renal sadio ^(62:63). As lesões T1a (até quatro centímetros) são as de indicação formal, sempre que possível, de cirurgia de preservação de parênquima renal ⁽⁶⁴⁾. Nos últimos 25 anos, houve uma mudança no padrão dos tumores renais com um aumento na detecção de lesões renais menores que 4 cm, com o diagnóstico de tumores renais T1a triplicando neste período ⁽⁶⁵⁾.

Pelo fato do tumor de células renais incidir, predominantemente, em pacientes com mais de 65 anos, estes apresentam com frequência outras comorbidades, o que leva a uma criteriosa escolha do tratamento destes tumores. Sempre que possível de ser indicada, a terapêutica ideal para

estes pacientes é a cirurgia preservadora de néfrons, seja aberta ou laparoscópica. Para tanto, exige, frequentemente, o clampeamento do pedículo renal e conseqüente isquemia, para que se faça uma cirurgia em boas condições. Diante de todas as técnicas de isquemia renal, a chamada isotérmica é a que prevalece na cirurgia laparoscópica, pelas dificuldades de se obter hipotermia para a proteção da função renal, com temperaturas ideais descritas primeiramente por Ward ⁽⁴⁰⁾, e da produção da isquemia fria em si. Apesar das inúmeras técnicas propostas de hipotermia em laparoscopia, nenhuma se apresentou factível clinicamente a ponto de se consagrar e se tornar um método rotineiro na prática clínica.

Diversos estudos nas décadas de 60 e 70 procuraram responder as questões sobre interrupção do fluxo sanguíneo renal e a recuperação da função renal, mas nos últimos 20 anos, por causa das cirurgias preservadoras de néfrons e pelo desenvolvimento da laparoscopia, estes questionamentos voltaram a gerar discussões e várias pesquisas ^(66;71;73;74).

Em nosso conhecimento, nenhum experimento havia comparado clampeamento arterial ou seletivo, não-seletivo e intermitente. No presente estudo, comparou-se a oclusão seletiva da artéria renal com a oclusão do pedículo em bloco e com o clampeamento em bloco intermitente. O clampeamento intermitente já é uma manobra bem estabelecida em cirurgia hepática. Com a intermitência, foram obtidos benefícios em relação ao clampeamento em bloco, pois em virtude do alto fluxo sanguíneo renal há uma retirada de parte daqueles catabólitos acumulados durante a isquemia e uma reoxigenação do parênquima, ainda que em pouco tempo. Alguns trabalhos

mais antigos apresentam dados conflitantes, demonstrando que esta abordagem não traria tantos benefícios, mas estes estudos são bem anteriores às teorias de radicais livres, ao conhecimento de mediadores inflamatórios e das cascatas metabólicas desencadeadas pela anaerobiose ^(67;68;69).

A oclusão seletiva da artéria já está consagrada na cirurgia aberta e a teoria mais aceita para esta superioridade é o possível efeito protetor da perfusão retrógrada pela veia renal, fluxo este que é em torno de 1 a 5%. Como o gradiente de oxigênio é pequeno entre artéria e veia, este fluxo já representa um ganho significativo em termos de oxigenação e retirada de escórias. Em laparoscopia, este benefício ao se manter a veia patente poderia estar ausente ou minimizado pela pressão de CO₂ ⁽⁴⁹⁾.

Os resultados cintilográficos deste estudo mostraram um agravamento isquêmico semelhante nos três grupos no primeiro exame pós-isquemia, realizado um dia após a intervenção. O dano agudo provocado foi da mesma intensidade, independente do tipo de isquemia, provavelmente relacionado com o tempo de isquemia quente.

