



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
**Centro Biomédico**  
**Faculdade de Ciências Médicas**

José Aurelino Damasceno Ferreira Filho

**Estudo experimental do rim suíno submetido a diferentes tempos de  
isquemia quente com e sem o uso de manitol**

Rio de Janeiro

2017

José Aurelino Damasceno Ferreira Filho

**Estudo experimental do rim suíno submetido a diferentes tempos de isquemia quente  
com e sem o uso de manitol**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema Urogenital.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio

Coorientadores: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza

Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Sampaio

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

F383 Ferreira Filho, José Aurelino Damasceno.

Estudo experimental do rim suíno submetido a diferentes tempos de isquemia quente com e sem o uso de manitol. / José Aurelino Damasceno Ferreira Filho. – 2017.

72 f.

Orientador Francisco José Barcellos Sampaio

Coorientadores: Diogo Benchimol de Souza

Marco Aurélio Pereira Sampaio

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

1. Rim – Teses. 2. Suínos – Teses. 3. Isquemia quente. 4. Manitol. I. Sampaio, José Barcellos. II. Souza, Diogo Benchimol de. III. Sampaio, Marco Aurélio Pereira. IV. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. V. Título.

CDU 616.61-089.87

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

José Aurelino Damasceno Ferreira Filho

**Estudo experimental do rim suíno submetido a diferentes tempos de isquemia quente com e sem o uso de manitol.**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema Urogenital.

Aprovada em 31 de maio de 2017

Orientador : Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Coorientadores: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Sampaio

Universidade Federal Fluminense

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Luciano Alves Favorito

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Edmundo Jorge Abílio

Universidade Estadual do Norte Fluminense

---

Prof. Dr. Marcelo Abidu Figueiredo

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

---

Dr. João P. Martins Carvalho

Hospital Federal Cardoso Fontes

Rio de Janeiro

2017

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais: Damasceno, que me deixou cedo demais e à minha querida mãe Celyr, que me ensinou e deu tudo o que eu tenho de melhor, que me deixou faz pouco tempo, cheio de saudades. Aos meus queridos filhos Pedro e Marina e à minha mulher Margarete que sempre me incentivam e amam e que terão para sempre o meu amor. Aos meus irmãos, e que nunca se esqueçam do quanto somos fortes quando unidos. Dedico também este trabalho a todas as pessoas que desde há muito tempo estão ao meu lado. Do meu lado, inspirando e incentivando as minhas ações que esperam, sinceramente, levem-me a um patamar pessoal e profissional sempre melhor, para sua grata felicidade. São familiares, velhos amigos, futuros também, pessoas que fui encontrando por aí, e que por afinidade, confiança, coincidência ou por outra razão qualquer, criaram-se vínculos que sei praticamente eternos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao Programa de pós-graduação em Fisiocirurgia e Ciências Cirúrgicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ, na pessoa do seu coordenador Professor Doutor Francisco José Barcellos Sampaio, a quem aprendi a admirar, pelo privilégio de cursar o doutorado nesta Pós-graduação.

Às agências de fomento: CAPES, CNPq e FAPERJ, pela contribuição institucional para com o meu trabalho.

Agradeço a todos os professores do programa com quem tive a oportunidade de aprender e tornar-me amigo, assim como aos colegas de curso que muito me ajudaram e ensinaram nos trabalhos de bancada e na rotina do laboratório.

Ao Professor Doutor Edmundo Jorge Abílio, meu amigo, que sempre que está comigo me causa crescimento profissional de qualidade. Agradeço por me apresentar ao curso de Pós-graduação em Fisiocirurgia e Ciências Cirúrgicas.

Ao meu querido amigo e orientador Professor Doutor Diogo Benchimol de Souza, pela oportunidade de cursar este programa, pela confiança que teve em mim, e que me fez redescobrir a cirurgia por meio da videolaparoscopia.

Agradeço ao meu orientador Professor Doutor Marco Aurélio Pereira Sampaio por toda ajuda durante o meu doutorado.

Agradeço ao Professor Doutor Waldemar da Silva Costa, por todo o apoio ao meu trabalho, pela sua simpatia, amizade e inteligência, qualidades estas que tive a sorte de perceber de imediato, quando do meu ingresso no curso.

Agradeço à minha casa, a Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense - UFF, nas pessoas da Professora Doutora Nádia Almosny, à época diretora da Faculdade de Veterinária, e do Professor Doutor Marco Antônio Pinto Romão, na época chefe de Departamento de Patologia e Clínica – MCV, por terem, dentro do possível, viabilizado meu afastamento para que pudesse cursar o doutorado.

Agradeço ao Hospital Universitário Veterinário Professor Firmino Mársico Filho, da Faculdade de Veterinária – UFF, na figura do Professor Doutor Amary Nascimento

Junior, à época, seu diretor, pela cessão do equipamento de videolaparoscopia, essencial para a realização dos inúmeros trabalhos experimentais por nós realizados, inclusive os presentes nesta tese.

Não posso esquecer a inestimável ajuda e colaboração dos amigos e colegas Médicos Veterinários Anestesiistas: Professor Doutor Fábio Áscoli, Douglas dos Santos Castro, Raquel Gonçalves Sartori, Ana Clara Barreto, dos meus monitores de Semiologia Veterinária, Leonardo Mayer, João Gabriel (Macuco), todos os estudantes, que por vontade de ajudar e aprender, muito contribuíram.

A boa vontade e solicitude do meu amigo Professor Doutor Everaldo Lima Botelho, coordenador da Fazenda Escola na ocasião da execução dos trabalhos experimentais, assim como os funcionários da Fazenda Escola em Cachoeiras de Macacu, na figura do Osvaldo Cesar Procópio, o Nonô, os meus ternos agradecimentos.

Agradeço com muita sinceridade aos meus grandes amigos e colegas na disciplina de Semiologia Veterinária, os Professores Denise Botelho de Oliveira Braga e Paulo Cesar Amaral Ribeiro da Silva, os primeiros que acreditaram na minha capacidade profissional e muito contribuíram para que me tornasse finalmente um Professor Universitário.

Agradeço a todos os meus alunos e ex-alunos, motivo do trabalho do educador, pelo convívio e por ter a grata satisfação de presenciar seu crescimento intelectual e profissional.

Não posso me esquecer dos amigos que me estimularam a participar deste sonho realizado que são a Elaine, o Pitombo e a Mariane que me colocaram na linha de largada para o concurso para o magistério.

Faço também uma breve pausa, para me desculpar com todas as pessoas, importantíssimas na minha carreira e vida que por lapso de memória ou caduquice,tenha esquecido nomear.

Quero que saibam que estão na minha vida e sonhos mais sublimes.

Quero por fim e começo agradecer a Deus e a Nossa Senhora de Fátima por tudo.

## RESUMO

FERREIRA FILHO, José Aurelino Damasceno. **Estudo experimental do rim suíno submetido a diferentes tempos de isquemia quente com e sem o uso de manitol.** 2017. 72 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) –Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito de diferentes tempos de isquemia renal quente, com e sem a utilização de manitol como protetor renal aplicado durante procedimentos cirúrgicos renais como a nefrectomia parcial envolvendo isquemia quente. As oclusões temporárias da artéria e veia renal são necessárias, tanto para suprimir a hemorragia como para permitir um campo operatório livre de sangue. Foram realizadas análises estereológicas para avaliar a possível diminuição do número de glomérulos e função renal no modelo suíno. Para isso, foram utilizados 40 suínos (*Sus domesticus*), divididos em 5 grupos: Sham- sem isquemia, grupos de 10, 20 e 30 minutos de isquemia renal quente, e o grupo manitol (isquemia quente 30 minutos) via laparoscópica. Foram coletadas amostras de sangue no dia da cirurgia, aos 10 e 20 dias de pós-operatório, para dosagem de creatinina dos vários grupos. A eutanásia foi feita aos 21 dias após as cirurgias. Os rins foram identificados de acordo com os grupos. O volume (método Scherle) e o peso foram medidos, assim como a relação córtex/rim. Foram retirados pequenos fragmentos da região cortical de forma aleatória para processamento pelas técnicas histológicas. Foram estimados densidade volumétrica de glomérulos ( $V_v$  [Glom]), o volume médio ponderado dos glomérulos (VWGV), obtendo-se o número total de glomérulos de cada rim. No grupo Sham, G10 e G20 não houve diferença estatisticamente significativa. Não houve diferença na ( $V_v$  [Glom]) e VWGV entre grupos. A isquemia quente por 20 minutos ou menos, não causou a perda de néfrons estatisticamente significativa. As taxas de creatinina analisadas em todos os grupos não mostraram alterações estatisticamente significativas. O peso e o volume dos rins submetidos a 30 minutos de isquemia foram reduzidos em 6,2% e 6,3%, respectivamente, em comparação com rins contralaterais. Nos rins submetidos à isquemia quente por 30 minutos foram reduzidos em 24,5% ou 290.000 glomérulos. Mostramos que há uma correlação negativa estatisticamente significativa entre o tempo de isquemia quente e o número de glomérulos.  $P < 0,05$ ;  $R^2 = 0,9147$ , com uma perda estimada de 8000 néfrons para cada minuto de isquemia. No mesmo estudo, foi observado que no grupo em que se utilizou o manitol (com isquemia quente 30 minutos), este promoveu uma proteção para o parênquima renal estatisticamente significativa quando comparada com o grupo de 30 minutos sem a utilização de manitol, onde houve uma redução estatisticamente significativa no número de néfrons. Com base nestes resultados podemos concluir que: a análise dos níveis séricos de creatinina não são testes fidedignos para avaliação da função renal, o tempo de 30 minutos de isquemia renal quente causa lesões importantes no rim e deve ser evitado, 8000 néfrons são perdidos a cada minuto sob isquemia e que o uso do manitol protegeu de fato o parênquima renal.

Palavras-chaves: Nefrectomia parcial. Isquemia renal quente. Protetor renal. Manitol.

Suínos.



## ABSTRACT

FERREIRA FILHO, José Aurelino Damasceno. **Experimental study of the pig kidney submitted to different times of warm ischemia with and without the use of mannitol.** 2017. 72f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Our objective is to study the effects of different renal warm ischemia times, with and without the use of Mannitol as kidney protector applied during renal surgical procedures like a partial nephrectomy involving warm ischemia. The temporary occlusion of the renal artery and vein, necessary both to suppress bleeding and to allow a free operating field of blood. Stereological analyzes were performed to assess possible decrease in the number of glomeruli and renal function in porcine model. For this, were used 40 pigs (*Sus domesticus*), divided into 5 groups: Sham- without ischemia, groups 10, 20 and 30 minutes of renal warm ischemia, and Mannitol group (warm ischemia 30 minutes) via laparoscopic. Dosed creatinine of the various groups. The kidneys identified according to the groups. The weight and volume (Scherle method) were measured, also cortico-medullary ratio. Cortical fragments were removed randomly, processed for histological technique. Were estimated volumetric density of clusters ( $V_v$  [Glom]), the weighted average volume of the glomeruli (VWGV), obtaining the total number of glomeruli from each kidney. In the Sham group, G10 and G20 there was no statistically significant difference. There was no difference in the  $V_v$  [Glom] and VWGV between groups. The warm ischemia for 20 minutes or less, did not cause loss of nephrons statistically significant. The creatinine rates analyzed in all groups showed no statistically significant changes. The weight and volume of the kidneys subjected to 30 minutes of ischemia were decreased by 6.2% and 6.3%, respectively, compared to contralateral kidneys. Were reduced by 24.5% or 290,000 glomeruli submitted to warm ischemia for 30 minutes. There is a statistically significant negative correlation between the warm ischemia time and the number of glomeruli.  $p < 0.05$ ;  $r^2 = 0.9147$ . There are an estimated loss of nephrons 8000 for each minute of warm ischemia. In the same study, it was observed that in the group where used mannitol (with warm ischemia 30 minutes), this promoted a protection to the renal parenchyma statistically significant compared with the group 30 minutes arteriovenous warm ischemia without the use of mannitol, where there was a statistically significant reduction in the number of nephrons. Based on these results we conclude that: the analysis of serum creatinine levels are not reliable tests to evaluate renal function, time 30 minutes of renal warm ischemia causes significant kidney damage and should be avoided, 8000 nephrons are lost to each minute under ischemia and the use of mannitol in fact protected the renal parenchyma.

Keywords: Partial nephrectomy. Warm ischemia. Protector agents. Mannitol. Swine.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 – Laboratório de Cirurgia Experimental da Fazenda Escola da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense..... | 20 |
| Figura 2 – Instalações da Unidade de Pesquisa Urogenital.....  | 20 |
| Figura 3 – Suínos utilizados no experimento.....   | 21 |
| Figura 4 – Suíno sob anestesia geral inalatória.....   | 23 |
| Figura 5 – O procedimento cirúrgico laparoscópico.....   | 23 |
| Figura 6 – Rim suíno após 30 minutos de isquemia quente.....   | 25 |
| Figura 7 – Rim suíno após 30 minutos de isquemia, com o uso de manitol..   | 25 |
| Figura 8 – Rins removidos em bloco durante a necropsia.....  | 27 |
| Figura 9 – Pesagem do rim em balança de precisão.....  | 28 |
| Figura 10 – Aferição do volume renal pelo método de Scherle.....   | 29 |
| Figura 11 – Aferição da largura da faca cirúrgica.....   | 30 |
| Figura 12 – Rins cortados no sentido longitudinal, em duas metades.....  | 30 |
| Figura 13 – Metade de um rim suíno seccionado transversalmente.....  | 31 |
| Figura 14 – Cortes longitudinais e transversais em rim suíno.....  | 31 |
| Figura 15 – Superfície de corte transversal de uma das metades de um rim suíno.....  | 32 |
| Figura 16 – Mensuração da relação córtex/rim.....  | 33 |
| Figura 17 – Grade M42 para estimar a densidade volumétrica de glomérulos (Vv[Glom]).....   | 34 |
| Figura 18 – Aplicação de sistema teste sobre fotomicrografia de córtex de rim para medição do VWGV.....  | 35 |
| Figura 19 – Fotomicrografias de córtex renal de porcos do experimento.....   | 39 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|  |    |
|--|----|
| Gráfico 1 – Peso dos rins submetidos a 30 minutos de isquemia quente.....  | 37 |
| Gráfico 2 – Volume dos rins submetidos a 30 minutos de isquemia quente.....  | 38 |
| Gráfico 3 – Número de glomérulos dos rins submetidos a 30 minutos de isquemia quente arteriovenosa.....                                    | 40 |
| Gráfico 4 – Número de glomérulos dos rins suínos submetidos à isquemia quente arteriovenosa nos grupos G Sham, G10, G20 e G30.....         | 40 |
| Gráfico 5 – Correlação negativa significativa entre o tempo de isquemia quente e o número de glomérulos no rim.....                        | 41 |
| Gráfico 6 – Peso dos rins direitos e esquerdos submetidos à isquemia renal quente arteriovenosa por 30 minutos com o uso do manitol.....   | 42 |
| Gráfico 7 – Volume dos rins direitos e esquerdos submetidos à isquemia renal quente arteriovenosa por 30 minutos com o uso do manitol..... | 42 |
| Gráfico 8 – Rins submetidos à isquemia quente arteriovenosa por 30 minutos sem o uso do manitol, e com o uso do mesmo.....                 | 43 |
| Gráfico 9 – Número de glomérulos no grupo sham, grupo 30 minutos e o grupo onde se utilizou o manitol como protetor renal.....             | 44 |

## LISTA DE TABELAS

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Tabela 1 – | Mensuração dos níveis séricos de creatinina.....                               | 44 |
| Tabela 2 – | Mensuração dos níveis séricos de creatinina sem e com o uso do<br>manitol..... | 45 |
| Tabela 3 – | Dados aferidos dos rins suínos do experimento.....                             | 46 |
| Tabela 4 – | Dados aferidos dos rins suínos com uso do manitol.....                         | 47 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                         |  |
|-------------------------|--|
| ATP                     | Adenosina trifosfato                     |
| G Sham                  | Grupo controle sem isquemia renal quente |
| G 10                    | Grupo submetido à isquemia de 10 minutos |
| G 20                    | Grupo submetido à isquemia de 20 minutos |
| G 30                    | Grupo submetido à isquemia de 30 minutos |
| G Man                   | Grupo Manitol como protetor              |
| I/R                     | Isquemia Reperusão                       |
| MPA                     | Medicação pré-anestésica                 |
| RCM                     | Relação Córtico-Medular                  |
| VR                      | Volume Renal                             |
| (V <sub>v</sub> [Glom]) | Densidade Volumétrica de Glomérulos      |
| (VWGV)                  | Volume Médio Ponderado dos Glomérulos    |

## SUMÁRIO

|       |   |    |
|-------|---|----|
|       | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 13 |
| 1     | <b>OBJETIVOS</b> .....  | 18 |
| 1.1   | <b>Geral</b> .....  | 18 |
| 1.2   | <b>Específicos</b> .....  | 18 |
| 2     | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 19 |
| 2.1   | <b>Locais de estudo</b> .....   | 19 |
| 2.2   | <b>Grupos de animais</b> .....  | 19 |
| 2.3   | <b>Técnica cirúrgica</b> .....  | 21 |
| 2.4   | <b>Tempos de Isquemia</b> .....   | 22 |
| 2.5   | <b>Uso do Manitol</b> .....   | 24 |
| 2.6   | <b>Pós-operatório</b> .....   | 26 |
| 2.7   | <b>Eutanásia e necropsia</b> .....  | 26 |
| 2.8   | <b>Peso e Volume renal</b> .....  | 27 |
| 2.8.1 | <u>Relação Córtex/rim</u> .....   | 28 |
| 2.8.2 | <u>Montagem das lâminas</u> .....   | 33 |
| 2.8.3 | <u>Cálculo do (Vv[Glom])</u> .....  | 34 |
| 2.8.4 | <u>Cálculo do VWGV</u> .....  | 35 |
| 2.8.5 | <u>Cálculo do nº de glomérulos</u> .....  | 36 |
| 3     | <b>RESULTADOS</b> .....   | 37 |
| 4     | <b>DISCUSSÃO</b> .....  | 48 |
|       | <b>CONCLUSÕES</b> .....   | 53 |
|       | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 54 |
|       | <b>APÊNDICE</b> .....   | 60 |
|       | <b>ANEXO A</b> - Aprovação do Comitê de Ética .....                             | 70 |
|       | <b>ANEXO B</b> - Comprovação de submissão do 2º artigo científico da tese ..... | 71 |
|       | <b>ANEXO C</b> - Formato final do 2º artigo científico da tese.....             | 72 |

## INTRODUÇÃO

Os tumores renais têm alta prevalência em todo o mundo, constituindo uma condição médica importante em termos de saúde pública e conseqüentemente em valores econômicos. A estimativa para o ano de 2016 foi de 63.000 novos casos diagnosticados, com 14.000 mortes somente nos Estados Unidos [1].

Os tumores renais em estágio T1a (até 4 cm) e T1b (entre 4 e 7 cm)[1, 2] são diagnosticados em sua maioria de forma incidental durante exames de imagem, e correspondem a 48-66% dos novos diagnósticos dos tumores renais [2]. Sabe-se que o uso frequente de novas tecnologias de imagem contribuíram enormemente para o aumento do número de diagnósticos de tumores renais pequenos (T1a e T1b) [3, 4]. Comumente pacientes que se submetem a exames de ultrassonografia, tomografia e/ou ressonância magnética da região abdominal por outros motivos médicos, acabam descobrindo incidentalmente estes tumores pequenos, ainda em estágio localizado [5]. Vários autores descreveram o tratamento cirúrgico pela nefrectomia parcial para estes tumores, ressecando somente o nódulo e a margem cirúrgica de tecido normal peritumoral [6, 7, 8, 9, 10, 11]. O princípio de utilizar esta técnica cirúrgica é de evitar a ressecção de tecido renal normal, evitando futuras complicações ao paciente [8].

