



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Gustavo Ruschi Bechara

**Avaliação da perda glomerular após isquemia quente arteriovenosa,
arterial ou seletiva no modelo suíno**

Rio de Janeiro

2016

Gustavo Ruschi Bechara

**Avaliação da perda glomerular após isquemia quente arteriovenosa, arterial ou seletiva
no modelo suíno**

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.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio

Coorientador: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza

Rio de Janeiro

2016

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

B391 Bechara, Gustavo Ruschi

Avaliação da perda glomerular após isquemia quente arteriovenosa, arterial ou seletiva no modelo suíno / Gustavo Ruschi Bechara. – 2016.
69 f.

Orientador: Francisco José Barcellos Sampaio

Coorientador: Diogo Benchimol de Souza

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

1. Rins- Cirurgia- Teses 2. Laparoscopia – Teses. 3. Cirurgia experimental – Teses. I. Sampaio, Francisco José Barcellos. II. Souza, Diogo Benchimol de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.61-089

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

Assinatura

Data

Gustavo Ruschi Bechara

**Avaliação da perda glomerular após isquemia quente arteriovenosa, arterial ou seletiva
no modelo suíno**

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.

Aprovada em 14 de dezembro de 2016.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luciano Alves Favorito

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Sampaio

Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Maurício Gonçalves Rubinstein

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Gustavo Peixoto Soares Miguel

Universidade Federal do Estado do Espírito Santo

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, José Antônio e Aparecida, pelos ensinamentos e confiança em mim depositada. A minha irmã Alexandra, pela amável convivência e companheirismo. Amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Francisco J. B. Sampaio, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas – Área de Concentração Urogenital – da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, pela oportunidade de fazer parte de um grupo altamente qualificado, tendo sido fundamental para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Dr. Diogo Benchimol De Souza, meu co-orientador, pela dedicação nas diversas revisões deste trabalho e pelo estímulo para prosseguir nos momentos mais difíceis.

Ao Dr. Luciano Alves Favorito pela disponibilidade de tempo sempre que necessário.

Ao corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos demais colegas da Unidade Urogenital, pela amizade e profissionalismo durante a execução do projeto.

Aos colegas urologistas do Hospital da Lagoa pelo carinho com que fui recebido ao longo desses anos. Que eu possa dar continuidade aos meus trabalhos, com a mesma dedicação e espírito de união que aqui aprendi.

Aos colegas urologistas do Serviço de Urologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM-UFES), pela presença diária que me remetem a um ambiente familiar.

Aos meus pais José Antônio e Aparecida, pelo estímulo na realização deste programa de pós-graduação, pelos exemplos de honestidade e perseverança que sempre me transmitiram com todo amor e dedicação ao longo de minha vida. Sem vocês nada disso seria possível.

A minha irmã Alexandra, pelo companheirismo e apoio incondicional.

A minha namorada Nathalia, pelo carinho, amizade e compreensão nos momentos de ausência.

Ao meu cunhado e amigo Felipe por toda atenção dispensada.

A minha professora Francisca que muito contribuiu na correção desta tese.

A família e amigos agradeço pelo apoio, torcida, carinho e atenção a mim dedicados.

Agradeço também, a todos aqueles que de forma direta ou indireta, contribuíram para que este trabalho tenha sido realizado.

RESUMO

BECHARA, Gustavo Ruschi. *Avaliação da perda glomerular após isquemia quente arteriovenosa, arterial ou seletiva no modelo suíno* 2016. 69 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