Nas análises cintilográficas do terceiro dia pós-operatório, já foi observada uma diferença estatística entre os grupos 3 e 4, o que aponta uma vantagem da intermitência do clameamento na proteção renal, uma vez que ambos os grupos tiveram os mesmos vasos clameados, diferindo apenas nos desclameamentos sequenciais. No sétimo dia pós-operatório, o grupo do clameamento seletivo (grupo 2) e do clameamento intermitente (grupo 4) mostraram ser superiores ao grupo 3. Contudo, não se evidenciou diferença entre os grupos 2 e 4.

Na avaliação histopatológica, os grupos, de uma forma geral, apresentaram as alterações decorrentes de NTA. A maior parte dos animais, independente do grupo isquêmico, apresentou alterações celulares e estruturais pontuando entre 2 e 3, isto é, com envolvimento de 5 a 25% e de 25 a 75% do órgão, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os grupos. Em quinze dias, uma parte da resolução do dano isquêmico já foi efetuada. No agravo isquêmico, as células com lesões subletais se regeneraram, mas outras se mantêm com alterações estruturais. Como são diversas as alterações microscópicas da lesão isquêmica, foi comparada a presença e a extensão de necrose celular, dilatação tubular, cilindros intratubulares e vacuolização tubular. Todos os grupos isquêmicos apresentaram alterações difusas como edema celular e tubular, necrose tubular, nefrite intersticial focal e difusa, cilindros intratubulares e perda das células tubulares da “borda-em-escova”, muito embora sem diferença estatística entre eles. O dano tecidual não se correlacionou completamente com a recuperação da função, talvez, pela variedade de alterações relacionadas com a NTA.

Este estudo apresenta limitações. Os estudos com pequenos animais (ratos, coelhos, entre outros) são criticados porque anatomicamente estes apresentam rins grandes em proporção ao resto do corpo quando comparados com grandes animais como cães ou porcos e apresentam rins unilobulares, diferindo também dos mamíferos maiores, como o próprio homem ^(70;72). Apesar disto, não se sabe se estes aspectos anatômicos são favoráveis ou não à resistência isquêmica e qual sua real implicação nos

resultados dos experimentos ⁽⁷²⁾. Um outro aspecto que não pôde ser avaliado foi o efeito do pneumoperitôneo na isquemia, uma vez que a abordagem não foi laparoscópica. Também não se sabe ao certo se os intervalos para o desclameamento no grupo intermitente foram adequados ou muito prolongados, ou mesmo se o tempo de liberação do clampe foi suficiente. Foi optado por 10 segundos de liberação, pois o fluxo renal nos animais chega a 100 ml/min, correspondendo de 15 a 20 % do débito cardíaco do animal ⁽⁷⁵⁾, parecendo representar tempo suficiente para uma reperfusão renal efetiva e ainda assim um período factível para hemostasia, por compressão, em um transoperatório seja em cirurgia aberta ou laparoscópica.

O benefício de um clameamento em bloco seria de dispensar uma dissecação mais prolongada e com mais riscos de lesão vascular durante o isolamento da artéria, diminuindo o tempo operatório. Além disto, poderia provocar menos sangramento do parênquima renal quando seccionado. Weld et al mostraram um aumento de embolismo gasoso em laparoscopia relacionado ao uso do laser de argônio quando não se campeia a veia renal. Isto seria outro benefício do clameamento não-seletivo ⁽⁷⁶⁾. Schuler et al, relataram que a oxigenação renal não é significativamente diferente em um clameamento apenas arterial ou arteriovenoso ⁽⁷⁷⁾. A pressão parcial de oxigênio (pO₂) venosa renal é bastante alta, levando a um gradiente arteriovenoso de oxigênio baixo, provavelmente pelo alto fluxo sanguíneo renal ⁽⁷⁸⁾.

Durante o desenvolvimento da metodologia observou-se pouca alteração nos padrões cintilográficos, utilizando períodos de isquemia de 40

e 60 minutos e resolveu-se estabelecer um tempo de isquemia prolongada em 80 minutos. As alterações na creatinina sérica, após as intervenções, foram semelhantes nos grupos, sem diferença estatística, isto justificado, provavelmente, pela manutenção da unidade renal direita. Mas, ainda assim, a aferição da creatinina foi importante, pois serviu como controle para identificação de outros fatores que não o clampeamento do pedículo, causando perda de função renal como baixo débito cardíaco, edema agudo de pulmão ou complicação anestésica.