Tendo sido comprovado que a nefrectomia radical pode aumentar os riscos de doença renal crônica e eventos cardiovasculares, e assim afetar negativamente a sobrevivência global dos doentes [9], a nefrectomia parcial é hoje considerada o tratamento padrão ouro para tumores renais pequenos, devendo ser a técnica preferencial para pacientes com rim único, portadores de tumores renais pequenos ou médios [10, 11]

A nefrectomia parcial, também chamada cirurgia poupadora de néfrons, apresenta prognóstico oncológico igual à nefrectomia radical, com o benefício de melhor preservação da função renal [3, 12, 13, 14]. Além da cirurgia aberta, pode-se ainda realizar a nefrectomia parcial por acesso laparoscópico ou robótico, com benefícios de menor tempo de internação hospitalar e menor perda sanguínea, além de melhor resultado estético [15].

Para a realização da nefrectomia parcial em condições ótimas, é essencial um campo operatório isento de sangue durante a abertura do rim, condição esta obtida pela oclusão temporária do pedículo renal, que causa isquemia do órgão. O rim, mesmo sendo um órgão ricamente vascularizado, quando aberto sob isquemia, permite boa visualização do campo operatório, facilitando a ressecção do tumor, com pouca perda sanguínea.

Contudo, a isquemia renal leva à lesão do parênquima do rim, podendo causar insuficiência renal aguda e predispor à doença renal crônica [2,16, 17].

Diferentes técnicas que diminuam a lesão renal provocada pela isquemia têm sido sugeridas. A isquemia fria, com resfriamento renal pela aplicação de gelo ao redor do rim [18, 19] ou pela perfusão do órgão com solução resfriada pela artéria renal [20] ou ureter [21], foram sugeridas. Contudo tais técnicas adicionam custos, tempo e complexidade ao procedimento cirúrgico, principalmente quando realizado por técnica minimamente invasiva, e por isto, têm sido pouco utilizadas na rotina clínica.

Assim, a isquemia renal quente é o principal método utilizado para exérese incruenta dos tumores renais. Porém, o tempo ao qual o rim fica submetido à isquemia quente, deve ser limitado, sob pena de lesão renal provocada pela isquemia/reperfusão (I/R) [7].

A lesão renal causada pela isquemia/reperfusão se dá pela ativação de interleucinas, com resposta inflamatória tecidual difusa. No insulto isquêmico haverá ainda falha na fosforilação oxidativa e esgotamento das reservas de adenosina trifosfato (ATP), causando ingurgitamento celular por difusão passiva de água para dentro das células, e consequentemente morte celular. Ainda, os radicais livres resultantes da degradação do ATP, são agentes importantes no processo de lesão renal provocada pelo evento isquemia/reperfusão, causando danos às células [22].

Quanto maior o tempo da isquemia, maior a magnitude da injúria isquemia/reperfusão (I/R) [23, 24]. Os radicais livres afetam as proteínas de membrana, diminuindo a produção de ATP pelas mitocôndrias. Com a continuidade do insulto, a ativação de mais interleucinas, aumentará os danos às membranas celulares. [25, 26, 27, 28].

A reperfusão subsequente à isquemia potencializa estes danos teciduais, aumentando a resposta inflamatória e a liberação de espécies reativas ao oxigênio, que contribuem para a necrose e apoptose de células e disfunção renal. Tais danos afetam a função pós-operatória, o que pode levar ao início de uma doença renal crônica [29, 30].

Tradicionalmente, considerava-se que uma isquemia renal quente não deveria passar de 30 minutos, sendo este o tempo limite para que não houvesse perda da função renal pós-operatória [31, 32]. Contudo, mais recentemente verificou-se que a isquemia renal quente acima de 20 ou 25 minutos pode levar à importante diminuição da função renal, inclusive culminando com insuficiência renal crônica e falência renal após alguns anos do procedimento [33, 34, 35].



Vários estudos já demonstraram que a isquemia renal quente por tempo prolongado durante a nefrectomia parcial causará lesão residual no tecido, o que é prejudicial para a função pós-operatória, que pode resultar em doença renal crônica [29, 33, 34]. Segundo Simmons et al., pacientes submetidos à isquemia quente por mais de 40 minutos, apresentaram atrofia e diminuição do volume renal [36].

Estudos em rins humanos demonstraram que a degeneração celular começa após 20-30 minutos de clampeamento. Com tempo de isquemia quente maior do que 60 minutos, ocorre degeneração completa do néfron, sendo recomendado um tempo máximo de 30 minutos, devendo-se manter a isquemia quente por menos de 20 minutos, independente da abordagem cirúrgica segundo Becker F, et al. Eur Urol 2009.

Outros autores depois da revisão de procedimentos cirúrgicos de nefrectomia parcial laparoscópica ou aberta envolvendo isquemia quente, consideraram a média de 34 minutos com resultados positivos relacionados à taxa de filtração glomerular e danos ao parênquima, aceitando a existência de alguma relação desta média de tempo com o surgimento de uma nefropatia relativa [37].

O tempo ideal de isquemia quente é bastante questionado, com alguns investigadores avaliando os tempos de 20, 30, 40 minutos ou mais que provocaria declínio da função renal. Patel e Eggener cunharam a frase "cada minuto é importante" para enfatizar o efeito negativo do aumento do tempo de isquemia quente na função renal pós-operatória em diversos procedimentos [12,38].

Pacientes com um rim único, submetidos à nefrectomia parcial com um tempo de isquemia quente acima de 30 minutos tiveram grande probabilidade de desenvolver alteração na função renal a curto e longo prazo, sugerindo que o tempo de isquemia é um parâmetro relevante a se considerar nestes pacientes [39].

Godoy et al. relataram que o tempo de isquemia abaixo de 40 minutos é seguro em pacientes com rim contralateral normal [40], enquanto em outro estudo, Pouliot et al. relatam que pacientes com 2 rins funcionais apresentaram, em curto prazo, perda acelerada da função renal quando o tempo de isquemia quente era maior do que 30 minutos [2, 32].

Alguns estudos relatam que o efeito da isquemia e reperfusão renal é mínimo após 6 meses de pós-operatório quando o tempo de isquemia quente é menor do que 25 minutos [41]. Ainda segundo os autores, aos 6 meses a recuperação funcional renal foi quase completa quando se limitou o tempo de isquemia quente de 20 a 25 minutos, enquanto que os pacientes submetidos à isquemia por mais de 25 minutos não tiveram uma recuperação completa, havendo neste grupo, perda de 20% de sua função renal [41].

Outros autores avaliaram tempos de isquemia quente e relataram que 25 minutos foi o melhor ponto de corte para distinguir entre os pacientes que desenvolveram ou não, alterações da função renal a curto e longo prazo. Estes autores aceitam como seguro um intervalo de 20 a 25 minutos de isquemia quente [2, 9].

Assim, o tempo de isquemia quente tem sido considerado um fator determinante no surgimento da insuficiência renal pós-operatória à nefrectomia parcial, devendo-se reduzir ao mínimo possível o tempo de oclusão vascular [3].

O uso de fármacos protetores contra os efeitos deletérios produzidos nos eventos isquemia/reperfusão renal tem sido bastante investigado. O alopurinol, a n-acetilcisteína, vitamina C e a deferoxamina foram eficazes em promover a remoção de radicais livres produzidos no evento isquemia/reperfusão renal [42], bem como o alfa-tocoferol (vitamina E) [43], assim como o levosimendan [44] e a eritropoietina [45], sendo, segundo os autores, eficazes em promover a remoção de radicais livres produzidos durante o evento isquemia/reperfusão renal.

Entretanto, o manitol é o mais comumente utilizado na rotina clínica. Usado durante o transoperatório, acredita-se que possa proteger o rim clampeado, e o contralateral durante a isquemia. Comumente o manitol é também empregado para proteção renal em cirurgias intracardíacas com parada circulatória [46].

Existem evidências de que ao aumentarmos a diurése, isto pode de fato reduzir os danos renais relacionados à isquemia quente [47, 48, 49, 50, 51]. Portanto, os diuréticos são geralmente usados em procedimentos cirúrgicos que exijam a parada da circulação, como na nefrectomia parcial especulando-se que o manitol possa ter algumas vantagens sobre outros diuréticos, devido a uma possível atividade antioxidante [52, 53].

Entretanto, estas informações não são suficientes para se recomendar o uso do manitol como agente protetor renal durante os procedimentos envolvendo a isquemia [54]. Em um trabalho recente sobre o uso de manitol durante nefrectomia parcial, os resultados de provas de função renal foram comparados entre os pacientes que receberam manitol intravenoso no transoperatório e aqueles que não fizeram o uso deste. A conclusão a que chegaram estes autores é de que o manitol não influenciou na recuperação da função renal e que estudos concebidos adequadamente para o uso do manitol se fazem necessários [55].

Mesmo utilizando-se o manitol de maneira rotineira em procedimentos operatórios em que se faça a interrupção da irrigação, como na isquemia renal quente, não existe evidência que comprove algum benefício pelo uso do mesmo. De modo contrário ao esperado, o uso transoperatório deste fármaco não influenciou a taxa de filtração

glomerular em pacientes submetidos à nefrectomia parcial [55]. Porém, neste estudo, não houve uma clara separação dos pacientes que foram submetidos à isquemia renal fria ou quente.

Desse modo, torna-se necessário a realização de um estudo objetivo para avaliar os efeitos dos tempos de isquemia quente sobre o parênquima renal, assim como, se o uso do manitol intra-operatório, durante a isquemia quente, proporcionará de fato proteção ao parênquima renal.

## **1 OBJETIVOS**

### **1.1 Geral**

Estudar o efeito de diferentes tempos de isquemia renal quente sobre o parênquima renal e o efeito protetor do manitol intra-operatório sobre o rim, em modelo suíno.

### **1.2 Específicos**

Avaliar os níveis séricos de creatinina após diferentes tempos de isquemia renal quente.

Avaliar o número de glomérulos após diferentes tempos de isquemia renal quente.

Avaliar se há correlação entre o tempo de isquemia quente e o número de glomérulos.

Avaliar o efeito do manitol durante isquemia renal quente por 30 minutos sobre os níveis séricos de creatinina.

Avaliar o efeito do manitol durante isquemia renal quente por 30 minutos sobre o número de glomérulos.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

O presente estudo foi aprovado pela comissão de ética para o cuidado e uso de animais experimentais (Anexo A).

### **2.1 Locais do estudo**

Toda a parte cirúrgica deste trabalho foi realizada nas dependências do Laboratório de Cirurgia Experimental, localizado na Fazenda Escola em Cachoeiras de Macacu, pertencente à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense (Figura 1), enquanto os processamentos histológicos e estereológicos foram realizados nas instalações da Unidade de Pesquisa Urogenital da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Figura 2).

### **2.2 Grupos de animais**

Durante o experimento foram utilizados 40 porcos (*Sus domesticus*), machos, castrados, da linhagem Large White, pesando em média 25 kg, procedentes de granjas comerciais, que foram alojados em baias coletivas (Figura 3).

Figura 1– Laboratório de Cirurgia Experimental da Fazenda Escola da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense.



Legenda: Centro cirúrgico utilizado para os procedimentos operatórios do experimento, onde observamos: carrinho de anestesia, monitor multiparâmetro e o equipamento para videolaparoscopia.  
Fonte: O autor, 2016.

Figura 2 – Instalações da Unidade de Pesquisa Urogenital.



Legenda: Laboratório de processamento de material para histologia. Unidade de Pesquisa Urogenital. Faculdade de Ciências Médicas - Universidade do Estado do Rio de Janeiro.  
Fonte: O autor, 2016.

Figura 3– Suínos utilizados no experimento.



Legenda: Suínos utilizados no experimento, acondicionados em baia coletiva da Fazenda Escola da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense.

Fonte: O autor, 2016.

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos, como descritos abaixo:

GSham– oito animais (Sham, não sofreram isquemia)

G 10– oito animais (isquemia renal por 10 minutos)

G 20– oito animais (isquemia renal por 20 minutos)

G 30– oito animais (isquemia renal por 30 minutos)

G Man– oito animais (isquemia renal por 30 minutos, com uso de manitol)

### 2.3 Técnica cirúrgica

Após prévio jejum, os animais eram sedados com medicação pré-anestésica (MPA), constituída de ketamina, midazolam e acepromazina, nas doses de 5mg/Kg, 0,5mg/Kg e 0,05mg/Kg, respectivamente, misturados na mesma seringa, pela via subcutânea. A MPA

se fazia necessária para facilitar o manejo dos animais nas próximas etapas, tais como: tricotomia da região operatória, coletas de sangue, canulação de veias para administração de fluidos. A indução anestésica era realizada utilizando-se o propofol administrado por via intra-venosa (dose efeito), suficiente para permitir a intubação oro-traqueal.

Sob anestesia geral volátil com isoflurano (Figura 4) e condições de assepsia, os animais foram posicionados na mesa cirúrgica em decúbito lateral direito. Este decúbito proporcionou uma melhor acomodação dos órgãos abdominais. Especialmente as alças intestinais, que eram facilmente deslocadas para fora do campo operatório, favorecendo o acesso à loja renal esquerda. Assim, o rim esquerdo era manipulado durante todos os procedimentos videolaparoscópicos. Este posicionamento também facilitou a aplicação lateral dos 3 portais utilizados em nosso experimento. Após a incisão da pele, divulsão da musculatura e abertura do peritônio, o portal de Hasson era o primeiro a ser aplicado para a realização do pneumoperitônio e introdução da ótica. Já sob videolaparoscopia, eram então inseridos o 2º e 3º portais para a passagem dos instrumentais cirúrgicos utilizados nos procedimentos (Figura 5), como descrito previamente [56].

#### **2.4 Tempos de isquemia**

Após a abordagem do rim esquerdo e abertura do peritônio, os vasos renais foram dissecados e então realizado o clampeamento em bloco da artéria e veia renais com o uso de pinça vascular laparoscópica. A correta oclusão do fluxo sanguíneo renal foi verificada pela mudança na coloração do rim (Figura 6).



Figura 4 – Suíno sob anestesia geral inalatória.



Legenda: Animal utilizado no experimento, sob anestesia geral volátil administrada por sonda endotraqueal, com monitoramento multiparâmetro, ainda em decúbito esternal.  
Fonte: O autor, 2015.

Figura 5–O procedimento cirúrgico laparoscópico.



Legenda: Animal durante o procedimento cirúrgico, posicionado em decúbito lateral direito, sob videolaparoscopia por acesso com três trocartes.  
Fonte: O autor, 2015.

A isquemia foi mantida por 10, 20, ou 30 minutos de acordo com o grupo a ser estudado. O grupo Sham, obedeceu a todas as etapas cirúrgicas, exceto o clampeamento dos vasos renais.

## **2.5 Uso do manitol**

Nos animais do grupo Man, foi administrado manitol (250mg/Kg) [53], infundido pela via intravenosa em um intervalo de tempo de dez minutos. Terminada a infusão do manitol, aguardava-se por 15 minutos para proceder ao clampeamento arteriovenoso renal [55], que neste grupo foi mantido por 30 minutos. Durante os procedimentos realizados com o grupo manitol, observamos que sob o aspecto macroscópico, a coloração do parênquima renal, mesmo submetido a 30 minutos de isquemia, apresentava-se diferente (Figura 7), quando comparados com o aspecto isquêmico do grupo 30 minutos sem o uso do manitol, como vimos na Figura 6.

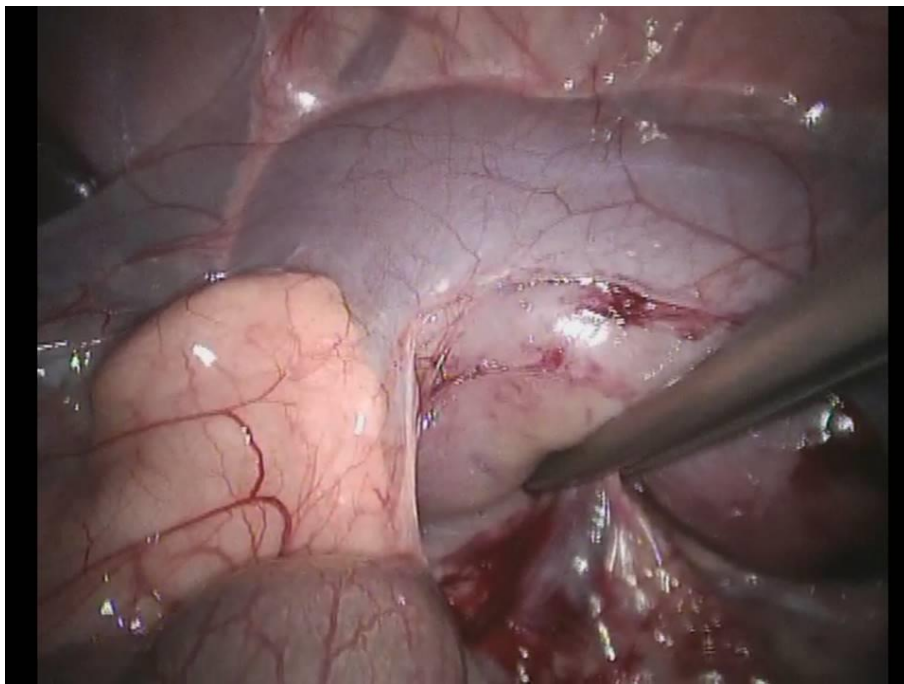
Após o período de tempo de isquemia pretendido, de acordo com o grupo em questão, a pinça vascular era retirada e o fluxo sanguíneo renal retornado ao normal. Em todos os animais, o rim direito não foi abordado e foi considerado controle. Desfeito o pneumoperitônio, os portais eram retirados, os planos musculares e pele suturados de maneira rotineira. Após o despertar anestésico e apresentarem deambulação normal, os animais voltaram a receber água e ração comercial normalmente.

Figura 6 – Rim suíno após 30 minutos de isquemia quente.



Legenda: Aspecto intra-operatório laparoscópico do rim esquerdo de porco submetido a 30 minutos de isquemia arteriovenosa. Notar a coloração isquêmica do órgão e a pinça vascular ocluindo o hilo renal.  
Fonte: O autor, 2015.

Figura7–Rim suíno após 30 minutos de isquemia quente, com o uso de manitol.



Legenda: Aspecto intra-operatório laparoscópico do rim esquerdo de porco sob isquemia arteriovenosa com o uso de manitol. Podemos ver a pinça vascular aplicada. Notar a coloração do parênquima, que mesmo submetido a 30 minutos de isquemia, apresentava-se menos isquêmico.  
Fonte: O autor, 2015.

## **2.6 Pós-operatório**

Durante o período pós-operatório, todos os animais receberam analgésicos opióides (cloridrato de tramadol, 4mg/Kg, pela via subcutânea) e administração de penicilina benzatina 20.000 UI/Kg, pela via intramuscular, além de curativos locais. Durante o experimento não foram utilizadas drogas anti-inflamatórias. Os animais foram avaliados diariamente até o vigésimo primeiro dia de pós-operatório.

Foram coletadas amostras de sangue imediatamente antes da cirurgia, ao décimo e vigésimo primeiro dias. Nessas amostras foram dosadas a creatinina sérica.

## **2.7 Eutanásia e necropsia**

No vigésimo primeiro dia pós-operatório os animais foram submetidos à eutanásia após sobredose de barbitúrico, sendo então realizada a necrópsia. As cavidades foram avaliadas quanto à formação de aderências, sinais de infecção e inspeção macroscópica dos rins. Ambos os rins eram retirados e o rim esquerdo identificado com um fio cirúrgico (Figura 8). Feito isto, os rins foram fixados em formalina tamponada a 10% e acondicionados em frascos identificados com o número do animal.

Figura 8 – Rins removidos em bloco durante a necropsia.



Legenda: Aspecto da peça retirada durante a necropsia, evidenciando os dois rins removidos em bloco. O rim esquerdo identificado pela aplicação de um fio cirúrgico.

Fonte: O autor, 2015.

## 2.8 Peso e volume

Na Unidade de Pesquisa Urogenital, todos os rins foram então pesados (Figura 9) e seus volumes medidos pelo método de Scherle [57].

O rim suspenso por um fio preso a uma haste que se encontrava apoiada fora da balança é imerso completamente, tendo-se o cuidado de evitar que fique em contato com as paredes ou com o fundo do frasco. O peso registrado na balança corresponde ao volume do órgão [57] (Figura 10).

Figura 9 – Pesagem do rim em balança de precisão.