O objetivo desse trabalho foi avaliar, no modelo suíno, a repercussão da isquemia renal quente, após clampeamento arterial seletivo (ramo caudal da artéria renal), através de testes funcionais e análise estereológica morfométrica, e comparar com os resultados obtidos após oclusão arteriovenosa ou arterial isolada. Trinta e dois animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (com oito animais em cada grupo) foram utilizados no estudo. No grupo controle (SHAM), ambos os rins foram submetidos exclusivamente ao pneumoperitônio. No grupo (AV) foi realizado o clampeamento em bloco da artéria e veia renal esquerda. No grupo (A) foi realizado o clampeamento da artéria renal esquerda isolada. E no grupo (S) o ramo caudal da artéria renal esquerda foi ocluído seletivamente. Para todos os grupos, os rins foram submetidos a 30 minutos de isquemia quente por uma abordagem laparoscópica. O rim direito não foi manipulado durante o experimento e foi utilizado como controle. Os animais foram sacrificados após 21 dias e os rins removidos. Os fragmentos renais foram processados para avaliação estereológica. O volume glomerular médio (VGM), a densidade volumétrica glomerular (Vv [glom]), a relação córtico-medular, a densidade glomerular e o número de glomérulos foram avaliados. Os níveis séricos de creatinina e ureia também foram mensurados no pré-operatório, 10 dias após a cirurgia e antes da eutanásia. No grupo AV observou-se uma redução de 24,5% no Vv [Glom] do rim esquerdo e uma redução de 25,4% e 19,2% no VGM e número de glomérulos respectivamente, quando comparado ao rim direito. Do mesmo modo, quando comparado o Vv [Glom], VGM e Nv(glom/rim) do rim esquerdo do grupo AV com o dos grupos SHAM, A e S uma diminuição importante foi encontrada. Por outro lado, no presente estudo, a técnica de clampeamento arterial seletiva não foi superior a oclusão da artéria renal isolada. Não houve diferença significativa nos níveis séricos de creatinina e ureia nos diferentes momentos do experimento. Com base neste estudo, as técnicas de pinçamento arterial ou seletiva devem ser preferidas em relação ao clampeamento arteriovenoso, por apresentarem menor efeito deletério ao glomérulo. Além disso, no presente estudo, a técnica de oclusão arterial seletiva não trouxe nenhum benefício, quando comparada ao clampeamento da artéria renal principal.

Palavras-chave: Nefrectomia parcial. Laparoscopia. Isquemia quente. Clampeamento.

ABSTRACT

BECHARA, Gustavo Ruschi. *Glomerular loss evaluation after arteriovenous, arterial or selective ischemia in the porcine model*. 69 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

The objective of this study was to evaluate, in pigs, the renal function repercussion after warm ischemia with selective arterial clamping (left renal artery caudal branch), through functional tests and morphometric stereological analysis, and compare with the results obtained after arteriovenous occlusion or isolated renal artery clamping. Thirty-two animals were randomly allocated into four groups (with eight animals in each group) were used in the study. In the control group (SHAM), both kidneys were exclusively submitted to pneumoperitoneum. In the (AV) group, the left renal artery and vein were clamped in block. In group (A), the left renal artery was singly clamped. And in group (S) the left renal artery caudal branch was selectively occluded. For all groups, the kidneys were submitted to 30 minutes of warm ischemia by a laparoscopic approach. The right kidney was not manipulated during the experiment and was used as control. The animals were euthanized after 21 days, and kidneys were collected. Renal fragments were processed for stereological morphometrical evaluation. Glomerular mean volume (GMV), glomerular volume density (Vv [glom]), cortico-medullary analysis, glomerular density and number of nephrons were assessed. Creatinine and urea serum levels were also assessed preoperatively, 10 days after surgery and before euthanasia. In AV group was observed a reduction of 24.5% in the Vv [Glom] of the left kidney and a reduction of 25.4% and 19.2% in the VGM and number of glomeruli, respectively, when compared to the right kidney. Similarly, when compared the Vv [Glom], GMV and Nv (glom / rim) of the left kidney AV group with those of the SHAM, A and S groups, a significant decrease was found. On the other hand, in the present study, the selective arterial clamping technique was not superior to isolated renal artery occlusion. There was no significant difference in serum creatinine and urea levels at the different moments of the experiment. Based on this study, arterial or selective clamping techniques should be preferred in relation to arteriovenous clamping, since they have a lower glomerulus deleterious effect. Moreover, in the present study, the technique of selective arterial occlusion did not bring any benefit, when compared to the clamping of the main renal artery.