Foi optada pela intervenção na unidade renal esquerda pelo maior comprimento da veia renal e maior facilidade anatômica para se abordar o pedículo, por estes motivos é este o padrão em estudos experimentais com isquemia renal ^(71;72). Embora a maior parte dos experimentos com isquemia renal, na literatura, sejam os modelos com rim único, nós optamos pela manutenção do rim direito para que este servisse como controle para o esquerdo e para evitar uma intervenção adicional nos animais, ainda que soubéssemos que iríamos perder, provavelmente, a relevância do dado da creatinina sérica. A nefrectomia direita prévia é procedimento padrão nos modelos experimentais de rim único ⁽⁷²⁾. Na prática clínica, a maior parte dos pacientes apresenta os dois rins, estando este modelo, com duas unidades renais, mais próximo da rotina cirúrgica atual, uma vez que as cirurgias parciais não se restringem mais àqueles pacientes com rim único. Um outro critério é que estudos têm mostrado o rim solitário como mais resistente à isquemia, seja por hipertrofia compensatória, ou mesmo por fatores fisiológicos de proteção a esta unidade renal ⁽⁷⁹⁾.

A cintilografia renal dinâmica é um excelente método para a avaliação da função renal e o MAG3 é um radiotraçador bem conhecido e validado na comunidade científica internacional. O MAG3 é eliminado por secreção tubular, diferentemente do DTPA que é um radiofármaco de eliminação glomerular, o que pode acarretar um aumento de falsos-negativos. Além disso, os rins eliminam o MAG3 bem mais eficientemente que o DTPA, por este motivo as imagens obtidas são mais nítidas e mais fáceis de analisar, mesmo em casos de perda de função renal ou na utilização de doses menores como em crianças ou, como neste estudo, em animais de pequeno porte ⁽³⁵⁾. A cintilografia com MAG3 mostra bem o fluxo sanguíneo renal efetivo e a função tubular, sendo as células do túbulo contornado proximal as mais sensíveis ao agravo isquêmico.

A isquemia renal é uma linha de pesquisa muito interessante, que possibilita a realização de inúmeros projetos e estudos com uma aplicabilidade concreta na prática cirúrgica diária. Para novas pesquisas, serão buscadas novas técnicas de síntese mais rápidas, a fim de abreviar o tempo de isquemia, métodos mais simples de empregar a hipotermia em laparoscopia, a descoberta de novos nefroprotetores e o desenvolvimento de modelos com células-tronco a fim de recuperar a população perdida de néfrons.

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

1. O impacto negativo sobre a função renal é menor na isquemia isotérmica seletiva do que na não-seletiva
2. O clampeamento intermitente não-seletivo preserva melhor a função renal do que o clampeamento contínuo não-seletivo