Legenda: Imagem de um rim durante pesagem em balança de precisão, na Unidade de Pesquisa Urogenital. A pesagem é feita após a retirada da cápsula renal.  
Fonte: O autor, 2015.

### 2.8.1 Relação Córtex/rim

Para a mensuração da relação córtico- medular, que chamamos de relação córtex/rim, excluimos as partes que não são medular renal, tal como a gordura, dividimos o rim em duas metades no sentido longitudinal, e cada metade, em cortes transversais, paralelos sequencias, e com medidas iguais. Para tanto, utilizamos uma faca cirúrgica que teve a sua largura medida com auxílio de régua milimetrada (Figura 11).

Na sequência, os rins foram cortados no sentido longitudinal, dividindo o rim em duas metades, após o que iniciou-se os cortes transversais (Figura 12). Em seguida, cada uma destas metades foi cortada no sentido transversal em fatias de 14 mm, de forma sequencial e paralela, com auxílio de faca cirúrgica (Figuras 13 e 14).



Figura 10 – Aferição do volume renal pelo método de Scherle.



Legenda: Becker contendo água destilada sobre uma balança de precisão, sendo esta tarada. O rim suspenso por um fio prês a uma haste, que se encontrava apoiada fora da balança, é imerso completamente, tendo-se o cuidado de evitar que o órgão fique em contato com as paredes ou o fundo do Becker.  
Fonte: Bechara, 2015.

Figura 11 – Aferição da largura da faca cirúrgica.



Legenda: Antes mesmo de se iniciar os cortes do rim, e com o auxílio de uma régua milimetrada foi feita a aferição da largura da faca cirúrgica que mediu 14 mm.

Fonte: O autor, 2015.

Figura 12 – Os rins cortados no sentido longitudinal, em duas metades.



Legenda: Imagem mostrando o corte do rim no sentido longitudinal em duas metades e o início dos cortes transversais, para aferição da relação córtex/rim.

Fonte: O autor, 2015.



Figura 13 - Metade de um rim suíno seccionado transversalmente.



Legenda: Imagem de uma metade de um rim que foi seccionado no sentido transversal em fatias de 14 mm, de forma sequencial e paralela para aferição da relação córtex/rim.  
Fonte: O autor, 2015.

Figura 14 – Cortes longitudinais e transversais em rim suíno.

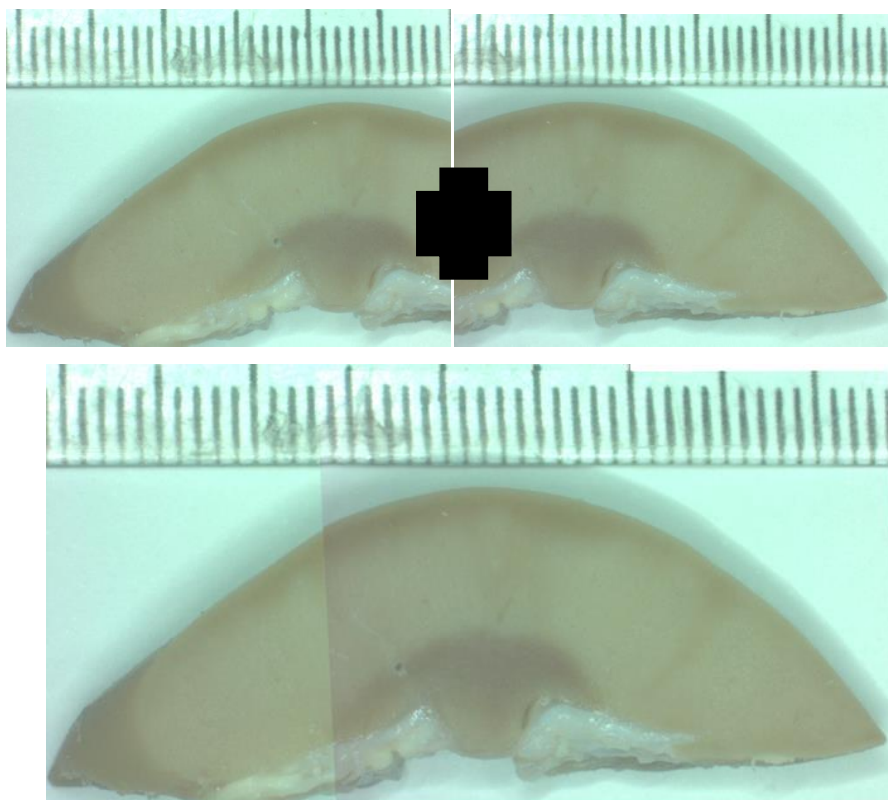


Legenda: Aspecto do rim suíno cortado primeiramente no sentido longitudinal e na sequência foram feitos os cortes transversais paralelos, com auxílio de faca cirúrgica.  
Fonte: O autor, 2015.

As fatias foram montadas em uma bandeja, acompanhadas de régua milimetrada, e fotografada uma das superfícies de corte de cada fatia de rim, de forma sequencial, dando-se início pelas primeiras fatias cortadas e respeitando-se a rotação sequencial da face do

parênquima a ser fotografado. Assim, cada fatia teve uma das superfícies de corte transversal fotografada sob magnificação de 12x no microscópio estereoscópico Zeiss Discovery V8 com câmera Axiocam acoplada. Porém, como o campo fotografado não continha toda a superfície a ser estudada, esta fatia foi fotografada duas ou mais vezes para que toda a superfície de corte fosse capturada. Estas imagens foram então montadas com o auxílio do software Photoshop CS5 Extended, onde as fotos de cada superfície de corte das fatias renais foram alinhadas perfeitamente. Assim tínhamos a imagem completa de cada superfície, de cada fatia do rim para ser analisada (Figura 15). Este procedimento foi feito para as duas metades de cada rim (direito e esquerdo).

Figura 15 – Superfície de corte transversal de uma das metades de um rim suíno.



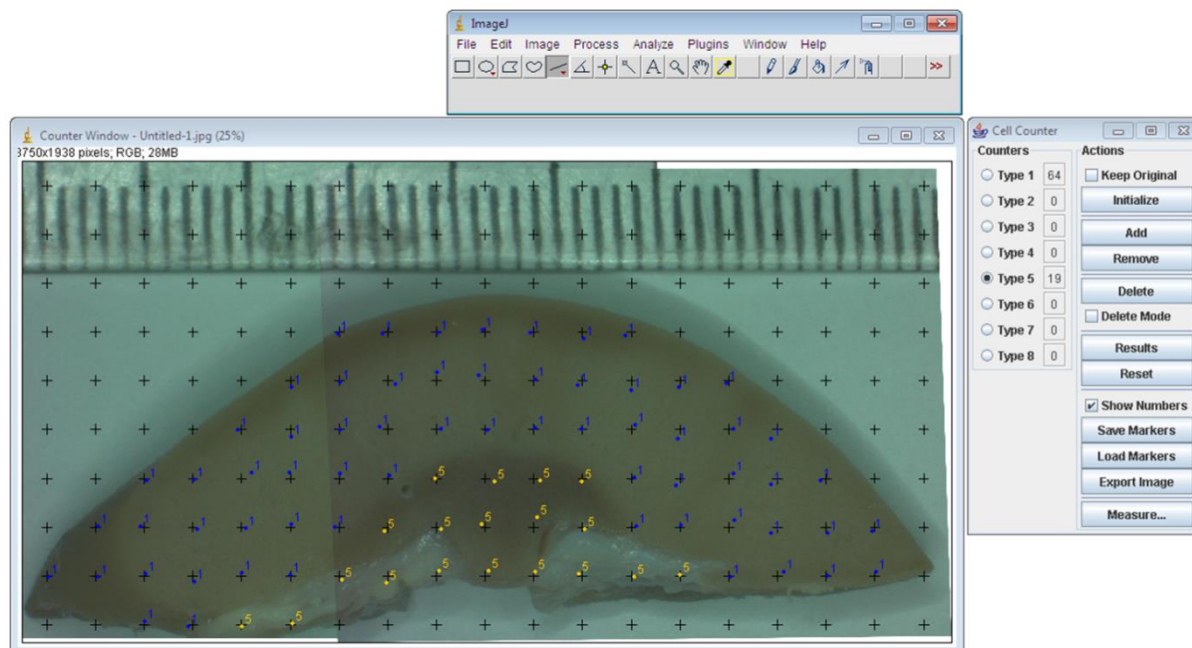
Legenda: Imagens da superfície de corte transversal de uma das metades de um rim suíno (acima). Para se ter a imagem de toda a superfície de corte, as imagens obtidas eram montadas digitalmente e alinhadas perfeitamente como visto na imagem inferior.

Fonte: O autor, 2015.

Nestas imagens, a relação córtex/rim foi obtida com o auxílio do software Image J, utilizando a ferramenta Cellcounter. Para tanto, uma grade de cruzes era projetada sobre a fotografia a ser analisada, e eram contados todos os pontos que incidissem sobre a região

cortical como tipo 1, e em seguida contava-se os pontos que incidiam sobre a região não-cortical, como tipo 5, como mostra a Figura 16 [65].

Figura 16 – Mensuração da relação córtex/rim.



Legenda: Imagem mostrando a técnica de mensuração da relação córtex/rim. Todos os pontos sobre a região cortical são contados como tipo 1, e os pontos sobre a região não-cortical contados como tipo 5.

Fonte: O autor, 2015.

Este procedimento foi realizado para todas as faces dos cortes sequenciais feitos nas duas metades de cada rim, de todos os rins, obtendo-se assim a relação córtex/rim, sendo possível a quantificação do volume cortical de cada rim.

### 2.8.2 Montagem das lâminas

De cada rim (direitos e esquerdos) de cada animal, foram retirados de forma aleatória, pequenos fragmentos da camada cortical. Estes fragmentos foram processados pela técnica histológica de rotina para inclusão em parafina.

Após a inclusão em parafina procedeu-se a microtomia dos blocos histológicos. Foram feitos para cada rim, 5 cortes histológicos não sequenciais com espessura de 5µm. Montadas as lâminas, estas foram coradas pelo método de hematoxilina e eosina e

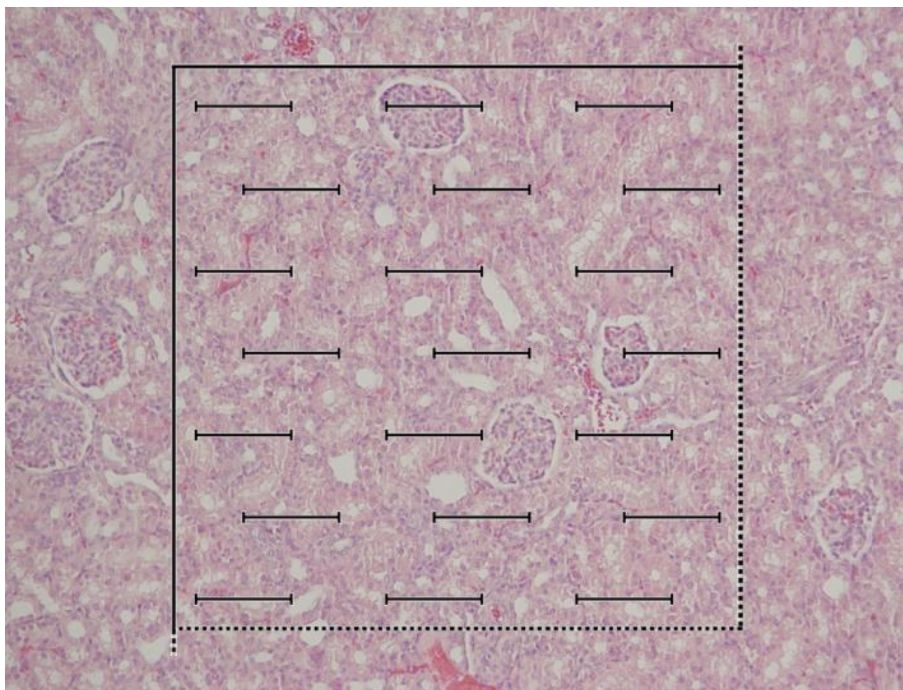


fotografadas com aumento de 200x no microscópio Olympus BX 51 com uma câmera Olympus DP 70.

### 2.8.3 Cálculo da densidade volumétrica de glomérulos ( $V_v$ [Glom])

Foram feitas 5 imagens de 5 campos diferentes de cada lâmina para cada rim de cada animal, num total de 25 fotomicrografias por rim. Nestas imagens foram estimadas a densidade volumétrica de glomérulos ( $V_v$  [Glom]), usando-se o software Image J, pelo método de contagem de pontos com uso da grade M42 [59,60,61, 62], como mostrado na Figura 17.

Figura 17 - Grade M42 para estimar a densidade volumétrica de glomérulos ( $V_v$  [Glom]).

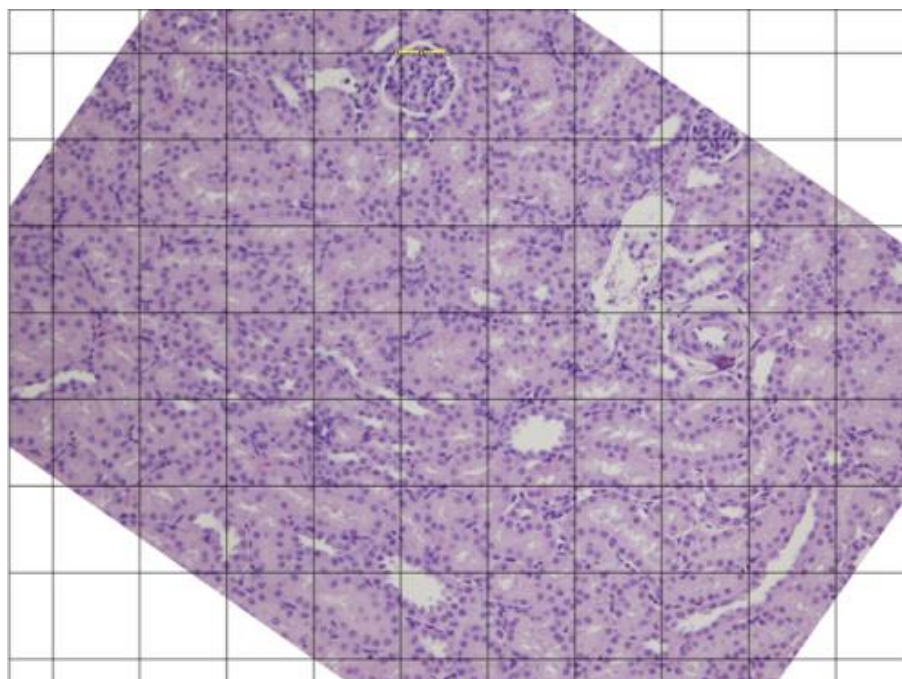


Legenda: Uso da grade M42 sobreposta à fotomicrografia de córtex de rim suíno para estimar a densidade volumétrica de glomérulos ( $V_v$  [Glom]). Os pontos que tocam os glomérulos são contados. Os glomérulos que incidirem com a zona tracejada não são contados. Magnificação de 200x. Hematoxilina e eosina.  
Fonte: O autor, 2015.

#### 2.8.4 Cálculo do volume médio ponderado dos glomérulos - VWGV

Foi analisado também o volume médio ponderado dos glomérulos (VWGV), pela aplicação de uma régua logarítima de 15 classes [63, 64], onde foram analisados 50 glomérulos para cada rim, de cada animal, para este parâmetro. Para tanto os glomérulos a serem medidos eram randomizados pela rotação aleatória da imagem como podemos mostrar na Figura 18.

Figura 18 – Aplicação de sistema teste sobre fotomicrografia de córtex de rim para medição do volume médio ponderado dos glomérulos - VWGV.



Legenda: Rotação aleatória da imagem, e aplicação de sistema teste sobre fotomicrografia de córtex de rim suíno submetido a 20 minutos de isquemia quente, para medição do Volume Médio Ponderado de Glomérulos- VWGV. Notar a linha amarela correspondente à medição pela régua logarítmica sobre o glomérulo no alto do campo.

Fonte: O autor, 2015.

### 2.8.5 Cálculo do número de glomérulos

O número total de glomérulos (N[Glom]) de cada rim foi obtido analisando-se o volume renal, a relação córtico-medular, o  $V_v$ ([Glom]) e o VWGV, para cada animal [66], conforme a equação abaixo:

$$N[\text{Glom}] = ( V_v[\text{Glom}] \times \text{RCM} \times \text{VR} ) / \text{VWGV}$$

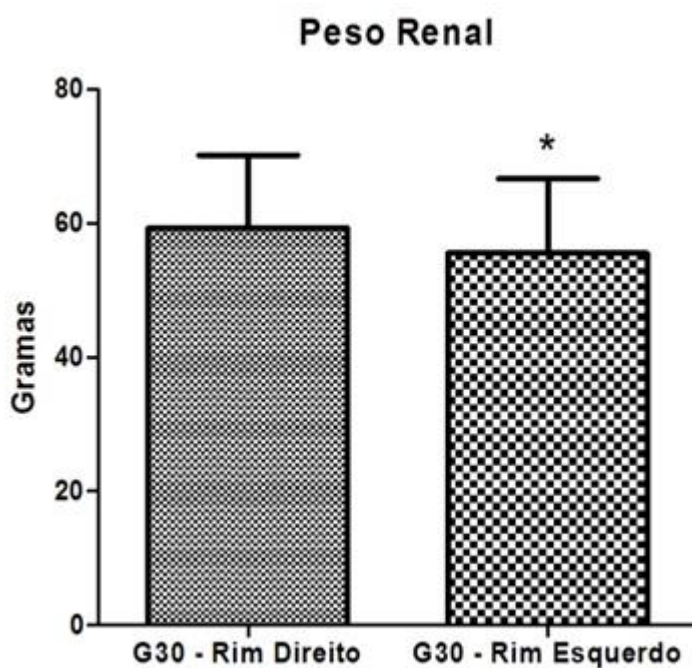
onde RCM é a relação córtico-medular e VR é o volume renal.

Os resultados obtidos para os rins esquerdos (que sofreram isquemia) foram comparados aos obtidos para os rins direitos pelo teste T de Student. Foi testado também se houve correlação entre o tempo de isquemia quente e o número de glomérulos pelo teste de regressão linear. Para todas as análises, considerou-se significativo quando  $p < 0,05$ .

### 3 RESULTADOS

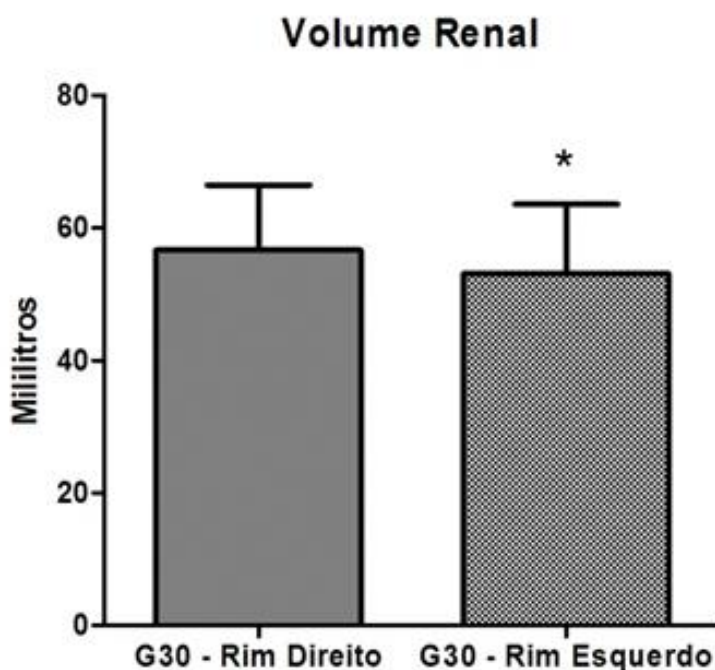
O peso e o volume dos rins submetidos a 30 minutos de isquemia quente apresentaram-se diminuídos em 6,2% e 6,3% respectivamente, quando comparados aos dos rins contralaterais (Gráficos 1 e 2).

Gráfico 1 – Peso dos rins submetidos a 30 minutos de isquemia quente.