Keywords: Partial nephrectomy. Laparoscopy. Warm ischemia. Vascular clamping.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ilustração dos cirurgiões pioneiros na realização da nefrectomia.....	13
Figura 2 -	Esquema representativo dos grupos em estudo.....	21
Figura 3 -	Fotos das etapas da anestesia peridural.....	22
Figura 4 -	Fotos do posicionamento do animal na mesa cirúrgica.....	23
Figura 5 -	Fotos dos tempos da abordagem renal laparoscópica.....	24
Figura 6 -	Foto da anatomia do hilo renal esquerdo no modelo suíno.....	24
Figura 7 -	Fotos das diferentes técnicas de clampeamento vascular renal.....	25
Figura 8 -	Fotografia da secção renal (princípio de Cavalieri).....	27
Figura 9 -	Fotografia de corte transversal do rim. Quantificação da relação córtico-medular.....	28
Figura 10 -	Foto dos locais de retirada dos fragmentos para estudo.....	29
Figura 11 -	Fotomicrografia de corte transversal dos glomérulos renais. Quantificação da densidade volumétrica do glomérulo (Vv[glom]) He 200x.....	30
Figura 12 -	Fotomicrografia de corte transversal dos glomérulos renais Quantificação do volume médio do glomérulo (VGM).HE 200x.....	31
Figura 13 -	Média dos pesos dos rins direitos e esquerdos (g) dos animais pertencentes aos diferentes grupos.....	34
Figura 14 -	Média dos volumes dos rins direitos e esquerdos (cm ³) dos animais pertencentes aos diferentes grupos.....	35
Figura 15 -	Comparação da média dos pesos (g) dos rins direitos e esquerdos entre os grupos em estudo	35
Figura 16 -	Comparação da média dos volumes (cm ³) dos rins direitos e e esquerdos entre os grupos em estudo	36
Figura 17 -	Gráfico demonstrativo dos níveis séricos de creatinina e ureia (mg/dl) nos diferentes momentos do estudo.....	37
Figura 18 -	Média das densidades volumétricas glomerulares dos rins direitos e esquerdos (%) dos animais pertencentes aos diferentes grupos.....	38
Figura 19 -	Comparação da média das densidades volumétricas glomerulares (%) dos rins direitos e esquerdos entre os grupos em estudo	39

Figura 20 - Média do volume glomerular médio dos rins direito e esquerdo (um ³) dos animais pertencentes aos diferentes grupos.....	40
Figura 21 - Comparação da média do volume glomerular médio (um ³) dos rins direito e esquerdo entre os grupos em estudos.....	40
Figura 22 - Média da densidade glomerular dos rins direito e esquerdo (glom/mm ³) dos animais pertencentes aos diferentes grupos.....	41
Figura 23 - Comparação da média da densidade glomerular (glom/mm ³) dos rins direito e esquerdo entre os grupos em estudo.....	41
Figura 24 - Fotomicrografia comparativa de corte transversal dos glomérulos renais dos animais pertencentes aos diferentes grupos. HE 200 x.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Peso e volume (Scherle) dos rins dos animais pertencentes aos diferentes grupos.....	36
Tabela 2-	Dados estereológicos dos rins de animais pertencentes aos diferentes grupos.....	42
Tabela 3-	Dados biométricos e estereológicos dos rins de animais pertencentes aos diferentes grupos.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCR	Carcinoma de células renais
NR	Nefrectomia radical
NP	Nefrectomia parcial
NRL	Nefrectomia radical laparoscópica
NPL	Nefrectomia parcial laparoscópica
O ₂	Oxigênio
ATP	Adenosina trifosfato
AV	Artério-venoso
A	Arterial
S	Seletivo
CR	Cranial
CA	Caudal
CO ₂	Dióxido de carbono
V _v	Densidade volumétrica
VGM	Volume glomerular médio
DV	Densidade glomerular
N _v	Número de glomérulos

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	OBJETIVOS	19
1.1	Geral	19
1.2	Específicos	19
2	MATERIAL E MÉTODO	20
2.1	Local do Estudo	20
2.2	Animais	20
2.3	Técnica cirúrgica	21
2.3.1	<u>Anestesia</u>	21
2.3.2	<u>Posicionamento</u>	23
2.3.3	<u>Cirurgia laparoscópica</u>	23
2.3.4	<u>Clampeamento vascular</u>	25
2.3.5	<u>Analgesia pós-operatória</u>	26
2.4	Eutanásia e coleta de amostras	26
2.5	Avaliações biométricas	26
2.5.1	<u>Peso do rim e Teste de scherle</u>	26
2.5.2	<u>Relação córtico-medular</u>	27
2.6	Avaliação da função renal	28
2.7	Análises estruturais	28
2.8	Densidade volumétrica do glomerular	29
2.9	Volume glomerular médio	31
2.10	Densidade glomerular	32
2.11	Número de glomérulos	32
2.12	Análise estatística	32
3	RESULTADOS	34
3.1	Avaliação biométricas	34
3.1.1	<u>Peso renal e teste de sherle</u>	34
3.1.2	<u>Relação córtico-medular</u>	36
3.2	Avaliação da função renal	37
3.3	Densidade volumétrica glomerular	38
3.4	Volume glomerular médio	39