7 REFERÊNCIAS

- 1 Belzer FO, Park HY, Vetto RM. Factors influencing renal blood flow during isolated perfusion. *Surg Forum* 1964;15:222-4.
- 2 Benway BM, Baca G, Bhayani SB, Das NA, Katz MD, Diaz DL, et al. Selective versus nonselective arterial clamping during laparoscopic partial nephrectomy: impact upon renal function in the setting of a solitary kidney in a porcine model. *J Endourol* 2009 Jul;23(7):1127-33.
- 3 Nohara T, Fujita H, Yamamoto K, Kitagawa Y, Gabata T, Namiki M. Modified anatomic partial nephrectomy with selective renal segmental artery clamping to preserve renal function: a preliminary report. *Int J Urol* 2008 Oct;15(11):961-6.
- 4 Hamilton DN, Reid WA. Yu. Yu. Voronoy and the first human kidney allograft. *Surg Gynecol Obstet* 1984 Sep;159(3):289-94.
- 5 Belzer FO, Ashby BS, Dunphy JE. 24-hour and 72-hour preservation of canine kidneys. *Lancet* 1967 Sep 9;2(7515):536-8.
- 6 Polyak MM, Grosche A. Comparison of Vasosol and University of Wisconsin solutions on early kidney function after 24 hours of cold ischemia in a canine autotransplantation model. *J Surg Res* 2008 Dec;150(2):255-60.
- 7 Mandelbrot DA, Pavlakis M, Karp SJ, Johnson SR, Hanto DW, Rodrigue JR. Practices and barriers in long-term living kidney donor follow-up: a survey of U.S. transplant centers. *Transplantation* 2009 Oct 15;88(7):855-60.
- 8 Nguyen MM, Gill IS, Ellison LM. The evolving presentation of renal carcinoma in the United States: trends from the Surveillance, Epidemiology, and End Results program. *J Urol* 2006 Dec;176(6 Pt 1):2397-400.

- 9 Rubinstein M, Colombo JR, Jr., Finelli A, Gill IS. Laparoscopic partial nephrectomy for cancer: techniques and outcomes. *Int Braz J Urol* 2005 Mar;31(2):100-4.
- 10 Peycelon M, Vaessen C, Misrai V, Comperat E, Conort P, Bitker MO, et al. Results of nephron-sparing surgery for renal cell carcinoma of more than 4 cm in diameter. *Prog Urol* 2009 Feb;19(2):69-74.
- 11 Zappitelli M. Epidemiology and diagnosis of acute kidney injury. *Semin Nephrol* 2008 Sep;28(5):436-46.
- 12 Tang IY, Murray PT. Prevention of perioperative acute renal failure: what works? *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2004 Mar;18(1):91-111.
- 13 Brezis M, Epstein FH. Cellular mechanisms of acute ischemic injury in the kidney. *Annu Rev Med* 1993;44:27-37.
- 14 Strauss J, Beran AV, Brown CT, Katurich N. Renal oxygenation under "normal" conditions. *Am J Physiol* 1968 Dec;215(6):1482-7.
- 15 Bidani A, Churchill PC. Acute renal failure. *Dis Mon* 1989 Feb;35(2):57-132.
- 16 Beckman JS. Ischaemic injury mediator. *Nature* 1990 May 3;345(6270):27-8.
- 17 Wattiaux R, Wattiaux-De CS. Effects of ischemia on lysosomes. *Int Rev Exp Pathol* 1984;26:85-106.
- 18 Cotterill LA, Gower JD, Fuller BJ, Green CJ. Evidence that calcium mediates free radical damage through activation of phospholipase A2 during cold storage of the rabbit kidney. *Adv Exp Med Biol* 1990;264:397-400.
- 19 Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994 May;81(5):637-47.
- 20 Newaz MA, Oyekan AO. Vascular responses to endothelin-1, angiotensin-II, and U46619 in glycerol-induced acute renal failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001 Oct;38(4):569-77.