Legenda: O peso dos rins submetidos à isquemia quente arteriovenosa por 30 minutos apresentou uma diminuição de 6,2% quando comparados com os que não sofreram isquemia, \* $p < 0,05$ .

Gráfico 2 - Volume dos rins submetidos a 30 minutos de isquemia quente.



Legenda: O volume dos rins submetidos à isquemia quente arteriovenosa por 30 minutos apresentou uma diminuição de 6,3% em relação aos rins contra-laterais, \*  $p < 0,05$ .

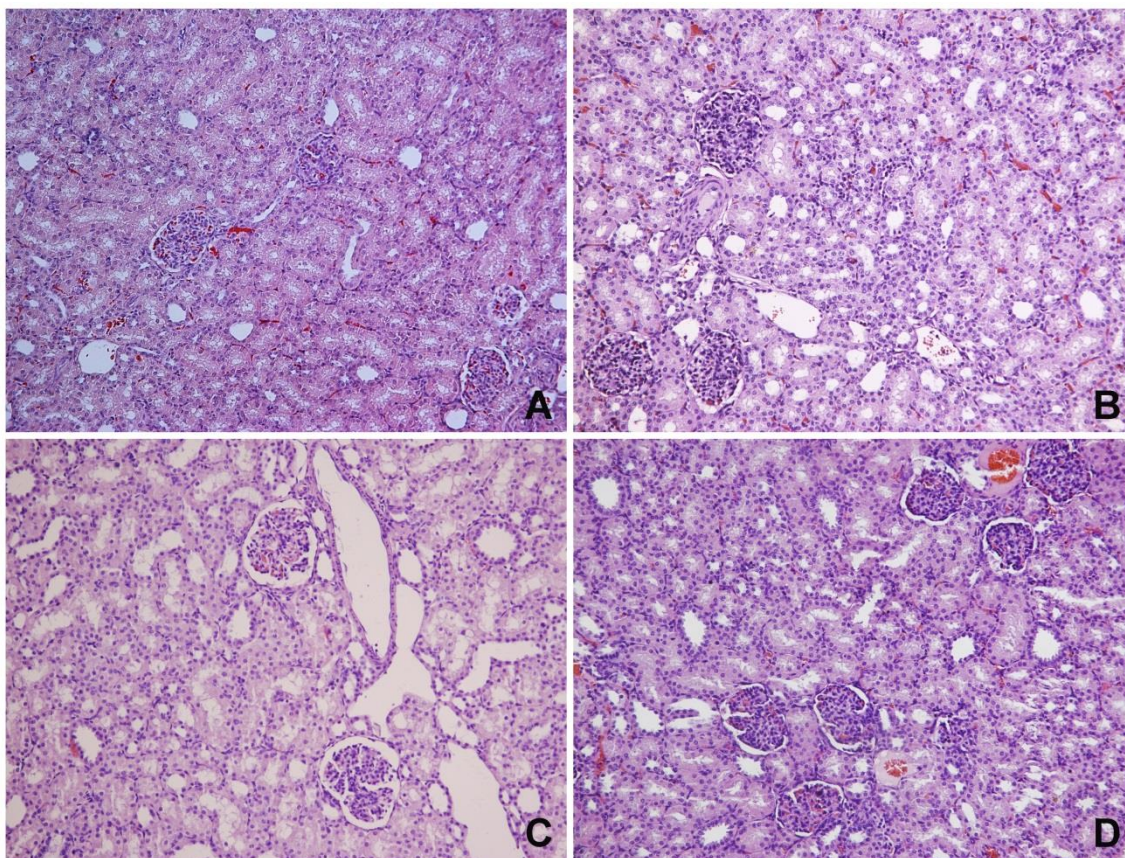
Observou-se também que nos rins do G sham, G10 e G20 assim como o G manitol, não foram verificadas diferenças estatísticas com relação a estes parâmetros.

Não foi verificada diferença no que diz respeito ao  $V_v[\text{Glom}]$  e ao  $VWGV$  entre os grupos (Figura 19). Contudo, houve uma diminuição de 24,5%, ou 290.000 glomérulos nos rins submetidos à isquemia quente por 30 minutos (Gráfico 3).

Embora não tenha havido diferença significativa no número de glomérulos entre os demais grupos estudados (Gráfico 4), viu-se que existe uma correlação negativa entre o tempo de isquemia quente e o número de glomérulos no rim, que ao aplicarmos a regressão linear, esta indicou que 8.000 glomérulos são perdidos por cada minuto de clampeamento, durante a isquemia quente (Gráfico 5).



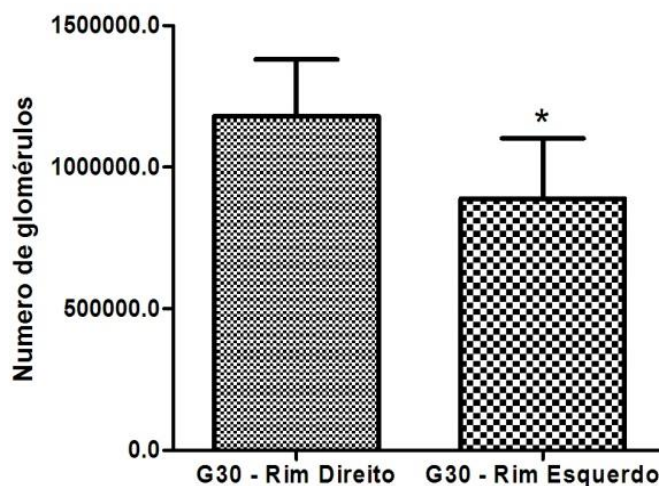
Figura 19 - Fotomicrografias de córtex renal de porcos do experimento.



Legenda: Fotomicrografias de córtex renal de porcos submetidos à cirurgia simulada: Grupo sham(A), 10 minutos de isquemia quente (B), 20 minutos de isquemia quente (C) ou 30 minutos de isquemia quente (D). Magnificação de 200x. Hematoxilina e eosina.

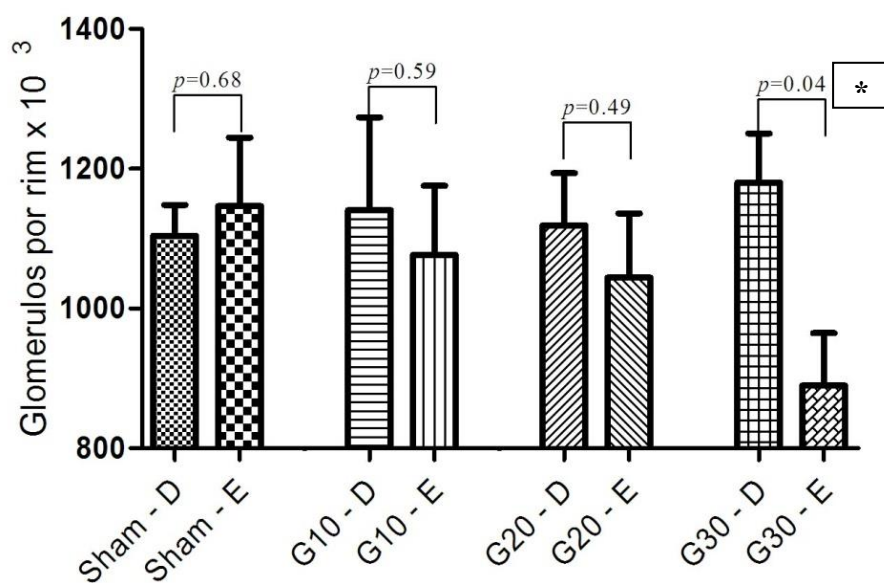
Fonte: O Autor, 2016.

Gráfico 3 – Número de glomérulos dos rins submetidos a 30 minutos de isquemia quente arteriovenosa.



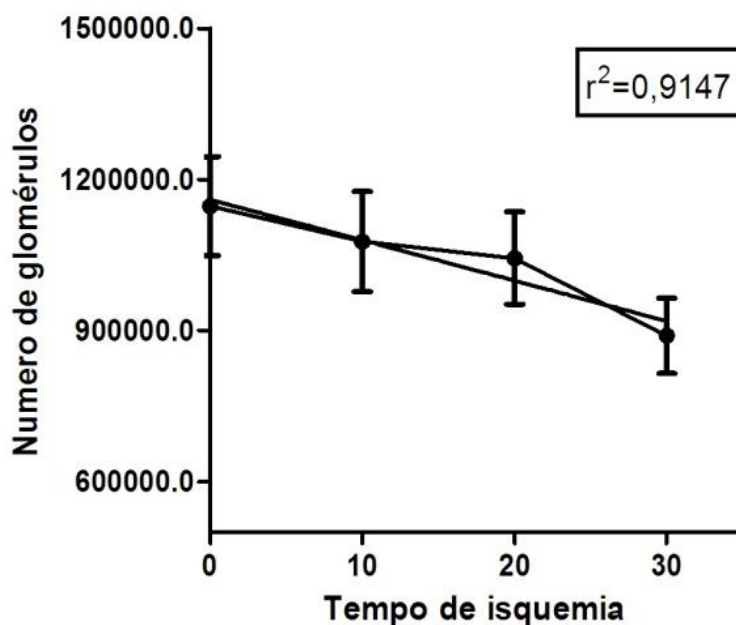
Legenda: Número de glomérulos dos rins submetidos a 30 minutos de isquemia quente arteriovenosa. Os rins esquerdos (submetidos à isquemia) tiveram uma diminuição de 24,5% ou 290.000 glomérulos em relação aos rins contra-laterais, \*  $p < 0,05$ .

Gráfico 4 – Número de glomérulos dos rins suínos submetidos à isquemia quente arteriovenosa nos grupos G sham, G10, G20 e G30.



Legenda: Não houve diferença estatística entre o número de glomérulos dos rins direitos e esquerdos de suínos submetidos à isquemia quente nos grupos: G sham, G10, G20. Porém, o grupo que foi submetido por 30 minutos apresentou uma perda importante no número de glomérulos.

Gráfico 5 – Correlação negativa significativa entre o tempo de isquemia quente e o número de glomérulos no rim.

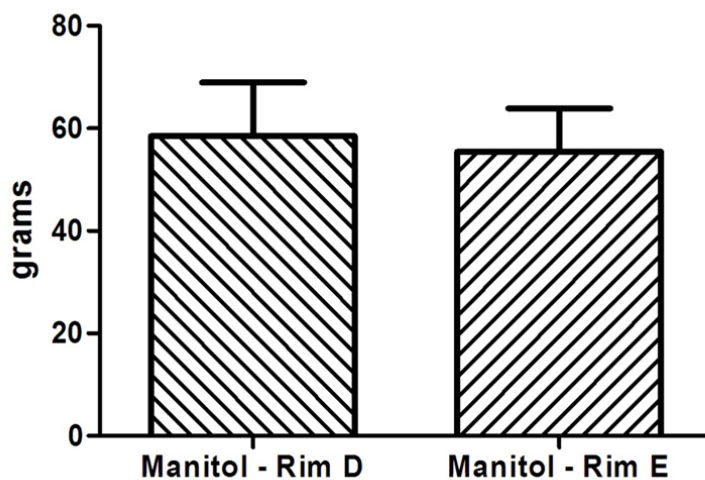


Legenda: Gráfico mostrando o número de glomérulos nos rins do grupo sham (sem isquemia) e submetidos a 10, 20 ou 30 minutos de isquemia. Notar a reta de regressão linear mostrando correlação negativa significativa entre o tempo de isquemia quente e o número de glomérulos no rim.  $p < 0,05$ ;  $r^2 = 0,9147$ . Sendo a fórmula da regressão linear:  $F(x) = 1160 - 8,043.X$ , onde  $F(x)$  = nº de glomérulos(mil) e  $X$  = tempo de isquemia.

Então, ao aplicarmos a regressão linear, esta indicou que 8.000 glomérulos são perdidos para cada minuto de clampeamento, durante a isquemia quente.

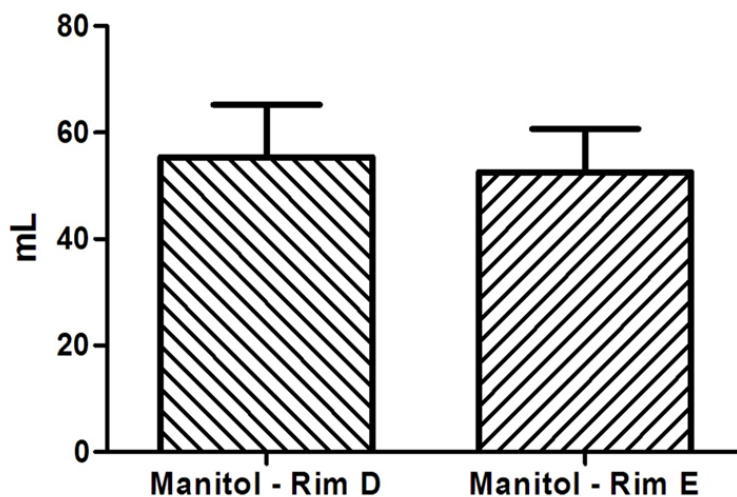
O uso do manitol apresentou proteção significativa, com relação à redução do peso e volume renais, evitando a redução dos mesmos, quando comparados com os rins sob isquemia de 30 minutos, sem o uso do fármaco (Gráficos 6 e 7). Houve também uma proteção renal, conferida pelo manitol, quanto à perda de glomérulos. Os rins submetidos à isquemia quente arteriovenosa por 30 minutos, sem e com o uso de manitol, apresentaram diferença significativa quanto à perda de glomérulos.  $p < 0,05$  (Gráfico 8).

Gráfico 6 – Peso dos rins direitos e esquerdos submetidos à isquemia renal quente artéiovenosa por 30 minutos com o uso do manitol.



Legenda: O gráfico mostra rins submetidos a isquemia quente artéiovenosa por 30 minutos, com o uso do manitol como protetor renal. Não há diferença estatisticamente significativa entre o peso dos rins clampeados (esquerdos) e os rins não clampeados (direitos).

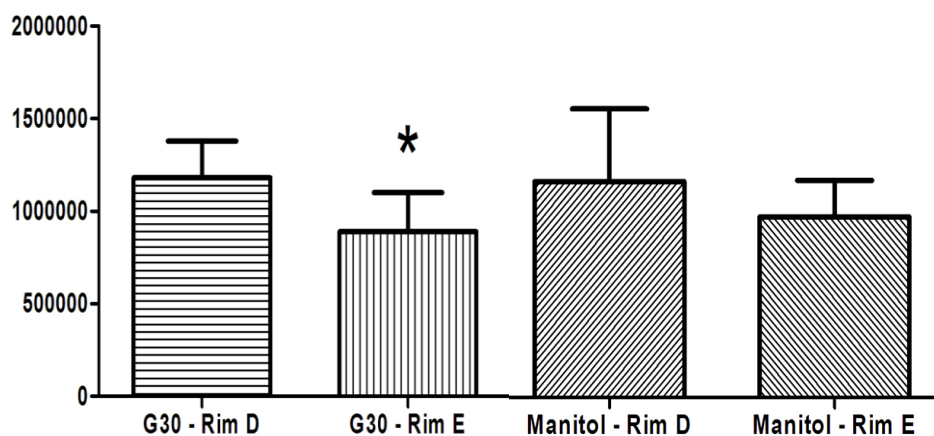
Gráfico 7- Volume dos rins direitos e esquerdos submetidos à isquemia renal quente artéiovenosa por 30 minutos com o uso do manitol.



Legenda: Rins submetidos à isquemia quente arteriovenosa por 30 minutos, com o uso do manitol. Não há diferença estatisticamente significativa no volume dos rins clampeados (esquerdos) e os rins não clampeados (direitos).



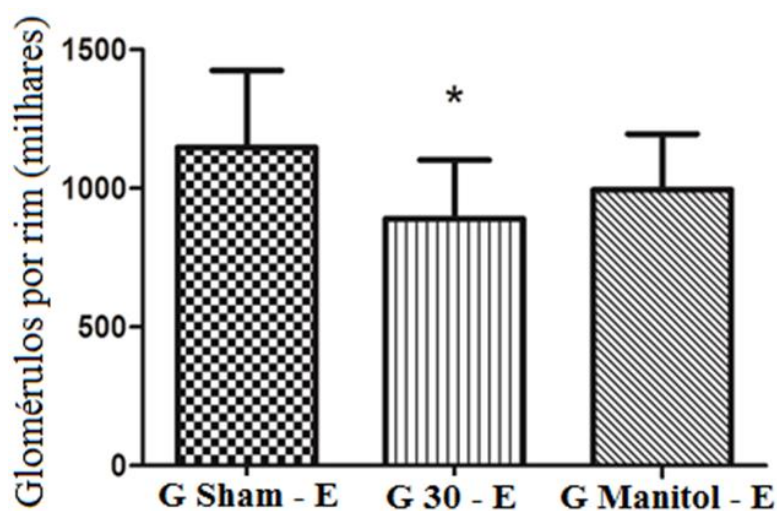
Gráfico 8- Rins submetidos à isquemia quente artériovenosa por 30 minutos sem o uso do manitol, e com o uso do mesmo.



Legenda: Os rins submetidos à isquemia quente arteriovenosa por 30 minutos, sem o uso do manitol, apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto à perda de glomérulos, quando comparados aos rins sem isquemia (direitos). Enquanto que nos rins clampeados por 30 minutos (esquerdos), quando usado o manitol, estes não apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto ao número de glomérulos, quando comparados aos rins contralaterais. \*  $p < 0.05$

Comparamos também os resultados obtidos com o grupo sham, o grupo 30 minutos e o grupo onde se utilizou o manitol como protetor renal, onde podemos verificar que o resultado obtido com o uso do manitol, se compara ao do grupo sham onde não foi aplicada a isquemia renal quente (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Número de glomérulos no grupo sham, no grupo 30 minutos e no grupo onde se utilizou o manitol como protetor renal.



Legenda: Número de glomérulos em rins suínos nos grupos: G sham, G 30 com isquemia quente artériovenosa por 30 minutos, sem e com o uso do manitol pré-operatório (G Man.), quando comparados com os rins contralaterais, \* $p < 0.05$ .

Todas as análises da creatinina sérica ( Tabela 1 e 2 ), no pré-operatório, aos 10 e 21 dias pós-operatórios, para todos os grupos, inclusive para o grupo submetido à isquemia renal quente por 30 minutos, apresentaram valores dentro da normalidade.

Apresentamos também os dados aferidos dos rins direitos e esquerdos de todos os grupos estudados ( Tabelas 3 e 4 ).

Tabela 1 – Mensuração dos níveis séricos de creatinina.

|           | Pré-operatório | 10 dias Pós-operatório | 21 dias Pós-operatório | Valor $p$ |
|-----------|----------------|------------------------|------------------------|-----------|
| Sham      | 1,52 ± 0,38    | 1,10 ± 0,10            | 1,39 ± 0,69            | 0,62      |
| G10       | 1,24 ± 0,29    | 1,19 ± 0,87            | 1,03 ± 0,16            | 0,75      |
| G20       | 1,15 ± 0,24    | 0,97 ± 0,23            | 1,10 ± 0,66            | 0,83      |
| G30       | 1,13 ± 0,32    | 1,13 ± 0,19            | 1,20 ± 0,28            | 0,85      |
| Valor $p$ | 0,21           | 0,94                   | 0,57                   |           |

Legenda: Os níveis séricos de creatinina foram analisados antes da cirurgia e no pós-operatório aos 10 e 21 dias nos porcos do grupo sham, isquemia renal por 10 (G10), 20 (G20) ou 30 minutos (G30). Dados expressos como média ± D.P.

Tabela 2 – Mensuração dos níveis séricos de creatinina sem e com o uso do manitol.

|                | Pré-operatório | 10 dias Pós-operatório | 21 dias Pós-operatório | Valor <i>p</i> |
|----------------|----------------|------------------------|------------------------|----------------|
| Sham           | 1,52 ± 0,38    | 1,10 ± 0,10            | 1,39 ± 0,69            | 0,62           |
| G 30           | 1,13 ± 0,32    | 1,13 ± 0,19            | 1,20 ± 0,28            | 0,85           |
| G Man.         | 1,3 ± 0,5      | 0,92 ± 0,2             | 0,91 ± 0,1             | 0,10           |
| Valor <i>p</i> | 0,31           | 0,16                   | 0,16                   |                |

Legenda: Análise dos níveis séricos de creatinina, comparando o grupo sham, grupo 30 minutos e o grupo que recebeu manitol. Os níveis séricos de creatinina foram analisados antes da cirurgia e no pós-operatório aos 10 e 21 dias. Dados expressos como média ± D.P.