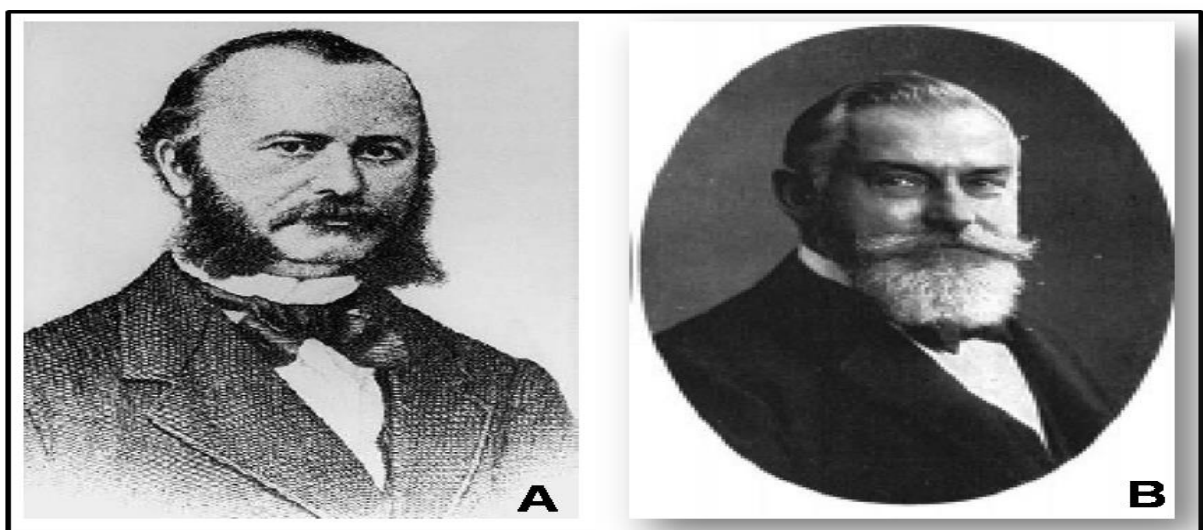
3.5	Número de glomérulos	41
4	DISCUSSÃO	46
	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52
	APÊNDICE A - Formato final do 1 ^o artigo científico submetido.....	58
	APÊNDICE B - Formato final do 2 ^o artigo científico submetido.....	64
	ANEXO - Aprovação do Comitê de Ética.....	69

INTRODUÇÃO

O carcinoma renal é a terceira neoplasia maligna urológica mais frequente, respondendo por aproximadamente 2-3% de todos os tumores sólidos na população adulta. O carcinoma de células renais (CCR), por sua vez, corresponde a 85% destes tumores, ocorrendo uma taxa estimada de 4,4 a 11,1/100.000 pessoas/ano (1, 2).

A nefrectomia radical (NR) foi a abordagem cirúrgica de escolha no tratamento do tumor não metastático, método introduzido por Robson em 1969, ao qual demonstrou que a ligadura precoce dos vasos renais diminuía o risco de disseminação tumoral hematológica quando acompanhada da ressecção da gordura perirenal e linfadenctomia hilar (3). No entanto, a cirurgia renal teve um início pouco planejado, quando um rim (Walcott, 1861) e parte do órgão (Spiegelberg, 1867) foram removidos equivocadamente durante exérese de cistos hepático. Em 1869, Gustav Simon realizou com sucesso a primeira nefrectomia para tratamento de fístula urinária, e em 1884 Spancer Wells removeu acidentalmente um terço do rim durante a enucleação de um fibrolipoma perirrenal (Figura1). Já Vincenz Czerny é creditado como sendo o primeiro cirurgião a realizar ressecção parcial programada de um tumor renal (angiossarcoma) em 1887, 18 anos após a primeira nefrectomia (4, 5, 6).

Figura 1. Ilustração dos cirurgiões pioneiros na realização da nefrectomia. A- Gustav Simon (1824-1876). B- Vincenz Czerny. Herr HW et al. J Urol. (2005).