- 21 Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg* 1991 Jun;78(6):651-5.
- 22 Racusen LC, Fivush BA, Li YL, Slatnik I, Solez K. Dissociation of tubular cell detachment and tubular cell death in clinical and experimental "acute tubular necrosis". *Lab Invest* 1991 Apr;64(4):546-56.
- 23 Racusen LC. Structural correlates of renal electrolyte alterations in acute renal failure. *Miner Electrolyte Metab* 1991;17(2):72-88.
- 24 Mitchell RM. Studies on renal transplantation in sheep. *Aust N Z J Surg* 1959 May; 28(4):263-73.
- 25 Koletsky S. Effects of temporary interruption of renal circulation in rats. *AMA Arch Pathol* 1954 Dec;58(6):592-603.
- 26 Laven BA, Orvieto MA, Chuang MS, et al. Renal tolerance to prolonged warm ischemia time in a laparoscopic versus open surgery porcine model. *J Urol* 2004 Dec;172(6): 2471–2474.
- 27 Dahlager JI, Bilde T. The 125I-Hippuran renogram in rabbit kidneys after graded warm ischaemia. *Scand J Urol Nephrol* 1980;14(1):85-90.
- 28 Tyritzis SI, Kyroudi A, Liatsikos E, Manousakas T, Karayannacos P, Kostomitsopoulos N, et al. Comparison of prolonged warm and cold ischemia on the solitary kidney during partial nephrectomy in a rabbit model. *World J Urol* 2007 Dec;25(6):635-40.
- 29 Novick AC. Renal hypothermia: in vivo and ex vivo. *Urol Clin North Am* 1983 Nov;10(4):637-44.
- 30 Miller DC, Hollingsworth JM, Hafez KS, Daignault S, Hollenbeck BK. Partial nephrectomy for small renal masses: an emerging quality of care concern? *J Urol* 2006 Mar;175(3 Pt 1):853-7.
- 31 Gill IS, Kavoussi LR, Lane BR, Blute ML, Babineau D, Colombo JR, Jr., et al. Comparison of 1,800 laparoscopic and open partial nephrectomies for single renal tumors. *J Urol* 2007 Jul;178(1):41-6.

- 32 Shekarriz B, Shah G, Upadhyay J. Impact of temporary hilar clamping during laparoscopic partial nephrectomy on postoperative renal function: a prospective study. *J Urol* 2004 Jul;172(1):54-7.
- 33 Desai MM, Gill IS, Ramani AP, Spaliviero M, Rybicki L, Kaouk JH. The impact of warm ischaemia on renal function after laparoscopic partial nephrectomy. *BJU Int* 2005 Feb;95(3):377-83.
- 34 Thompson RH, Frank I, Lohse CM, Saad IR, Fergany A, Zincke H, et al. The impact of ischemia time during open nephron sparing surgery on solitary kidneys: a multi-institutional study. *J Urol* 2007 Feb;177(2):471-6.
- 35 Trejtnar F, Laznicek M. Analysis of renal handling of radiopharmaceuticals. *Q J Nucl Med.* 2002 Sep;46(3):181-94.
- 36 Zager RA, Gmur DJ, Bredl CR, Eng MJ. Degree and time sequence of hypothermic protection against experimental ischemic acute renal failure. *Circ Res* 1989 Nov;65(5):1263-9.
- 37 Levy MN. Oxygen consumption and blood flow in the hypothermic, perfused kidney. *Am J Physiol* 1959 Nov;197:1111-4.
- 38 Schirmer HK, Walton KN. The effect of hypothermia upon respiration and anaerobic glycolysis of dog kidney. *Invest Urol* 1964 May;1:604-9.
- 39 Wickham JE, Hanley HG, Joekes AM. Regional renal hypothermia. *Br J Urol* 1967 Dec;39(6):727-43.
- 40 Ward JP. Determination of the Optimum temperature for regional renal hypothermia during temporary renal ischaemia. *Br J Urol* 1975 Feb;47(1):17-24.
- 41 Marberger M, Eisenberger F. Regional hypothermia of the kidney: surface or transarterial perfusion cooling? A functional study. *J Urol* 1980 Aug;124(2):179-83.
- 42 Marberger M, Georgi M, Guenther R, Hohenfellner R. Simultaneous balloon occlusion of the renal artery and hypothermic perfusion in in situ surgery of the kidney. *J Urol* 1978 Apr;119(4):463-7.