Tabela 3 – Dados aferidos dos rins suínos do experimento.

|   | Sham          |               |              | G10           |               |              | G20            |                |          | G30            |                |           |
|---|---------------|---------------|--------------|---------------|---------------|--------------|----------------|----------------|----------|----------------|----------------|-----------|
|   | Direito       | Esquerd<br>o  | <i>p</i>     | Direito       | Esquer<br>do  | <i>p</i>     | Direito        | Esquer<br>do   | <i>p</i> | Direito        | Esquerd<br>o   | <i>p</i>  |
| Peso do rim (g)                         | 56,8 ±<br>4,9 | 58,2 ±<br>8,5 | 0,<br>5<br>2 | 58,0 ±<br>7,1 | 55,9 ±<br>7,5 | 0,<br>4<br>7 | 64,5 ±<br>11,1 | 64,0 ±<br>11,5 | 0,<br>51 | 59,2 ±<br>10,9 | 55,5 ±<br>11,0 | 0,0<br>08 |
| Volume do rim (ml)                      | 54,4 ±<br>4,1 | 55,2 ±<br>7,7 | 0,<br>7<br>0 | 55,4 ±<br>6,4 | 53,1 ±<br>6,5 | 0,<br>3<br>7 | 56,7 ±<br>7,3  | 56,8 ±<br>8,2  | 0,<br>93 | 56,6 ±<br>9,8  | 53,0 ±<br>10,5 | 0,0<br>07 |
| Rel. córtico-medular (%)                | 71,6 ±<br>2,3 | 70,4 ±<br>4,1 | 0,<br>3<br>2 | 71,8 ±<br>1,8 | 72,1 ±<br>2,1 | 0,<br>4<br>8 | 72,3 ±<br>5,5  | 71,6 ±<br>3,9  | 0,<br>39 | 71,8 ±<br>2,4  | 70,1 ±<br>2,2  | 0,0<br>4  |
| Volume cortical (ml)                    | 38,9 ±<br>3,3 | 38,9 ±<br>6,5 | 0,<br>9<br>8 | 39,8 ±<br>4,8 | 38,3 ±<br>4,6 | 0,<br>3<br>8 | 41,0 ±<br>5,9  | 40,7 ±<br>6,5  | 0,<br>82 | 40,6 ±<br>7,4  | 37,2 ±<br>7,9  | 0,0<br>02 |
| Vv[glom] (%)                            | 3,79 ±<br>0,5 | 3,72 ±<br>0,5 | 0,<br>6<br>8 | 3,95 ±<br>1,0 | 3,82 ±<br>0,7 | 0,<br>6<br>1 | 3,83 ±<br>0,6  | 3,57 ±<br>0,6  | 0,<br>30 | 3,59 ±<br>0,4  | 3,08 ±<br>0,9  | 0,1<br>6  |
| VWGV (10 <sup>5</sup> μm <sup>3</sup> ) | 13,4 ±<br>1,6 | 12,7 ±<br>1,1 | 0,<br>2<br>5 | 14,1 ±<br>2,6 | 13,9 ±<br>2,5 | 0,<br>7<br>6 | 14,1 ±<br>2,4  | 14,1 ±<br>2,1  | 0,<br>97 | 12,5 ±<br>2,4  | 12,4 ±<br>1,2  | 0,9<br>4  |
| Glomérulos (milhões)                    | 1,10 ±<br>0,1 | 1,14 ±<br>0,2 | 0,<br>6<br>8 | 1,14 ±<br>0,3 | 1,07 ±<br>0,3 | 0,<br>5<br>9 | 1,12 ±<br>0,2  | 1,04 ±<br>0,2  | 0,<br>49 | 1,18 ±<br>0,2  | 0,89 ±<br>0,2  | 0,0<br>4  |

Legenda: Dados aferidos dos rins direitos e esquerdos de suínos do grupo sham e submetidos à isquemia renal esquerda por 10 (G10), 20 (G20) ou 30 minutos (G30). Onde Vv[glom] é a densidade volumétrica dos glomérulos e VWGV é o volume médio ponderado de glomérulos. Dados expressos como média ± D.P.



Tabela 4 – Dados aferidos dos rins suínos com uso do manitol.

|   | Sham       |            |          | G 30        |             |           | Manitol     |                     |
|---|------------|------------|----------|-------------|-------------|-----------|-------------|---------------------|
|   | Direito    | Esquerdo   | <i>p</i> | Direito     | Esquerdo    | <i>p</i>  | Direito     | Esquerdo            |
| Peso do rim (g)                         | 56,8 ± 4,9 | 58,2 ± 8,5 | 0,5<br>2 | 59,2 ± 10,9 | 55,5 ± 11,0 | 0,0<br>08 | 58,5 ± 10,4 | 64,0 ± 11,5<br>0,06 |
| Volume do rim (ml)                      | 54,4 ± 4,1 | 55,2 ± 7,7 | 0,7<br>0 | 56,6 ± 9,8  | 53,0 ± 10,5 | 0,0<br>07 | 55,4 ± 9,8  | 56,8 ± 8,2<br>0,09  |
| Rel.córt-medular (%)                    | 71,6 ± 2,3 | 70,4 ± 4,1 | 0,3<br>2 | 71,8 ± 2,4  | 70,1 ± 2,2  | 0,0<br>4  | 71,4 ± 4,0  | 71,6 ± 3,9<br>0,72  |
| Volume cortical (ml)                    | 38,9 ± 3,3 | 38,9 ± 6,5 | 0,9<br>8 | 40,6 ± 7,4  | 37,2 ± 7,9  | 0,0<br>02 | 39,3 ± 5,9  | 40,7 ± 6,5<br>0,17  |
| Vv[glom] (%)                            | 3,79 ± 0,5 | 3,72 ± 0,5 | 0,6<br>8 | 3,59 ± 0,4  | 3,08 ± 0,9  | 0,1<br>6  | 4,06 ± 0,9  | 3,57 ± 0,6<br>0,37  |
| VWGV (10 <sup>5</sup> μm <sup>3</sup> ) | 13,4 ± 1,6 | 12,7 ± 1,1 | 0,2<br>5 | 12,5 ± 2,4  | 12,4 ± 1,2  | 0,9<br>4  | 14,1 ± 3,9  | 14,1 ± 2,1<br>0,86  |
| Glomérulos (x10 <sup>6</sup> )          | 1,10 ± 0,1 | 1,14 ± 0,2 | 0,6<br>8 | 1,18 ± 0,2  | 0,89 ± 0,2  | 0,0<br>4  | 1,18 ± 0,4  | 1,04 ± 0,2<br>0,18  |

Legenda: Dados aferidos dos rins direitos e esquerdos de suínos do grupo Sham, submetidos à isquemia renal quente por 30 minutos (G30) e o grupo que recebeu o manitol. Onde Vv[glom] é a densidade volumétrica dos glomérulos e VWGV é o volume médio ponderado de glomérulos. Dados expressos como média ± D.P.

## 4 DISCUSSÃO

A nefrectomia parcial tem como objetivo principal ressecar completamente um tumor renal, preservando ao máximo o parênquima renal hígido. Este tipo de procedimento tem sido recomendado e demonstrou apresentar melhores resultados quanto à função renal pós-operatória a curto e longo prazo, com prognóstico oncológico igual à nefrectomia radical [14].

Sabemos que a chamada "cirurgia poupadora de néfrons" tem como objetivo principal remover apenas o tumor renal, preservando o maior número possível de néfrons. Portanto, de acordo com essa diretriz, devemos entender que a forma de medição mais adequada para estudar o impacto da isquemia quente no parênquima renal pós nefrectomia parcial é a determinação do número de néfrons [60].

Já há algum tempo, a cirurgia poupadora de néfrons tornou-se padrão operatório, para tumores renais em estágio clínico de T1, mesmo em pacientes com rim contralateral normal [10]. Porém, na maioria das nefrectomias parciais é usada isquemia quente.

Sendo este tema o cerne do todo o nosso trabalho, pudemos ensaiar vários tempos de isquemia renal quente, e concordamos quando a isquemia quente foi recentemente mencionada como o inimigo final para nefrectomia parcial [34]. Porém, há ainda opiniões conflitantes na literatura sobre o tempo máximo sugerido para uma isquemia renal quente, aplicada com segurança, que minimize os danos ao rim. Os tempos ótimos foram indicados como: 20, 25 ou 30 minutos, ou ainda por um período mais longo do que 30 minutos, segundo alguns autores [40, 67, 68]. Permanecendo ainda controverso o tempo máximo de isquemia quente aos quais os pacientes poderão ser submetidos, sem que haja prejuízo da função renal pós-operatória, sendo, no entanto consenso que é um aspecto de muita importância durante os procedimentos cirúrgicos de nefrectomia parcial.

Os resultados do presente estudo demonstram que o grupo de animais que foi submetido a um período de isquemia renal quente por 30 minutos, apresentou uma diminuição significativa no número de glomérulos, e que podemos afirmar que cerca de um quarto do total de glomérulos renais foi perdido, quando 30 minutos de isquemia renal quente foi aplicada em modelo suíno. Portanto, de acordo com os nossos resultados, o uso de isquemia quente durante 30 minutos ou mais, deverá ser desencorajado, concordando com os autores que recomendaram que o tempo de isquemia renal quente, para que esta seja considerada segura, deve ser inferior a 30 minutos [2, 3, 7, 9, 22, 33, 34, 35, 41, 67, 68].

Foi ainda possível demonstrar que os animais submetidos a 10 ou 20 minutos de isquemia quente não apresentaram alteração estatisticamente significativa no número de glomérulos. Isto nos sugere que 20 minutos poderia ser considerado como um período "estatisticamente seguro" para a isquemia renal quente no modelo suíno.

No entanto, pôde-se observar em nossos resultados presentes na Tabela 3, à página 46, que os rins submetidos a 20 minutos de isquemia quente haviam perdido em torno de 75.000 glomérulos, quando comparados com os órgãos contralaterais, que não foram submetidos à isquemia. Observamos também, que os rins expostos a apenas 10 minutos de isquemia quente perderam 64.000 glomérulos. Percebemos que embora a perda de glomérulos após 10 ou 20 minutos de isquemia renal quente não fosse estatisticamente significativa, a regressão linear demonstrou uma diminuição progressiva do número de glomérulos funcionais, à medida que o rim permanece sob isquemia quente. Isto corrobora a afirmação de que "cada minuto conta / importa" quando o hilo renal é clampeado durante a nefrectomia parcial [35, 68].

Mesmo assim, até o presente momento, não encontramos nenhum trabalho científico publicado, onde haja informações sobre o quanto um minuto conta para um rim submetido à isquemia quente. Em nosso estudo, usamos a estereologia para quantificar o número de glomérulos do rim, e correlacionamos este número encontrado com o tempo de isquemia quente.

Neste estudo, a quantificação estereológica foi utilizada para contar com precisão o número de glomérulos remanescentes após diferentes tempos de isquemia quente, assim como nos procedimentos onde se testou o manitol como possível protetor renal. Os métodos estereológicos têm sido utilizados para determinar o número de glomérulos em rins afetados por pneumoperitônio, diabetes e stress crônico [64, 65, 69]. A quantificação estereológica dos glomérulos também é importante para estudar o dano renal após nefrectomia parcial [60] ou para comparar a isquemia arteriovenosa com a isquemia renal arterial [70]. Assim como o objetivo da nefrectomia parcial é remover tumores renais poupando tantos néfrons quanto possível, é razoável, portanto, que uma determinação imparcial do número de glomérulos obtida com a utilização da estereologia, seja importante para estudar o impacto sobre o órgão. Para que se tenha conhecimento, este estudo é o primeiro de seu tipo a mostrar o quanto o tempo de isquemia quente reduz o número de glomérulos e, conseqüentemente, o número de néfrons nos rins.

Verificamos ainda que os níveis séricos de creatinina permaneceram inalterados em todos os momentos em que se procedeu a coleta; ou seja, no dia da cirurgia, aos 10 e 21 dias do pós-operatório e em todos os grupos submetidos a diferentes tempos de isquemia, sem ou com o uso do manitol. Mesmo no grupo em que os rins foram submetidos a 30 minutos de isquemia quente, onde houve uma redução significativa no número de glomérulos, as taxas séricas de creatinina se

mantiveram normais. Isto pode sugerir que o uso de níveis de creatinina sérica como método único para estudar o impacto da isquemia quente sobre o rim, seja falho [71, 72, 73]. No entanto, devemos considerar, como indicado por outro estudo, que os níveis de creatinina no soro poderiam estar normais, devido ao fato de que os rins direitos não foram afetados, e por esta razão estes compensariam a função renal [40].

Portanto, podemos sugerir que outros trabalhos devem ser desenvolvidos utilizando-se um modelo com rim único para estudos de medição da função renal global após isquemia quente [74]. Diante disto, devemos anuir que para o nosso experimento, os métodos morfológicos quantitativos são preferíveis.

Sabe-se que vários métodos têm sido propostos para aumentar o tempo de isquemia renal quente sem que haja prejuízo do parênquima e sua função, alguns dos quais são comumente utilizados na prática clínica. Dentre estes, podemos incluir o clampeamento arterial [70] ou seletivo [75] ao invés do arteriovenoso, o uso de drogas de proteção renal, tal como o manitol [54] e a isquemia renal fria [76]. No entanto, quando do desenvolvimento do nosso trabalho, pudemos perceber que a maioria destes métodos é recomendada com base apenas em testes funcionais, com pouca evidência morfológica quantitativa.

A literatura cita vários métodos que foram propostos para minimizar os aspectos negativos relacionados à isquemia quente [78-81]. Com base nos nossos resultados obtidos com os tempos de isquemia renal quente, principalmente aos relacionados ao tempo de 30 minutos de clampeamento arteriovenoso, buscamos, com o auxílio da estereologia, comprovar o potencial efeito do manitol como protetor renal, minimizando as lesões de isquemia/reperfusão .

Mesmo sendo muito utilizado como virtual protetor renal durante os procedimentos de isquemia renal quente [54], só recentemente, os seus efeitos benéficos para o parênquima, quando da isquemia quente para nefrectomia parcial, foram investigados [55, 82].

Nosso estudo utilizando a estereologia para contagem de glomérulos, sugere que existam efeitos benéficos relacionados ao uso intra-operatório do manitol, preservando as unidades funcionais renais (néfrons) contra os eventos negativos relacionados à isquemia quente.

Os estudos realizados anteriormente utilizando-se o manitol como possível protetor renal durante a nefrectomia parcial, não demonstraram melhorias clinicamente significativas quanto à preservação da função renal [55, 82]. Porém, como observamos, estes estudos eram retrospectivos, e apenas apresentavam resultados de taxas de filtração glomerular, que como demonstramos no presente trabalho, podem não apontar as alterações já presentes [40, 71, 72, 73, 74], em pacientes submetidos à nefrectomia parcial, com ou sem a administração de manitol.

Portanto, os resultados negativos encontrados nestes estudos, podem estar relacionados à heterogeneidade dos pacientes e também pelas análises laboratoriais realizadas.

A proteção conferida pelo manitol ao parênquima renal durante os eventos relacionados à isquemia quente está relacionada a diferentes mecanismos de ação. O manitol é mais conhecido como sendo um diurético osmótico, e como o uso de diuréticos (não apenas o manitol, mas também a furosemida) é conhecido por inibir a reabsorção tubular, diminuindo a demanda de oxigênio pelo parênquima renal [83]. Assim, diferentes diuréticos têm sido usados antes de se realizar a isquemia renal quente [54]. Além disso, o manitol ao expandir o volume intravascular, favorece também o aumento do fluxo sanguíneo para a circulação renal [84].

À medida que mais quantidade de sangue flui para dentro do rim, mais oxigênio é também transportado e fornecido às células renais, e isto é considerado benéfico para um órgão que vai ser submetido à isquemia. Finalmente, o manitol também é considerado um antioxidante, capaz de eliminar radicais hidroxila, reduzindo assim as lesões causadas por radicais livres em vários órgãos inclusive o rim [85, 86]. Como espécies reativas de oxigênio são produzidas em grande parte durante a isquemia renal quente, podemos dizer que o grupo que neste estudo recebeu manitol, pode ter apresentado número de néfrons normal devido a estas propriedades inerentes ao manitol.

Concluído o experimento, nossos resultados demonstraram os potenciais benefícios do uso do manitol intra-operatório durante a isquemia quente, quanto à proteção do parênquima. Contudo, alguns pontos devem ser abordados. Autores como Omaeet al.[82], afirmam que excluir o uso do manitol pode trazer algumas vantagens, tais como a redução do tempo operatório e custos de procedimento. Assim, devemos notar que o uso do manitol não é livre de algum ônus que deve ser avaliado.

Entretanto, os resultados do nosso estudo sustentam que deve ser feito o uso do manitol como agente de proteção durante a isquemia quente para a nefrectomia parcial. Mesmo assim, outros estudos, confirmando ou refutando estes resultados são desejáveis. Os efeitos do uso do manitol devem ser estudados em outras situações experimentais, tais como em modelos com rim único, na insuficiência renal, técnicas de clampeamento seletivo.

Além disso, em nosso estudo há uma limitação que deve ser observada. Trata-se de um estudo experimental em animais, onde os resultados obtidos relacionados aos danos renais devidos à isquemia quente, não podem ser diretamente transpostos para os danos que poderiam ocorrer em humanos. Embora sendo o modelo suíno semelhante e o mais adequado para a comparação à anatomia e fisiologia renal humana [56, 77], este ainda é um cenário experimental e diferente da prática clínica. Neste trabalho, todos os animais estavam hígidos, não apresentavam

nenhuma alteração clínica, neoplasias renais ou qualquer outra condição de morbidade. Convém ainda esclarecer que estes animais não foram submetidos a procedimentos de nefrectomia parcial, mas apenas à isquemia quente. No entanto, podemos imaginar que, em um cenário clínico a perda glomerular seria ainda maior após a nefrectomia parcial do que foi observado neste estudo.

## CONCLUSÕES

No modelo suíno a isquemia arteriovenosa quente por 30 minutos causa danos ao parênquima renal e, portanto deve ser evitada.

A creatinina sérica não demonstrou ser um teste fidedigno para avaliação da função renal pós-operatória.

O presente estudo mostra numericamente que o tempo de isquemia quente é um fator determinante na produção de lesão renal, e que cada minuto determina uma perda proporcional de glomérulos, mesmo para tempos de isquemia inferiores à 30 minutos. Dessa forma, devemos reduzir o tempo de isquemia quente para as nefrectomias parciais.

A administração transoperatória do manitol minimiza a perda de glomérulos durante a isquemia quente por 30 minutos, e pode ser indicada em casos que necessitem tempos tão longos de isquemia.