- 43 Wilhelm E, Schrott KM, Kronert E, Sigel A, Schwille PO. Transvenous perfusion cooling of the kidney: a new technique of local renal hypothermia. *Invest Urol* 1978 Sep;16(2):87-90.
- 44 Gill IS, Abreu SC, Desai MM, Steinberg AP, Ramani AP, Ng C, et al. Laparoscopic ice slush renal hypothermia for partial nephrectomy: the initial experience. *J Urol* 2003 Jul;170(1):52-6.
- 45 Wakabayashi Y, Narita M, Kim CJ, Kawakami T, Yoshiki T, Okada Y. Renal hypothermia using ice slush for retroperitoneal laparoscopic partial nephrectomy. *Urology* 2004 Apr;63(4):773-5.
- 46 Janetschek G, Abdelmaksoud A, Bagheri F, Al-Zahrani H, Leeb K, Gschwendtner M. Laparoscopic partial nephrectomy in cold ischemia: renal artery perfusion. *J Urol* 2004 Jan;171(1):68-71.
- 47 Landman J, Rehman J, Sundaram CP, Bhayani S, Monga M, Pattaras JG, et al. Renal hypothermia achieved by retrograde intracavitary saline perfusion. *J Endourol* 2002 Sep;16(7):445-9.
- 48 Guerra R, Leonardi EP, Otsuka RA, Quitzan J, Kawano PR, Yamamoto HA, et al. Cold renal ischemia: comparison of efficacy between two techniques of cooling, in a swine model. *J Endourol* 2010 Mar;24(3):445-9.
- 49 Orvieto MA, Zorn KC, Mendiola F, Lyon MB, Mikhail AA, Gofrit ON, et al. Recovery of renal function after complete renal hilar versus artery alone clamping during open and laparoscopic surgery. *J Urol* 2007 Jun;177(6):2371-4.
- 50 Guillonneau B, Bermudez H, Gholami S, El FH, Gupta R, Adorno RJ, et al. Laparoscopic partial nephrectomy for renal tumor: single center experience comparing clamping and no clamping techniques of the renal vasculature. *J Urol* 2003 Feb;169(2):483-6.
- 51 Orvieto MA, Chien GW, Tolhurst SR, Rapp DE, Steinberg GD, Mikhail AA, et al. Simplifying laparoscopic partial nephrectomy: technical considerations for reproducible outcomes. *Urology* 2005 Nov;66(5):976-80.
- 52 Sugiyama Y, Ishizaki Y, Imamura H, Sugo H, Yoshimoto J, Kawasaki S. Effects of intermittent Pringle's maneuver on cirrhotic compared with normal liver. *Br J Surg*. 2010 Jul;97(7):1062-9.

- 53 Steenks M, van Baal MC, Nieuwenhuijs VB, de Bruijn MT, Schiesser M, Teo MH, Callahan T, Padbury RT, Barritt GJ. Intermittent ischaemia maintains function after ischaemia reperfusion in steatotic livers. *HPB* (Oxford). 2010 May;12(4):250-61.
- 54 Collins GM, Green RD, Boyer D, Halasz NA. Protection of kidneys from warm ischemic injury. Dosage and timing of mannitol administration. *Transplantation*. 1980; 29: 83-4.
- 55 Araujo M, Andrade L, Coimbra TM, et al. Magnesium supplementation combined with N-acetylcysteine protects against postischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 3339–3349.
- 56 Medeiros PJ, Villarim Neto A, Lima FP, Azevedo IM, Leão LR, Medeiros AC. Effect of sildenafil in renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Acta Cir Bras* 2010 Dec;25(6): 490-495.
- 57 Araujo WM, Tucci Jr S, Costa RS, Ferreira RA, et al. Animal model of renal ischemic injury, and chlorpromazine protector effect, evaluated by Tc99m-MAG3 dynamic renal scan. *Acta Cir Bras* 2002; 17: 15-9.
- 58 Coveney JR, Robbins MS. Comparison of technetium-99m MAG3 kit with HPLC-purified technetium-99m MAG3 and OIH in rats. *J Nucl Med*. 1987 Dec;28(12):1881-7.
- 59 Clayman RV, Kavoussi LR, Soper NJ, Dierks SM, Meretyk S, Darcy MD, et al. Laparoscopic nephrectomy: initial case report. *J Urol* 1991 Aug;146(2):278-82.
- 60 Kunkle DA, Kutikov A, Uzzo RG. Management of small renal masses. *Semin Ultrasound CT MR* 2009 Aug;30(4):352-8.
- 61 Mues AC, Landman J. Small renal masses: current concepts regarding the natural history and reflections on the American Urological Association guidelines. *Curr Opin Urol* 2010 Mar;20(2):105-10.
- 62 Ficarra V, Secco S, Fracalanza S, Novara G, Gidaro S, Cindolo L, et al. Expanding indication for elective nephron-sparing surgery in renal cell carcinoma. *Arch Ital Urol Androl* 2009 Jun;81(2):86-90.