## REFERÊNCIAS

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2015;65:5-29.-- Cancer Statistics, 2016.
2. Alesawi A, Nadeau G, Bergeron A, Dujardin T, Lacombe L, Caumartin Y. Cystatin C for early detection of acute kidney injury after laparoscopic partial nephrectomy. *Urol Ann.* 2014;6:298-304.
3. Borghesi M, Della Mora L, Brunocilla E, Schiavina R, Rizzi S, La Manna G, Martorana G. Warm ischemia time and postoperative complications after partial nephrectomy for renal cell carcinoma. *ActasUrol Esp.* 2014;38:313-8.
4. Yeon JS, Son SJ, Lee YJ, Cha WH, Choi WS, Chung JW, Lee BK, Lee S, Jeong CW, Hong SK, Byun SS, Lee SE. The nephrometry score: is it effective for predicting perioperative outcome during robot-assisted partial nephrectomy? *Korean J Urol.* 2014;55:254-9.
5. Russo P, Huang W. The medical and oncological rationale for partial nephrectomy for the treatment of T1 renal cortical tumors. *UrolClin North Am.* 2008;35:635-43; vii.
6. Lane BR, Novick AC. Nephron-sparing surgery. *BJU Int.* 2007;99:1245-50.
7. Volpe A, Cadeddu JA, Cestari A, Gill IS, Jewett MA, Joniau S, Kirkali Z, Marberger M, Patard JJ, Staehler M, Uzzo RG. Contemporary management of small renal masses. *Eur Urol.* 2011;60:501-15.
8. Leslie S, Goh AC, Gill IS. Partial nephrectomy--contemporary indications, techniques and outcomes. *Nat Rev Urol.* 2013;10:275-83.
9. Simone G, Ferriero M, Papalia R, Costantini M, Guaglianone S, Gallucci M. Zero-ischemia minimally invasive partial nephrectomy. *CurrUrol Rep.* 2013;14:465-70.
10. Campbell SC, Novick AC, Belldegrun A, Blute ML, Chow GK, Derweesh IH, Faraday MM, Kaouk JH, Leveillee RJ, Matin SF, Russo P, Uzzo RG. Guideline for management of the clinical T1 renal mass. *J Urol.* 2009;182:1271-9. ,
11. Ljungberg B, Bensalah K, Canfield S. EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update. *EurUrol* 2015;67(5):913-24.
12. Li HK, Chung HJ, Huang EY, Lin AT, Chen KK. Impact of warm ischemia time on the change of split renal function after minimally invasive partial nephrectomy in Taiwanese patients. *J Chin Med Assoc.* 2014;78:62-6.
13. Petrasz P, Slojewski M, Sikorski A. Impact of "non-clamping technique" on intra- and postoperative course after laparoscopic partial nephrectomy. *WideochirInne Tech MaloInwazyjne.* 2012;7:275-9.
14. Mashni JW, Assel M, Maschino A, Mary Russo, Brendan Masi, Melanie Bernstein, William C. Huang, Paul Russo. New Chronic Kidney Disease and Overall Survival after Nephrectomy for Small Renal Cortical Tumors. *Urology* 2015;86(6):1137-43. New Chronic Kidney Disease and Overall Survival After Nephrectomy for Small Renal Cortical Tumors
15. Lucas SM, Mellon MJ, Erntsberger L, Sundaram CP. A comparison of robotic, laparoscopic and open partial nephrectomy. *JSLs.* 2012;16:581-7.



16. George AK, Herati AS, Srinivasan AK, Rais-Bahrami S, Waingankar N, Sadek MA, Schwartz MJ, Okhunov Z, Richstone L, Okeke Z, Kavoussi LR. Perioperative outcomes of off-clamp vs complete hilar control laparoscopic partial nephrectomy. *BJU Int* 2013;111(4 B):E235–41. Perioperative outcomes of off-clamp vs complete hilar control laparoscopic partial nephrectomy.
17. Zhang Z, Zhao J, Dong W, et al. Acute Kidney Injury after Partial Nephrectomy: Role of Parenchymal Mass Reduction and Ischemia and Impact on Subsequent Functional Recovery. *EurUrol* 2015;69(4):745-52.
18. Lane BR, Russo P, Uzzo RG, Hernandez AV, Boorjian SA, Thompson RH, Fergany AF, Love TE, Campbell SC. Comparison of cold and warm ischemia during partial nephrectomy in 660 solitary kidneys reveals predominant role of nonmodifiable factors in determining ultimate renal function. *J Urol.* 2011;185:421-7.
19. Tyritzis SI, Kyroudi A, Liatsikos E, Manousakas T, Karayannacos P, Kostomitsopoulos N, Zervas A, Pavlakis K, Stolzenburg JU, Constantinides C. Comparison of prolonged warm and cold ischemia on the solitary kidney during partial nephrectomy in a rabbit model. *World J Urol.* 2007;25:635-40.
20. Marley CS, Siegrist T, Kurta J, O'Brien F, Bernstein M, Solomon S, Coleman JA. Cold intravascular organ perfusion for renal hypothermia during laparoscopic partial nephrectomy. *J Urol.* 2011;185:2191-5.
21. Schuler TD, Perks AE, Fazio LM, Blew BD, Mazer D, Hare G, RJ DAH, Pace KT. Impact of arterial and arteriovenous renal clamping with and without intrarenal cooling on renal oxygenation and temperature in a porcine model. *J Endourol.* 2008;22:2367-72.
22. Becker F, Van Poppel H, Hakenberg OW, Stief C, Gill I, Guazzoni G, Montorsi F, Russo P, Stockle M. Assessing the impact of ischaemia time during partial nephrectomy. *Eur Urol.* 2009;56:625-34.
23. S. Massberg, A.P. Gonzalez, R. Leiderer, S. Massberg, A. P. Gonzalez, R. Leiderer, M. D. Menger, K. Messmer. In vivo assessment of the influence of cold preservation time on microvascular reperfusion injury after experimental small bowel transplantation. *Br J Surg*, 85 (1998), p. 127.
24. S. Massberg, K. Messmer. The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc*, 30 (1998), p. 4217.
25. P. Grace. Ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg*, 81 (1994), p. 637). 26-22
26. B. Kahan, C. Ponticelli (Eds.), *Immunosuppressive Agents: New Strategies, Principles and Practice of Renal Transplantation*, Martin Dunitz Ltd, London (2000), p3.
27. Z. Akçetin, A. Busch, G. Kessler. Evidence for only a moderate lipid peroxidation during ischemia-reperfusion of rat kidney due to its high antioxidative capacity. *Urol Res*, 27 (1999), p. 2807.
28. M. Paller, J. Hoidal, T. Ferris. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest*, 74 (1984), p. 1156.
29. Lobb I, Zhu J, Liu W, Haig A, Lan Z, Sener A. Hydrogen sulfide treatment ameliorates long-term renal dysfunction resulting from prolonged warm renal ischemia-reperfusion injury. *Can UrolAssoc J.* 2014;8:E413-8.
30. Simmons MN, Schreiber MJ, Gill IS. Surgical renal ischemia: a contemporary overview. *J Urol.* 2008;180:19-30.

31. Porpiglia F, Renard J, Billia M, Musso F, Volpe A, Burruni R, Terrone C, Colla L, Piccoli G, Podio V, Scarpa RM. Is renal warm ischemia over 30 minutes during laparoscopic partial nephrectomy possible? One-year results of a prospective study. *Eur Urol.* 2007;52:1170-8.
32. Pouliot F, Pantuck A, Imbeault A, Shuch B, Calimlim B, Audet JF, Finley DS, Dujardin T. Multivariate analysis of the factors involved in loss of renal differential function after laparoscopic partial nephrectomy: a role for warm ischemia time. *Can UrolAssoc J.* 2011;5:89-95.
33. Lane BR, Gill IS, Fergany AF, Larson BT, Campbell SC. Limited warm ischemia during elective partial nephrectomy has only a marginal impact on renal functional outcomes. *J Urol.* 2011;185:1598-603.
34. Pignot G, Bouliere F, Patard JJ. Warm ischaemia: the ultimate enemy for partial nephrectomy? *Eur Urol.* 2010;58:337-9.
35. Thompson RH, Lane BR, Lohse CM, Leibovich BC, Fergany A, Frank I, Gill IS, Blute ML, Campbell SC. Every minute counts when the renal hilum is clamped during partial nephrectomy. *Eur Urol.* 2010;58:340-5.
36. Simmons MN, Lieser GC, Fergany AF, Kaouk J, Campbell SC. Association between warm ischemia time and renal parenchymal atrophy after partial nephrectomy. *J Urol.* 2013;189:1638-42.
37. Touma NJ, Matsumoto ED, Kapoor A. Laparoscopic partial nephrectomy: The McMaster University experience. *Can UrolAssoc J.* 2012;6:233-6.
38. Mir MC, Takagi T, Campbell RA, Sharma N, Remer EM, Li J, Demirjian S, Stein R, Kaouk J, Campbell SC. Poorly functioning kidneys recover from ischemia after partial nephrectomy as well as strongly functioning kidneys. *J Urol.* 2014;192:665-70.
39. Tomaszewski JJ, Smaldone MC, Mehrazin R, Kocher N, Ito T, Abbosh P, Baber J, Kutikov A, Viterbo R, Chen DY, Canter DJ, Uzzo RG. Anatomic complexity quantitated by nephrometry score is associated with prolonged warm ischemia time during robotic partial nephrectomy. *Urology.* 2014;84:340-4.
40. Godoy G, Ramanathan V, Kanofsky JA, O'Malley RL, Tareen BU, Taneja SS, Stifelman MD. Effect of warm ischemia time during laparoscopic partial nephrectomy on early postoperative glomerular filtration rate. *J Urol.* 2009;181:2438-43; discussion 2443-5.
41. Funahashi Y, Yoshino Y, Sassa N, Matsukawa Y, Takai S, Gotoh M. Comparison of warm and cold ischemia on renal function after partial nephrectomy. *Urology.* 2014;84:1408-12. –
42. Andrade SC, Dezoti C, Shibuya CA, Watanabe M, Vattimo MF. Efeitos comparativos do alopurinol e n-acetilcisteína como antioxidantes. *J. Bras. Nefrologia* 26 (2):69-75,2004.
43. Rhoden EL, Pereira-Lima L, Teloken C, Lucas ML, Bello-Klein A, Rhoden CR. Beneficial effect of alpha-tocopherol in renal ischemia-reperfusion in rats. *Jpn J Pharmacol.* 2001;87:164-6.
44. Grossini E, Molinari C, Pollesello P, Bellomo G, Valente G, Mary D, Vacca G, Caimmi P. Levosimendan protection against kidney ischemia/reperfusion injuries in anesthetized pigs. *J PharmacolExpTher.* 2012;342:376-88.
45. Phillips CK, Hrubby GW, Mirabile G, Motamedinia P, Lehman DS, Okhunov Z, Singh H, Schwartz M, Benson MC, Landman J. Erythropoietin-induced optimization of renal function after warm ischemia. *J Endourol.* 2009;23:359-65.

46. Bragadottir G, Redfors B, Ricksten SE. Mannitol increases renal blood flow and maintains filtration fraction and oxygenation in postoperative acute kidney injury: a prospective interventional study. *Crit Care*. 2012;16:R159.
47. Badet L, Petruzzo P, Lefrancois, McGregor B, Espa M, Berthillot C, Danjou F, Contu P, Aissa AH, Virieux SR, Colpart JJ, Martin X. (2005); Kidney preservation with IGL-1 solution: a preliminary report. *Transplant Proc* 37:308.
48. Islam MK, Rahman AT, Arif NU. (2010). Modified perfusion fluid for renal transplantation in developing countries: our initial experience. *Transplant Proc* 42:1531.
49. Nunes P, Mota A, Figueiredo, F. Macário, F. Rolo, V. Dias, B. Parada. (2007) Efficacy of renal preservation: comparative study of Celsior and University of Wisconsin solutions. *Transplant Proc* 39:2478.
50. Corps CL, Smolenski R, Potts D, J. Pratt, J.P.A. Lodge . (2009) Addition of adenosine to University of Wisconsin solution: does it help? *Transplant Proc* 41:1491.
51. Bolte SL, Chin LT, Moon TD. (2006) Maintaining urine production and early allograft function during laparoscopic donor nephrectomy. *Urology* 68:7478].
52. Mizuguchi Y, Ichihara A, Seki Y. (2010) Renoprotective effects of mineralocorticoid receptor blockade in heminephrectomized (pro)renin receptor transgenic rats. *ClinExpPharmacolPhysiol* 37:569.
53. Khoury W, Namnesnikov M, Fedorov D, Abu-Gazala S, Weinbroum AA. (2010) Mannitol attenuates kidney damage induced by xanthine oxidase-associated pancreas ischemia-reperfusion. *J Surg Res* 160:163. Mannitol attenuates kidney damage induced by xanthine oxidase-associated pancreas ischemia-reperfusion.
54. Cosentino M, Breda A, Sanguedolce F, Landman J, Stolzenburg JU, Verze P, Rassweiler J, Van Poppel H, Klingler HC, Janetschek G, Celia A, Kim FJ, Thalmann G, Nagele U, Mgorovich A, Bolenz C, Knoll T, Porpiglia F, Alvarez-Maestro M, Francesca F, Deho F, Eggener S, Abbou C, Meng MV, Aron M, Laguna P, Mladenov D, D'Addressi A, Bove P, Schiavina R, De Cobelli O, Merseburger AS, Dalpiaz O, D'Ancona FC, Polascik TJ, Muschter R, Leppert TJ, Villavicencio H. The use of mannitol in partial and live donor nephrectomy: an international survey. *World J Urol* 2013;31(4):977-982.
55. Power NE, Maschino AC, Savage C, Silberstein JL, Thorner D, Tarin T, Wong A, Touijer KA, Russo P, Coleman JA. Intraoperative mannitol use does not improve long-term renal function outcomes after minimally invasive partial nephrectomy. *Urology*. 2012;79:821-5.
56. de Souza DB, Abilio EJ, Costa WS, Sampaio MA, Sampaio FJ. Kidney healing after laparoscopic partial nephrectomy without collecting system closure in pigs. *Urology*. 2011;77:508 e5-9.
57. Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*. 1970;26:57-60.
58. Ribeiro CT, Milhomem R, De Souza DB, Costa WS, Sampaio FJ, Pereira-Sampaio MA. Effect of antioxidants on outcome of testicular torsion in rats of different ages. *The Journal of urology* 2014;191(5 Suppl):1578-1584.]
59. Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J. Cell Biology*. 1966; 30: 23-38.

60. de Souza DB, de Oliveira LL, da Cruz MC, Abilio EJ, Costa WS, Pereira-Sampaio MA, Sampaio FJ. Laparoscopic partial nephrectomy under warm ischemia reduces the glomerular density in a pig model. *J Endourol.* 2012;26:706-10.
61. Bechara GR, de Souza DB, Simoes M, Felix-Patricio B, Medeiros JL, Jr., Costa WS, Sampaio JF. Testicular Morphology and Spermatozoid Parameters in Spontaneously Hypertensive Rats Treated with Enalapril. *J Urol*2015;194(5):1498–503.
62. de Souza DB, Silva D, Cortez CM, Costa WS, Sampaio FJ. Effects of chronic stress on penile corpus cavernosum of rats. *JAndrol* 2012;33(4):735–9.
63. Gundersen HJ, Jensen EB: Stereological estimation of the volume-weight mean volume of arbitrary particles observed on random sections. *J. Microsc.* 1985; 138: 127-42.
64. Souza DB, Costa WS, Cardoso LE, Benchimol M, Pereira-Sampaio MA, Sampaio FJ. Does prolonged pneumoperitoneum affect the kidney? Oxidative stress, stereological and electron microscopy study in a rat model. *IntBraz J Urol.* 2013;39:30-6.
65. Benchimol de Souza D, Silva D, Marinho Costa Silva C, BarcellosSampaio FJ, Silva Costa W, Martins Cortez C. Effects of immobilization stress on kidneys of Wistar male rats: a morphometrical and stereological analysis. *Kidney Blood Press Res.* 2011;34:424-9.
66. Aguila MB, Pinheiro AR, Aquino JC, Gomes AP, Mandarim-de-Lacerda CA. Different edible oil beneficial effects (canola oil, fish oil, palm oil, olive oil, and soybean oil) on spontaneously hypertensive rat glomerular enlargement and glomeruli number. 2005 May;76(1-4):74-85.
67. Kim SP, Thompson RH. Kidney function after partial nephrectomy: current thinking. *CurrOpinUrol* 2013;23(2):105–11.
68. Patel AR, Eggener SE. Warm ischemia less than 30 minutes is not necessarily safe during partial nephrectomy: every minute matters. *UrolOncol* 2011;29(6):826–8.
69. Hokke SN, Armitage JA, Puellas VG, Short KM, Jones L, Smyth IM, et al. Altered ureteric branching morphogenesis and nephron endowment in offspring of diabetic and insulin-treated pregnancy. *PLoS One* 2013;8(3):e58243. [24] Berczi C, Thomas B, Bacso Z, Flasko T. Long-Term Oncological and Functional Outcomes of Partial Nephrectomy in Solitary Kidneys. *ClinGenitourinCancer*2016;in press.
70. Bagetti-Filho HJ, Sampaio FJ, Marques RG, Pereira-Sampaio MA. Different from renal artery only clamping, artery and vein clamping causes a significant reduction in number of rat glomeruli during warm ischemia. *J Endourol* 2012;26(10):1335–9.
71. Lane BR, Fergany AF, Weight CJ, Campbell SC. Renal functional outcomes after partial nephrectomy with extended ischemic intervals are better than after radical nephrectomy. *J Urol*2010;184(4):1286–90.
72. Ramirez D, Caputo P, Krishnan J, Zargar H, Kaouk JH. Robotic Partial Nephrectomy with Intracorporeal Renal Hypothermia Using Ice Slush: Step-by-step Technique and matched comparison to warm ischemia. *BJU Int* 2015;117(3):531-6.
73. Zhang Z, Zhao J, Velet L, Ercole CE, Remer EM, Mir CM, Li J, Takagi T, Demirjian S, Campbell SC. Functional Recovery From Extended Warm Ischemia Associated with Partial Nephrectomy. *Urology* 2015;87:106-13.
74. Thompson RH, Lane BR, Lohse CM, Leibovich BC, Fergany A, Frank I, Gill IS, Campbell SC, Blute ML. Comparison of warm ischemia versus no ischemia during partial nephrectomy on a solitary kidney. *European Urology* 2010;58(3):331–6.

75. Zhou L, Wei X, Sun WJ, Liu Q, Jian ZY, Li H, Wang KJ. Selective Versus Hilar Clamping During Minimally Invasive Partial Nephrectomy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Endourol* 2015;29(8):855–63.
76. Jabaji R, Palazzi KL, Mehrazin R, Cohen SA, Masterson JH, Woo JR, Lee H, Liss MA, Kopp RP, Wang S, Stroup SP, Patterson AL, L'Esperance JO, Derweesh IH. Determinants of renal functional decline after open partial nephrectomy: a comparison of warm, cold, and non-ischemic modalities. *Can J Urol* 2014;21(1):7126–33.
77. Pereira-Sampaio MA, Favorito LA, Sampaio FJ. Pig kidney: anatomical relationships between the intrarenal arteries and the kidney collecting system. Applied study for urological research and surgical training. *J Urol* 2004;172(5 Pt 1):2077–81.
78. Cohen J, Dorai T, Ding C, Batinic-Haberle I, Grasso M. The administration of renoprotective agents extends warm ischemia in a rat model. *Journal of endourology / Endourological Society* 2013;27(3):343-348.
79. Gill IS, Patil MB, Abreu AL, Ng C, Cai J, Berger A, Eisenberg MS, Nakamoto M, Ukimura O, Goh AC, Thangathurai D, Aron M, Desai MM. Zero ischemia anatomical partial nephrectomy: a novel approach. *The Journal of urology* 2012;187(3):807-814.
80. Keel CE, Wang Z, Colli J, Grossman L, Majid D, Lee BR. Protective effects of reducing renal ischemia-reperfusion injury during renal hilar clamping: use of allopurinol as a nephroprotective agent. *Urology* 2013;81(1):210 e215-210.
81. Wang Z, Colli JL, Keel C, Bailey K, Grossman L, Majid D, Lee BR. Isoprostane: quantitation of renal ischemia and reperfusion injury after renal artery clamping in an animal model. *Journal of endourology / Endourological Society* 2012;26(1):21-25.
82. Omae K, Kondo T, Takagi T, Iizuka J, Kobayashi H, Hashimoto Y, Tanabe K. Mannitol has no impact on renal function after open partial nephrectomy in solitary kidneys. *Int J Urol* 2014;21(2):200-203.
83. Gelman S. Does mannitol save the kidney? *AnesthAnalg* 1996;82(5):899-901.
84. Zager RA, Mahan J, Merola AJ. Effects of mannitol on the postischemic kidney. Biochemical, functional, and morphologic assessments. *Lab Invest* 1985;53(4):433-442.
85. England MD, Cavarocchi NC, O'Brien JF, Solis E, Pluth JR, Orszulak TA, Kaye MP, Schaff HV. Influence of antioxidants (mannitol and allopurinol) on oxygen free radical generation during and after cardiopulmonary bypass. *Circulation* 1986;74(5 Pt 2):III134-137.
86. Haraldsson G, Sorensen V, Nilsson U, Pettersson S, Rashid M, Schersten T, Akerlund S, Jonsson O. Effect of pre-treatment with desferrioxamine and mannitol on radical production and kidney function after ischaemia-reperfusion. A study on rabbit kidneys. *ActaPhysiolScand* 1995;154(4):461-468.

Apêndice - The relationship between renal warm ischemia time and glomerular loss. An experimental study in a pig model (artigo publicado)

## Acta Cirurgica Brasileira

Print version ISSN 0102-8650 On-line version ISSN 1678-2674

Acta Cir. Bras. vol.32 no.5 São Paulo May 2017

<http://dx.doi.org/10.1590/s0102-865020170050000002>

### ORIGINAL ARTICLES

#### 2-EXPERIMENTAL SURGERY

## The relationship between renal warm ischemia time and glomerular loss. An experimental study in a pig model<sup>I</sup>

José Aurelino Damasceno-Ferreira<sup>I</sup>

Gustavo Ruschi Bechara<sup>II</sup>

Waldemar Silva Costa<sup>III</sup>

Marco Aurélio Pereira-Sampaio<sup>IV</sup>

Francisco José Barcellos Sampaio<sup>V</sup>

Diogo Benchimol De Souza<sup>VI</sup>

<sup>I</sup>Master, Postgraduate Program in Physiopathology and Surgical Sciences, Urogenital Research Unit, Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ). Assistant Professor, Department of Veterinary Clinical Pathology, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói-RJ, Brazil. Conception and design of the study, acquisition and interpretation of data, final approval.

<sup>II</sup>Master, Postgraduate Program in Physiopathology and Surgical Sciences, Urogenital Research Unit, UERJ, Rio de Janeiro-RJ, Brazil. Acquisition and interpretation of data, manuscript preparation, final approval.

<sup>III</sup>PhD, Visiting Researcher, Postgraduate Program in Physiopathology and Surgical Sciences, Urogenital Research Unit, UERJ, Rio de Janeiro-RJ, Brazil. Conception and design of the study, acquisition and interpretation of data, final approval.

<sup>IV</sup>PhD, Associate Professor, Postgraduate Program in Physiopathology and Surgical Sciences, Urogenital Research Unit, UERJ, Rio de Janeiro-RJ. Associate Professor, Department of Morphology, UFF, Niterói-RJ, Brazil. Conception and design of the study, acquisition and interpretation of data, manuscript preparation, final approval.

<sup>V</sup>PhD, Full Professor, Head, Postgraduate Program in Physiopathology and Surgical Sciences. Head, Urogenital Research Unit, UERJ, Rio de Janeiro-RJ, Brazil. Conception and design of the study, acquisition and interpretation of data, final approval.

<sup>VI</sup>PhD, Associate Professor, Postgraduate Program in Physiopathology and Surgical Sciences, Urogenital Research Unit, UERJ, Rio de Janeiro-RJ, Brazil. Conception and design of the study, acquisition and interpretation of data, manuscript preparation, final approval.

## ABSTRACT

### Purpose:

To investigate the glomerular number after different warm ischemia times.

### Methods:

Thirty two pigs were assigned into four groups. Three groups (G10, G20, and G30) were treated with 10, 20, and 30 minutes of left renal warm ischemia. The sham group underwent the same surgery without renal ischemia. The animals were euthanized after 3 weeks, and the kidneys were collected. Right kidneys were used as controls. The kidney weight, volume, cortical-medullar ratio, glomerular volumetric density, volume-weighted mean glomerular volume, and the total number of glomeruli per kidney were obtained. Serum creatinine levels were assessed pre and postoperatively.

### Results:

Serum creatinine levels did not differ among the groups. All parameters were similar for the sham, G10, and G20 groups upon comparison of the right and left organs. The G30 group pigs' left kidneys had lower weight, volume, and cortical-medullar ratio and 24.6% less glomeruli compared to the right kidney. A negative correlation was found between warm ischemia time and glomerular number.

### Conclusions:

About one quarter of glomeruli was lost after 30 minutes of renal warm ischemia. No glomeruli loss was detected before 20 minutes of warm ischemia. However, progressive glomerular loss was associated with increasing warm ischemia time.

**Key words:** Kidney; Nephrons; Nephrectomy; Warm Ischemia; Swine

## INTRODUCTION

Partial nephrectomy provides oncological outcomes comparable to those of radical surgery of small renal cell masses as well as better preservation of renal function<sup>1</sup>. Thus, partial nephrectomy is considered the gold standard for treating localized renal tumors<sup>2,3</sup>. Warm renal ischemia is commonly performed during partial nephrectomy to achieve a bloodless surgical field, however renal ischemia has been associated with renal function impairment<sup>4</sup>.

Warm ischemia during laparoscopic partial nephrectomy is considered the most negative modifiable factor for this kind of surgery<sup>5-7</sup>. Traditionally, 30 minutes is considered the maximum safe time for renal warm ischemia. However, recent literature recommends that efforts should be made to reduce warm ischemia time to the shortest time possible time<sup>8</sup>. Some authors suggest that the time should be preferably kept below 20 or 25 minutes in order to avoid postoperative acute renal failure, because every minute counts when the renal hilum is clamped<sup>8,9</sup>.

Most studies assessing the impact of warm ischemia on the kidney were based on functional tests such as serum creatinine level and glomerular filtration rate<sup>10-12</sup>. Few researchers have used quantitative morphological methods to investigate the effects of renal warm ischemia in experimental models. They found that warm ischemia reduced the number and density of glomeruli<sup>13,14</sup>. However, they did not investigate glomerular loss relative to warm ischemia time. The hypothesis of the present study was that the longer the renal warm ischemia time,

the higher the glomerular loss. Thus, the objective of this study was to investigate the number of glomeruli after different renal warm ischemia times in a pig model, using an unbiased stereological method.

## METHODS

All experiments were performed according to the Brazilian law for scientific use of animals, and this project was formally approved by the local Ethics Committee for animal experimentation (CEUA 048/2011).

Thirty-two male domestic pigs (commercial crossbreed strain) with a mean weight of 25 kg (about three months old) were used in this study. The animals were randomly assigned into four experimental groups of eight animals. The sham group was subjected to kidney and hilar dissection, but not to renal ischemia. Three other groups (G10, G20, and G30) were respectively subjected to 10, 20, or 30 minutes of renal warm ischemia.

Animals were premedicated with acepromazine (0.05 mg/Kg, IM), midazolam (0.5 mg/Kg, IM), and cetamine (5.0 mg/Kg, IM). General anesthesia was induced with propofol (3mg/kg, IV) and maintained with isoflurane (2% in oxygen, given by an endotracheal tube). Under general anesthesia and by using aseptic technique, the surgical procedure involved transperitoneal laparoscopic access, as previously used in pigs<sup>15,16</sup>. The left kidney was completely exposed by dissection. Renal vessels were clamped en bloc in all groups with a laparoscopic Satinsky clamp (G10, G20, and G30), except in the sham group. After the predetermined time of ischemia, the vascular clamp was removed and the normal color of the kidney was verified. In the sham group, after dissecting the renal pedicle, the animals were maintained under anesthesia for 20 minutes without renal ischemia. The right kidneys were not manipulated during the experiment and were used as controls. The animals received analgesia for 48 hours after surgery, and food and water ad libitum six hours after surgery. It took up to four hours after the procedure for recovery to normal ambulation. Serum creatinine levels were determined before surgery and on postoperative days 10 and 21 in order to assess renal function.

The animals were evaluated daily for 21 days after surgery, and after this period they were euthanized by anesthetic overdose (sodium thiopental 200 mg/kg IV). The kidneys were harvested, weighed, and their volumes measured by the Scherle's method<sup>17,18</sup>; then, the organs were fixed by immersion in 4% buffered formaldehyde according to our laboratory routine. Samples were collected from the cortical region of these 64 kidneys and were processed by routine histological methods for stereological analysis. Each kidney was sectioned longitudinally and from the created cut surface, samples were collected randomly, in the same fashion as in previous studies<sup>14,18</sup>. The specimens were paraffin embedded, sectioned at 5- $\mu$ m thickness, and stained by hematoxylin & eosin. The cortical-medullar ratio was estimated by using the point-counting-method according the Cavalieri principle<sup>18,19</sup>. The absolute cortical volume (CV) was calculated by multiplying the cortical-medullar ratio by the renal volume.

From each kidney, 25 histological fields obtained from different sections of the renal cortex were photographed under 200X magnification with a digital camera (DP70, Olympus, Tokyo, Japan) coupled to a microscope (BX51, Olympus). Glomerular volumetric density ( $V_v[\text{glom}]$ ), was estimated by the point-counting technique with a M42 test-system<sup>14,20,21</sup>. The test-system was digitally superimposed over each image by using the ImageJ software (version 1.37v, NIH, Bethesda, Maryland, USA)



The volume weighted mean glomerular volume (VWGV), was estimated by using the point-sampled intercepts method<sup>14,16,18,22,23</sup>, analyzing 50 glomeruli per kidney.

The estimation of the total number of glomeruli per kidney was calculated by multiplying the CV by the Vv [glom] and dividing the result by the VWGV .

For all stereological parameter, left kidneys were compared to right organs of each group by using the Student's unpaired t-test. In addition, linear regression was used to examine the relationship between the number of glomeruli per kidney and the warm ischemia time.

Mean creatinine serum levels were compared using one way ANOVA. For all comparisons  $p < 0.05$  was considered significant. Data was expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, USA).

## RESULTS

All animals recovered well from surgeries. Serum creatinine levels were not different among the studied groups ([Table 1](#)).

**Table 1** Serum creatinine levels drawn before surgery and on postoperative days 10 and 21 of pigs submitted to sham surgery or to renal ischemia for 10 (G10), 20 (G20) or 30 minutes (G30).

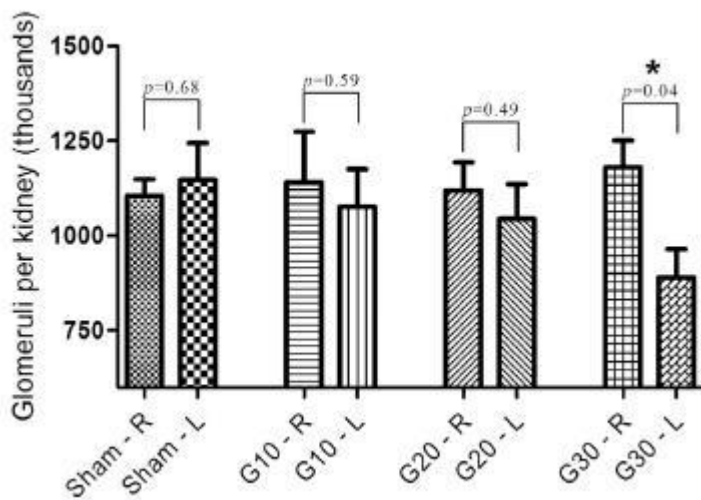
|         | Preoperative    | 10 days Postoperative | 21 days Postoperative | p value |
|---------|-----------------|-----------------------|-----------------------|---------|
| Sham    | 1.52 $\pm$ 0.38 | 1.10 $\pm$ 0.10       | 1.39 $\pm$ 0.69       | 0.62    |
| G10     | 1.24 $\pm$ 0.29 | 1.19 $\pm$ 0.87       | 1.03 $\pm$ 0.16       | 0.75    |
| G20     | 1.15 $\pm$ 0.24 | 0.97 $\pm$ 0.23       | 1.10 $\pm$ 0.66       | 0.83    |
| G30     | 1.13 $\pm$ 0.32 | 1.13 $\pm$ 0.19       | 1.20 $\pm$ 0.28       | 0.85    |
| p value | 0.21            | 0.94                  | 0.57                  |         |

Data expressed as mean  $\pm$  S.D.

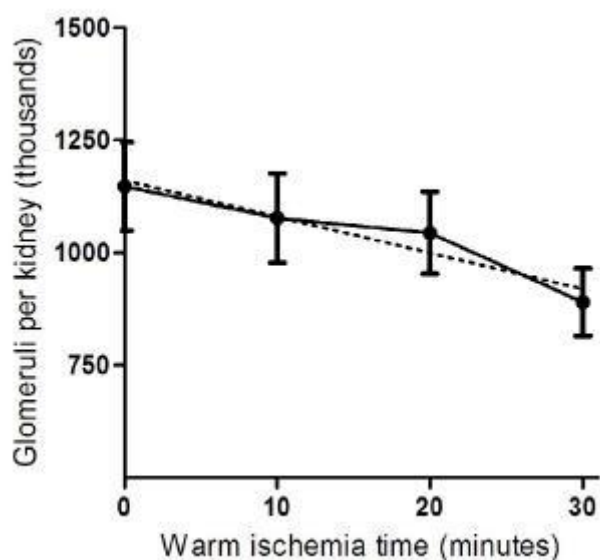
The weight and volume of left kidney of group G30 decreased by 6.2% and 6.3%, respectively, in comparison to the right kidney. In the sham, G10, and G20 groups, no difference was observed between the weight and volume of the kidneys.

The cortical-medullar ratio and absolute cortical volume was different among left and right kidneys of G30 group alone, with the left kidney having a 2.3% and 3.7% decrease in these parameters, respectively. For the other groups, no difference was noted in these parameters. Regarding Vv[glom] and VWGV, no difference was found among all groups.

Finally, the total number of glomeruli in left kidneys of G30 group decreased by 24.6% in comparison to right kidneys. This represented a loss of approximately 290.000 glomeruli caused by warm ischemia for 30 minutes ([Figure 1](#)). Although no difference was observed in the total number of glomeruli in kidneys treated with warm ischemia for 10 and 20 minutes, a negative correlation was found between the warm ischemia time and the number of glomeruli ([Figure 2](#)). All stereological data is presented in [Table 2](#) and histological examples of all groups are presented in [Figure 3](#).



**Figure 1** Number of glomeruli in the right and left kidneys of pigs submitted to sham surgery or to left renal ischemia for 10 (G10), 20 (G20) or 30 minutes (G30). \*different ( $p < 0.05$ ) from contralateral kidney.



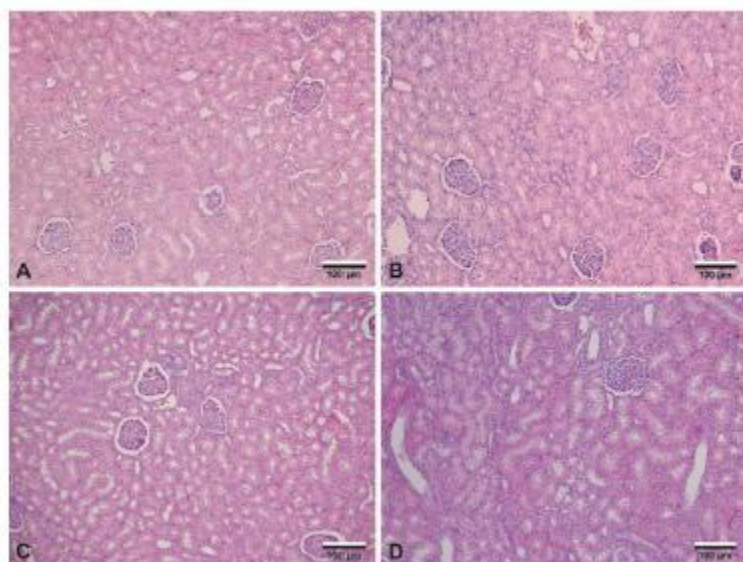
**Figure 2** Graphic showing the number of glomeruli in kidneys submitted to sham surgery or warm ischemia for 10, 20 or 30 minutes (solid line); and linear regression line (dashed line) showing the negative correlation between warm ischemia time and number of glomeruli ( $r^2 = 0.9147$ ).

**Table 2** Stereological data of right and left kidneys of pigs submitted to sham surgery or to left renal ischemia for 10 (G10), 20 (G20) or 30 minutes (G30).

|                   | Sham          |               |         | G10           |               |         | G20            |                |         | G30            |                 |         |
|-------------------|---------------|---------------|---------|---------------|---------------|---------|----------------|----------------|---------|----------------|-----------------|---------|
|                   | Right         | Left          | P value | Right         | Left          | P value | Right          | Left           | P value | Right          | Left            | P value |
| Kidney weight (g) | 56.8<br>± 4.9 | 58.2<br>± 8.5 | 0.52    | 58.0<br>± 7.1 | 55.9<br>± 7.5 | 0.47    | 64.5<br>± 11.1 | 64.0<br>± 11.5 | 0.51    | 59.2<br>± 10.9 | 55.5<br>± 11.0* | 0.008   |
| Kidney volume     | 54.4          | 55.2<br>±     | 0.70    | 55.4          | 53.1<br>±     | 0.37    | 56.7           | 56.8<br>±      | 0.93    | 56.6           | 53.0<br>±       | 0.007   |

|                             |            |            |      |            |            |      |            |            |      |            |             |       |
|-----------------------------|------------|------------|------|------------|------------|------|------------|------------|------|------------|-------------|-------|
| (ml)                        | ± 4.1      | 7.7        |      | ± 6.4      | 6.5        |      | ± 7.3      | 8.2        |      | ± 9.8      | 10.5*       |       |
| Cortical-medullar ratio (%) | 71.6 ± 2.3 | 70.4 ± 4.1 | 0.32 | 71.8 ± 1.8 | 72.1 ± 2.1 | 0.48 | 72.3 ± 5.5 | 71.6 ± 3.9 | 0.39 | 71.8 ± 2.4 | 70.1 ± 2.2* | 0.04  |
| Cortical volume (ml)        | 38.9 ± 3.3 | 38.9 ± 6.5 | 0.98 | 39.8 ± 4.8 | 38.3 ± 4.6 | 0.38 | 41.0 ± 5.9 | 40.7 ± 6.5 | 0.82 | 40.6 ± 7.4 | 37.2 ± 7.9* | 0.002 |
| Vv[glom] (%)                | 3.79 ± 0.5 | 3.72 ± 0.5 | 0.68 | 3.95 ± 1.0 | 3.82 ± 0.7 | 0.61 | 3.83 ± 0.6 | 3.57 ± 0.6 | 0.30 | 3.59 ± 0.4 | 3.08 ± 0.9  | 0.16  |
| VWGV (105 µm <sup>3</sup> ) | 13.4 ± 1.6 | 12.7 ± 1.1 | 0.25 | 14.1 ± 2.6 | 13.9 ± 2.5 | 0.76 | 14.1 ± 2.4 | 14.1 ± 2.1 | 0.97 | 12.5 ± 2.4 | 12.4 ± 1.2  | 0.94  |
| Glomeruli (millions)        | 1.10 ± 0.1 | 1.14 ± 0.2 | 0.68 | 1.14 ± 0.3 | 1.07 ± 0.3 | 0.59 | 1.12 ± 0.2 | 1.04 ± 0.2 | 0.49 | 1.18 ± 0.2 | 0.89 ± 0.2* | 0.04  |

Data expressed as mean ± S.D. \* different ( $p < 0.05$ ) from contralateral kidney.



**Figure 3** Photomicrographs from renal cortex of pigs submitted to sham surgery (A), 10 minutes (B), 20 minutes (C), and 30 minutes of warm ischemia (D). Hematoxylin and eosin, x200.

## DISCUSSION

Warm ischemia was recently mentioned as the ultimate enemy for partial nephrectomy <sup>6</sup>. There are conflicting opinions in the literature on the suggested maximum safe time for renal warm ischemia. The optimal time has been stated as 20, 25 or 30 minutes or even longer than 30 minutes by some authors<sup>24,25</sup>. Although the maximum time for a safe warm ischemia is controversial, the consensus is that it is an important aspect during partial nephrectomy. The results of the present experiment showed that a 30-minute period of renal warm ischemia led to a significant decrease in the number of glomeruli. Therefore, the use of warm ischemia for 30 minutes or more is discouraged, and this is in accordance with the authors who recommend the time for safe warm ischemia to be lower than 30 minutes<sup>24,25</sup>.