- 63 Shapiro E, Benway BM, Wang AJ, Bhayani SB. The role of nephron-sparing robotic surgery in the management of renal malignancy. *Curr Opin Urol* 2009 Jan;19(1):76-80.
- 64 Pantuck AJ, Zisman A, Belldegrun A. Biology of renal cell carcinoma: changing concepts in classification and staging. *Semin Urol Oncol* 2001 May;19(2):72-9.
- 65 Hollingsworth JM, Miller DC, Daignault S, Hollenbeck BK. Rising incidence of small renal masses: a need to reassess treatment effect. *J Natl Cancer Inst* 2006 Sep 20;98(18):1331-4.
- 66 Lyrdal F, Olin T. Renal blood flow and function in the rabbit after surgical trauma. III. Effects of temporary occlusion of renal artery. *Scand J Urol Nephrol*. 1975;9(2):151-60.
- 67 Truss F. Advantages and disadvantages of intermittent pedicle clamping in renal preserving surgery. *Br J Urol* 1971 Feb;43(1):35-8.
- 68 Stueber PJ, Koletsky S, Persky L. The effect of intermittent clamping of the renal pedicle. *J Urol* 1960 Jul;84:26-31.
- 69 Frank RS, Frank TS, Zelenock GB, D'Alecy LG. Ischemia with intermittent reperfusion reduces functional and morphologic damage following renal ischemia in the rat. *Ann Vasc Surg* 1993 Mar;7(2):150-5.
- 70 Craddock GN. Species differences in response to renal ischemia. *Arch Surg* 1976 May;111(5):582-4.
- 71 Secin FP. Importance and limits of ischemia in renal partial surgery: experimental and clinical research. *Adv Urol* 2008 Jun;08:102461.
- 72 Simmons MN, Schreiber MJ, Gill IS. Surgical renal ischemia: a contemporary overview. *J Urol* 2008 Jul;180(1):19-30.
- 73 Bilde T, Dahlager JI, Asnaes S, Jaglicic D. The influence of warm ischaemia on renal function and pathology. *Scand J Urol Nephrol* 1977;11(2):165-72.

-
- 74 Dahlager JI. Sequential [125I]-o-iodohippurate renograms from rabbit kidneys after temporary renal ischemia. *J Nucl Med* 1978 Dec;19(12):1324-30.
- 75 Korner PI. Effects of low oxygen and of carbon monoxide on the renal circulation in unanesthetized rabbits. *Circ Res* 1963 Apr;12:361-74.
- 76 Weld KJ, Ames CD, Landman J, Morrissey K, Connor T, Hraby G, et al. Evaluation of intra-abdominal pressures and gas embolism during laparoscopic partial nephrectomy in a porcine model. *J Urol* 2005 Oct;174(4 Pt 1):1457-9.
- 77 Schuler TD, Perks AE, Fazio LM, Blew BD, Mazer D, Hare G, et al. Impact of arterial and arteriovenous renal clamping with and without intrarenal cooling on renal oxygenation and temperature in a porcine model. *J Endourol* 2008 Oct;22(10):2367-72.
- 78 Welch WJ, Baumgartl H, Lubbers D, Wilcox CS. Nephron pO₂ and renal oxygen usage in the hypertensive rat kidney. *Kidney Int* 2001 Jan;59(1):230-7.
- 79 Baldwin DD, Maynes LJ, Berger KA, Desai PJ, Zuppan CW, Zimmerman GJ, et al. Laparoscopic warm renal ischemia in the solitary porcine kidney model. *Urology* 2004 Sep;64(3):592-7.
- 80 Orvieto MA, Zorn KC, Mendiola FP, Gong EM, Lucioni A, Mikhail AA, et al. Ischemia preconditioning does not confer resilience to warm ischemia in a solitary porcine kidney model. *Urology* 2007 May;69(5):984-7.
- 81 Shih W, Hines WH, Neilson EG. Effects of cyclosporin A on the development of immune-mediated interstitial nephritis. *Kidney Int.* 1988; 33:1113-8.