Animals subjected to 10 or 20 minutes of warm ischemia did not show a statistically significant alteration of the glomerular number. This suggests that 20 minutes of warm ischemia could be considered as a "statistically safe" period for renal warm ischemia in the pig model. However, one may note that the kidneys subjected to 20 minutes of warm ischemia had 75.000 less glomeruli than the contralateral organs not subjected to ischemia. In addition, kidneys exposed to only 10 minutes of warm ischemia lost 64.000 glomeruli. Although the glomerular loss after 10 and 20 minutes of renal warm ischemia was not statistically significant, linear regression demonstrated a progressive decrease in functional nephrons the longer the kidney remains under warm ischemia. It supports the statement that "every minute counts/matters" when the renal hilum is clamped during partial nephrectomy<sup>8,25</sup>.

However, there is no published information about how much a minute counts for a kidney under warm ischemia. We have used stereology to quantify the number of glomeruli in the kidney, and correlated this number to warm ischemia time. Linear regression indicated that 8.000 glomeruli were lost per minute during warm ischemia.

Stereological quantification was used to precisely quantify the number of glomeruli. Stereological methods have been used to determine the glomerular number in kidneys affected by pneumoperitoneum, diabetes, and chronic stress<sup>19,22,26</sup>. Stereological glomeruli quantification has also been used to study renal damage after partial nephrectomy<sup>14</sup> or for comparing arteriovenous with arterial renal ischemia<sup>13</sup>. As the goal of partial nephrectomy is to remove renal tumors sparing as much nephrons as possible, it is reasonable that an unbiased determination of the glomerular number is important for studying the impact on the kidney. To our knowledge, this study is the first of its kind to show that warm ischemia time reduces the number of glomeruli and consequently the number of nephrons in the kidney.

The serum creatinine levels remained unaffected even though there was a significant reduction in glomeruli in kidneys subjected to 30 minutes of warm ischemia. This suggests that using serum creatinine levels as single method for studying the impact of ischemia is flawed. Quantitative morphological methods are preferable. However, as indicated by another study, the serum creatinine levels may be normal because the right kidney was unaffected<sup>27</sup>. Hence, a single kidney model should be used for studies measuring global renal function after warm ischemia<sup>28</sup>.

Several methods have been proposed for increasing the ischemia time without affecting the kidney, some of which are commonly used in clinical practice. These include arterial or selective clamping instead of arteriovenous clamping, use of renal protective drugs, and cold renal ischemia. However, most of these methods are recommended based on functional tests only, with little quantitative morphological evidence.

A limitation of this study is that the kidney damage due to warm ischemia cannot be directly transposed to the damage that may occur in humans. Although the pig model is the most similar to human anatomy and physiology<sup>15,29</sup>, this is still an experimental setting and different from the clinical setting. These animals were healthy, without renal tumors or any other medical condition. The pigs were not subjected to partial nephrectomy, but only to warm ischemia. However, we can imagine that in a clinical scenario the glomerular loss would be even higher after partial nephrectomy than what was observed in this study.

## CONCLUSIONS

About one quarter of the glomeruli is lost after 30 minutes of renal warm ischemia in a pig model. No significant glomerular loss occurs at 10 or 20 minutes of warm ischemia. There is

a progressive loss of kidney glomeruli relative to warm ischemia time. This confirms that every minute counts when dealing with a kidney under warm ischemia.

## REFERENCES

- 1 Mashni JW, Assel M, Maschino A, Russo M, Masi B, Bernstein M, Huang WC, Russo P. New chronic kidney disease and overall survival after nephrectomy for small renal cortical tumors. *Urology*. 2015 Dec;86(6):1137-43. doi: 10.1016/j.urology.2015.07.046.
- 2 Campbell SC, Novick AC, Belldegrün A, Blute ML, Chow GK, Derweesh IH, Faraday MM, Kaouk JH, Leveillee RJ, Matin SF, Russo P, Uzzo RG. Guideline for management of the clinical T1 renal mass. *J Urol*. 2009 Oct;182(4):1271-9. doi: 10.1016/j.juro.2009.07.004.
- 3 Ljungberg B, Bensalah K, Canfield S, Dabestani S, Hofmann F, Hora M, Kuczyk MA, Lam T, Marconi L, Merseburger AS, Mulders P, Powles T, Staehler M, Volpe A, Bex A. EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update. *Eur Urol*. 2015 May;67(5):913-24. doi: 10.1016/j.eururo.2015.01.005.
- 4 George AK, Herati AS, Srinivasan AK, Rais-Bahrami S, Waingankar N, Sadek MA, Schwartz MJ, Okhunov Z, Richstone L, Okeke Z, Kavoussi LR. Perioperative outcomes of off-clamp vs complete hilar control laparoscopic partial nephrectomy. *BJU Int*. 2013 Apr;111(4 Pt B):E235-41. doi: 10.1111/j.1464-410X.2012.11573.x.
- 5 Lane BR, Russo P, Uzzo RG, Hernandez AV, Boorjian SA, Thompson RH, Fergany AF, Love TE, Campbell SC. Comparison of cold and warm ischemia during partial nephrectomy in 660 solitary kidneys reveals predominant role of nonmodifiable factors in determining ultimate renal function. *J Urol*. 2011 Feb;185(2):421-7. doi: 10.1016/j.juro.2010.09.131.
- 6 Pignot G, Bouliere F, Patard JJ. Warm ischaemia: the ultimate enemy for partial nephrectomy? *Eur Urol*. 2010 Sep;58(3):337-9. doi: 10.1016/j.eururo.2010.07.002.
- 7 Zhang Z, Zhao J, Dong W, Remer E, Li J, Demirjian S, Zabell J, Campbell SC. Acute kidney injury after partial nephrectomy: role of parenchymal mass reduction and ischemia and impact on subsequent functional recovery. *Eur Urol*. 2016 Apr;69(4):745-52. doi: 10.1016/j.eururo.2015.10.023.
- 8 Thompson RH, Lane BR, Lohse CM, Leibovich BC, Fergany A, Frank I, Gill IS, Blute ML, Campbell SC. Every minute counts when the renal hilum is clamped during partial nephrectomy. *Eur Urol*. 2010 Sep;58(3):340-5. doi: 10.1016/j.eururo.2010.05.047.
- 9 Becker F, Van Poppel H, Hakenberg OW, Stief C, Gill I, Guazzoni G, Montorsi F, Russo P, Stockle M. Assessing the impact of ischaemia time during partial nephrectomy. *Eur Urol*. 2009 Oct;56(4):625-34. doi: 10.1016/j.eururo.2009.07.016.
- 10 Lane BR, Fergany AF, Weight CJ, Campbell SC. Renal functional outcomes after partial nephrectomy with extended ischemic intervals are better than after radical nephrectomy. *J Urol*. 2010 Oct;184(4):1286-90. doi: 10.1016/j.juro.2010.06.011.
- 11 Ramirez D, Caputo P, Krishnan J, Zargar H, Kaouk JH. Robotic partial nephrectomy with intracorporeal renal hypothermia using ice slush: step-by-step technique and matched comparison to warm ischemia. *BJU Int*. 2016 Mar;117(3):531-6. doi: 10.1111/bju.13346.

- 12 Zhang Z, Zhao J, Velet L, Ercole CE, Remer EM, Mir CM, Li J, Takagi T, Demirjian S, Campbell SC. Functional recovery from extended warm ischemia associated with partial nephrectomy. *Urology*. 2016 Jan;87:106-13. doi: 10.1016/j.urology.2015.08.034.
- 13 Bagetti-Filho HJ, Sampaio FJ, Marques RG, Pereira-Sampaio MA. Different from renal artery only clamping, artery and vein clamping causes a significant reduction in number of rat glomeruli during warm ischemia. *J Endourol*. 2012 Oct;26(10):1335-9. doi: 10.1089/end.2012.0166.
- 14 de Souza DB, de Oliveira LL, da Cruz MC, Abilio EJ, Costa WS, Pereira-Sampaio MA, Sampaio FJ. Laparoscopic partial nephrectomy under warm ischemia reduces the glomerular density in a pig model. *J Endourol*. 2012 Jun;26(6):706-10. doi: 10.1089/end.2011.0412.
- 15 de Souza DB, Abilio EJ, Costa WS, Sampaio MA, Sampaio FJ. Kidney healing after laparoscopic partial nephrectomy without collecting system closure in pigs. *Urology*. 2011 Feb;77(2):508 e5-9. doi: 10.1016/j.urology.2010.08.017.
- 16 Bechara GR, Damasceno-Ferreira JA, Abreu LA, Costa WS, Sampaio FJ, Pereira-Sampaio MA, Souza DB. Glomerular loss after arteriovenous and arterial clamping for renal warm ischemia in a swine model. *Acta Cir Bras*. 2016 Nov;31(11):753-8. doi: 10.1590/S0102-865020160110000008.
- 17 Ribeiro CT, Milhomem R, De Souza DB, Costa WS, Sampaio FJ, Pereira-Sampaio MA. Effect of antioxidants on outcome of testicular torsion in rats of different ages. *J Urol*. 2014 May;191(5 Suppl):1578-84. doi: 10.1016/j.juro.2013.09.066.
- 18 Abreu LA, Damasceno-Ferreira JA, Costa WS, Pereira-Sampaio M, Sampaio FJ, de souza D. Glomerular loss after renal radiofrequency ablation are comparable to 30 minutes of warm ischemia. *J Endourol*. 2017 Apr 18. doi: 10.1089/end.2016.0899. [Epub ahead of print]
- Souza DB, Costa WS, Cardoso LE, Benchimol M, Pereira-Sampaio MA, Sampaio FJ. Does prolonged pneumoperitoneum affect the kidney? Oxidative stress, stereological and electron microscopy study in a rat model. *Int Braz J Urol*. 2013 Jan-Feb;39(1):30-6. doi: 10.1590/S1677-5538.
- 20 Bechara GR, de Souza DB, Simoes M, Felix-Patricio B, Medeiros JL, Jr., Costa WS, Sampaio FJ. Testicular morphology and spermatozoid parameters in spontaneously hypertensive rats treated with enalapril. *J Urol*. 2015 Nov;194(5):1498-503. doi: 10.1016/j.juro.2015.06.073.
- 21 de Souza DB, Silva D, Cortez CM, Costa WS, Sampaio FJ. Effects of chronic stress on penile corpus cavernosum of rats. *J Androl*. 2012 Jul-Aug;33(4):735-9. doi: 10.2164/jandrol.111.014225.
- 22 Benchimol de Souza D, Silva D, Marinho Costa Silva C, Barcellos Sampaio FJ, Silva Costa W, Martins Cortez C. Effects of immobilization stress on kidneys of Wistar male rats: a morphometrical and stereological analysis. *Kidney Blood Press Res*. 2011 34(6):424-9. doi: 10.1159/000328331.
- 23 Bechara G, Damasceno-Ferreira JA, Abreu LA, Costa WS, Sampaio FJ, Pereira-Sampaio M, de souza D. Glomerular morphology and renal function after warm ischemia by main artery or selective clamping in a porcine model. *Urol Int*. 2017 Mar 30. doi: 10.1159/000458762. [Epub ahead of print]

24 Kim SP, Thompson RH. Kidney function after partial nephrectomy: current thinking. *Curr Opin Urol*. 2013 Mar;23(2):105-11. doi: 10.1097/MOU.0b013e32835d8ec1.

25 Patel AR, Eggener SE. Warm ischemia less than 30 minutes is not necessarily safe during partial nephrectomy: every minute matters. *Urol Oncol*. 2011 Nov-Dec;29(6):826-8. doi: 10.1016/j.urolonc.2011.02.015.

26 Hokke SN, Armitage JA, Puelles VG, Short KM, Jones L, Smyth IM, Bertram JF, Cullen-McEwen LA. Altered ureteric branching morphogenesis and nephron endowment in offspring of diabetic and insulin-treated pregnancy. *PLoS One*. 2013;8(3):e58243. doi: 10.1371/journal.pone.0058243.

27 Berczi C, Thomas B, Bacso Z, Flasko T. Long-term oncological and functional outcomes of partial nephrectomy in solitary kidneys. *Clin Genitourin Cancer*. 2016 Jun;14(3):e275-81. doi: 10.1016/j.clgc.2015.11.014.

28 Thompson RH, Lane BR, Lohse CM, Leibovich BC, Fergany A, Frank I, Gill IS, Campbell SC, Blute ML. Comparison of warm ischemia versus no ischemia during partial nephrectomy on a solitary kidney. *Eur Urol*. 2010 Sep;58(3):331-6. doi: 10.1016/j.eururo.2010.05.048.

29 Pereira-Sampaio MA, Favorito LA, Sampaio FJ. Pig kidney: anatomical relationships between the intrarenal arteries and the kidney collecting system. Applied study for urological research and surgical training. *J Urol*. 2004 Nov;172(5 Pt 1):2077-81. PMID: 15540793.

**Financial sources:** CNPq, CAPES, FAPERJ

## Anexo A – Comissão de Ética



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES

**ibrag**  
Instituto de Biologia  
Roberto Alcântara  
Gomes

**COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS**  
**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/048/2011 sobre "Estudo do rim suíno submetido a diferentes tempos de isquemia quente", sob a responsabilidade de **Francisco J. B. Sampaio**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA), em 24/11/2011. Este certificado expira em 24/11/2015.

Rio de Janeiro, 24 de Novembro de 2011.

Prof. Patricia Cristina Lisboa  
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Patricia Cristina Lisboa da Silva  
Sub-Chefe do Dept. de Ciências Fisiológicas  
IBRAG/UERJ - Mal. 34765-8


Prof. Israel Felzenszwalb  
CEUA/IBRAG/UERJ

Israel Felzenszwalb  
Diretor  
IBRAG - UERJ  
Mal. 2857-8



## Anexo B - Comprovação de submissão do 2º artigo

---

 Gmail Diogo Benchimol <diogobenchimol@gmail.com>

---

**Confirmation of your submission to BMC Urology - BURO-D-16-00275**  
1 mensagem

---

**BMC Urology Editorial Office** <em@editorialmanager.com> 28 de setembro de 2016 13:07  
Responder a: BMC Urology Editorial Office <bmcurol@biomedcentral.com>  
Para: Diogo Benchimol De Souza <diogobenchimol@gmail.com>

BURO-D-16-00275  
Mannitol reduces the nephron loss after warm renal ischemia in a porcine model  
José Aurelino Damasceno-Ferreira; Leonardo Albuquerque dos Santos Abreu; Gustavo Ruschi Bechara; Waldemar Silva Costa; Marco Aurélio Pereira-Sampaio; Francisco José Barcellos Sampaio; Diogo Benchimol De Souza, PhD  
BMC Urology

Dear Prof De Souza,

Thank you for submitting your manuscript 'Mannitol reduces the nephron loss after warm renal ischemia in a porcine model' to BMC Urology.

The submission id is: BURO-D-16-00275  
Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following website:  
<http://buro.edmgr.com/>

If you have forgotten your username or password please use the "Send Login Details" link to get your login information. For security reasons, your password will be reset.

Best wishes,

Editorial Office  
BMC Urology  
<http://www.biomedcentral.com/bmcurol/>

## Anexo C- Formato final do 2º artigo

**BMC Urology****Mannitol reduces the nephron loss after warm renal ischemia in a porcine model**

--Manuscript Draft--

|  |  |  |                                       |  |                                       |  |                               |
|--|--|--|---------------------------------------|--|---------------------------------------|--|-------------------------------|
| <b>Manuscript Number:</b>  |  |  |                                       |  |                                       |  |                               |
| <b>Full Title:</b>   | Mannitol reduces the nephron loss after warm renal ischemia in a porcine model   |  |                                       |  |                                       |  |                               |
| <b>Article Type:</b>   | Research article   |  |                                       |  |                                       |  |                               |
| <b>Section/Category:</b>   | Endourology and Technology   |  |                                       |  |                                       |  |                               |
| <b>Funding Information:</b>  | <table border="1"> <tr> <td>National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)</td> <td>Prof Francisco José Barcellos Sampaio</td> </tr> <tr> <td>Coordination for the Improvement of Post-Graduate Students (CAPES)</td> <td>Prof Francisco José Barcellos Sampaio</td> </tr> <tr> <td>Foundation for Research Support of Rio de Janeiro (FAPERJ)</td> <td>Prof Diogo Benchimol De Souza</td> </tr> </table>  | National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) | Prof Francisco José Barcellos Sampaio | Coordination for the Improvement of Post-Graduate Students (CAPES) | Prof Francisco José Barcellos Sampaio | Foundation for Research Support of Rio de Janeiro (FAPERJ) | Prof Diogo Benchimol De Souza |
| National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) | Prof Francisco José Barcellos Sampaio  |  |                                       |  |                                       |  |                               |
| Coordination for the Improvement of Post-Graduate Students (CAPES)   | Prof Francisco José Barcellos Sampaio  |  |                                       |  |                                       |  |                               |
| Foundation for Research Support of Rio de Janeiro (FAPERJ)           | Prof Diogo Benchimol De Souza  |  |                                       |  |                                       |  |                               |
| <b>Abstract:</b>   | <p>Background: Mannitol has been used for ameliorating renal warm ischemia damage during partial nephrectomy, although little scientific evidence supports its use for this purpose.</p> <p>Objective: To investigate the glomerular number after renal warm ischemia with and without the use of mannitol in a pig model.</p> <p>Methods: Twenty-four male pigs were assigned into three groups. Eight animals were allocated in the sham group, which was subjected to laparoscopic dissection of the left renal hilum, without renal ischemia. Eight animals were allocated in the ischemia group, which had the left renal hilum clamped for 30 minutes by laparoscopic access. Eight animals received mannitol (250 mg/kg) before occlusion of renal hilum for 30 minutes. Animals were killed 21 days after surgery when kidneys were collected. Right kidney was used as self-controls for each animal. Serum creatinine and urea levels and weight and volume of kidneys were measured. Glomerular volumetric density, volume-weighted glomerular volume, and cortical volume were quantified by stereological methods and used to calculate the number of nephrons per kidney. Student's t test and ANOVA were used for statistical analysis.</p> <p>Results: In the ischemia group, the left kidney had a reduction of 24.6% (290,000 glomeruli) on the number of glomeruli in comparison with the right kidney. Kidneys subjected to ischemia also showed decreased weight and volume in comparison with sham and mannitol groups. There was no difference between left and right kidneys in the sham and mannitol groups. Also, there was no difference on serum creatinine and urea among the groups.</p> <p>Conclusion: The use of mannitol significantly reduces the nephron loss during warm ischemia in pigs.</p> |  |                                       |  |                                       |  |                               |
| <b>Corresponding Author:</b>   | Diogo Benchimol De Souza, PhD<br>Rio de Janeiro State University<br>Rio de Janeiro, RJ BRAZIL  |  |                                       |  |                                       |  |                               |
| <b>Corresponding Author Secondary Information:</b>                   |  |  |                                       |  |                                       |  |                               |
| <b>Corresponding Author's Institution:</b>                           | Rio de Janeiro State University  |  |                                       |  |                                       |  |                               |
| <b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>                 |  |  |                                       |  |                                       |  |                               |
| <b>First Author:</b>   | José Aurelino Damasceno-Ferreira   |  |                                       |  |                                       |  |                               |
| <b>First Author Secondary Information:</b>                           |  |  |                                       |  |                                       |  |                               |
| <b>Order of Authors:</b>   | <table border="1"> <tr> <td>José Aurelino Damasceno-Ferreira</td> </tr> <tr> <td>Leonardo Albuquerque dos Santos Abreu</td> </tr> <tr> <td>Gustavo Ruschi Bechara</td> </tr> <tr> <td>Waldemar Silva Costa</td> </tr> <tr> <td>Marco Aurélio Pereira-Sampaio</td> </tr> </table>   | José Aurelino Damasceno-Ferreira                                     | Leonardo Albuquerque dos Santos Abreu | Gustavo Ruschi Bechara   | Waldemar Silva Costa                  | Marco Aurélio Pereira-Sampaio                              |                               |
| José Aurelino Damasceno-Ferreira                                     |  |  |                                       |  |                                       |  |                               |
| Leonardo Albuquerque dos Santos Abreu                                |  |  |                                       |  |                                       |  |                               |
| Gustavo Ruschi Bechara   |  |  |                                       |  |                                       |  |                               |
| Waldemar Silva Costa   |  |  |                                       |  |                                       |  |                               |
| Marco Aurélio Pereira-Sampaio  |  |  |                                       |  |                                       |  |                               |