APÊNDICES



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 12/09/2007, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0715/07**, intitulado: **"REPERCUSSÕES MORFOLÓGICAS E FUNCIONAIS EM PARÊNQUIMA RENAL DE COELHOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA SELETIVA E NÃO-SELETIVA."** apresentado pelo Departamento de **CIRURGIA**.


Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Anuar Ibrahim Mitre**

Pesquisador (a) Exeçutante: **Cipriano da Cruz Formiga**

CAPPesq, 18 de Setembro de 2007




Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão
de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa**

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO**TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE AUXÍLIO**

PROCESSO Nº 2008/58420-7

O Conselho Técnico-Administrativo da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, doravante denominada **OUTORGANTE**, usando das atribuições que lhe confere o Artigo 14, letra "b", da Lei Estadual nº 5.918, de 18 de outubro de 1960, e de acordo com as especificações, cláusulas e condições descritas a seguir e nos Anexos, que são parte integrante deste Termo, concede:

OUTORGADO

ANUAR IBRAHIM MITRE

CPF: 460.236.158-72

CÓPIA
SEM VALOR OFICIAL



INSTITUIÇÃO

01 001 029 - FAC MEDICINA/USP

LINHA DE FOMENTO

AUXILIO PESQUISA - REGULAR

PROJETO

REPERCUSSOES MORFOLOGICAS E FUNCIONAIS EM PARENQUIMA RENAL DE COELHO
SUBMETIDO A ISQUEMIA: COMPARAÇÃO ENTRE MODALIDADES DE ISQUEMIA
SELETIVA E NÃO-SELETIVA.

ÁREA

04010000 - MEDICINA

PERÍODO

01/02/2009 a 31/01/2010

RELATÓRIOS CIENTÍFICOS ATÉ:

28/02/2010

PRESTAÇÃO DE CONTAS ATÉ:

28/02/2010

OBSERVAÇÕES

- Qualquer alteração na destinação dos recursos concedidos, inclusive a utilização de saldos resultantes de diferença entre os preços previstos no projeto e os preços efetivamente pagos, deve ser previamente autorizada pela Outorgante.
- Material de consumo (se houver): Caso sejam adquiridos materiais que não sejam manifestamente necessários a realização deste projeto, a Outorgante poderá impugnar as despesas correspondentes na prestação de contas.
- O Outorgado reconhece que o auxílio concedido, nos termos aqui descritos, viabilizam plenamente a execução do projeto, salvo circunstâncias imprevisíveis no ato da assinatura. Solicitações de qualquer alteração de orçamento, exceto em casos emergenciais, poderão ser apresentadas por ocasião da apresentação do(s) relatório(s) científico(s).
- A aquisição de material radioativo, nacional ou importado, fica condicionada a entrega a FAPESP do comprovante de registro do Outorgado e da Instituição na CNEN.
- As instruções para a prestação de contas deverão ser consultadas através do portal da FAPESP no endereço: www.fapesp.br/formularios.