Com o avançar dos conhecimentos anatômicos e aprimoramento técnico, cirurgias poupadoras de néfrons, antes realizadas apenas para o tratamento de lesões renais suspeitas, passaram a ser indicadas para doenças não cancerosas, como cistos, tumores benignos, hidronefrose localizada, pielonfroses com ou sem cálculos e fístula renal. Como resultado, a nefrectomia parcial (NP) gradativamente superou a nefrectomia total no tratamento destas condições. Por outro lado, os cirurgiões continuaram a acreditar que a NR era a única opção eficaz para o tratamento dos tumores renais malignos, o que dificultou a consolidação das cirurgias poupadoras de néfrons (6).

No humano, a artéria renal principal divide-se em ramos anterior e posterior. Enquanto o ramo posterior prossegue como artéria segmentar para suprir a face posterior sem ramificações significantes, o ramo anterior da artéria renal fornece três ou quatro artérias segmentares. Sampaio FJ et al. (1990) descreveu a relação anatômica entre as artérias intrarrenais e o sistema coletor (7, 8, 9).

Pereira-Sampaio MA et al. (2004) descreveu detalhes fundamentais sobre a vascularização arterial do rim suíno, identificando a existência de uma única artéria por rim e que a mesma divide-se em ramos cranial e caudal na maioria dos casos (10).

Quanto a drenagem venosa nos seres humanos, a veia renal é formada por dois grandes ramos em 28,8% e três ramos em 53,8% dos casos (11). Bagetti Filho HJ et al. (2008) em seu estudo sobre a vascularização venosa do rim suíno, observou dois ramos (cranial e caudal) em 88,53% e três ramos (cranial, média e caudal) em 11,47% (12).

A laparoscopia evoluiu a partir de procedimentos diagnósticos e passou a assumir um papel importante como alternativa à cirurgia convencional. A primeira nefrectomia radical laparoscópica (NRL) foi realizada em 1990 por Ralph Clayman, enquanto a nefrectomia parcial laparoscópica (NPL), inicialmente descrita em modelos animais, foi realizada em 1992 por Howard Winflied em pacientes com pielonefrite e litíase (13, 14). No entanto, o verdadeiro papel da NP permanecia incerto por apresentar maior tempo de isquemia quente e risco de sangramento quando comparada à cirurgia aberta.

A utilização crescente e a modernização dos métodos de imagem nos últimos 20 anos, tais como a ultrassonografia, tomografia computadorizada, e ressonância magnética, têm levado a um aumento progressivo na detecção de pequenas massas renais (15, 16).

As opções terapêuticas para esses tipos de lesões têm evoluído drasticamente desde as primeiras séries de publicações de NR por Robson CJ et al. (1968) (17). No início, as nefrectomias parciais eram reservadas apenas para tumores renais bilaterais, lesões em rim único ou em pacientes com déficit funcional renal importante. Por apresentarem resultados

oncológicos equivalentes aos das cirurgias radicais, houve uma ampliação das indicações dos procedimentos poupadores de néfrons, cujo objetivo principal é a ressecção tumoral com margem de segurança, preservando o máximo de parênquima renal funcionante (18).

O principal argumento favorável a NR é a presença de doença multifocal no rim afetado, o que pode ocorrer entre 7% e 20% dos casos (19). No entanto, as baixas taxas de recorrência evidenciadas em estudos recentes, sugerem que a multifocalidade seja clinicamente pouco significativa (20). Além disso, nenhuma correlação foi encontrada entre multifocalidade tumoral e outras variáveis, como o tamanho do tumor, volume, estadió clínico e grau histológico de Furhman (19). Outro argumento para a NR, é o baixo risco (1% a 2%) de um CCR contralateral subsequente em comparação com o risco de recorrência local observada após NP (21).

No entanto, a decisão pela NR predispõe a um risco aumentado de doença renal crônica, eventos cardiovasculares e mortalidade global. Isto foi observado por Huang WC et al. (2006), que relatou sua experiência em pacientes portadores de tumor renal T1a (≤ 4 cm) e rim contralateral normal, que foram submetidos à NR ou NP. Neste estudo foi demonstrado que os pacientes com taxa de filtração glomerular pré-operatório superior a 60 ml/min, quando submetidos à NR, apresentavam uma queda significativa da taxa de filtração glomerular quando comparado àqueles submetidos à cirurgia poupadora de néfrons. A presença de taxa de filtração glomerular menor que 45 ml/min em 5 anos de pós-operatório foi de 7% e 43% em pacientes que se submeteram a NP e NR, respectivamente. Além disso, ficou evidente a relação entre a insuficiência renal crônica e o aumento da morbi-mortalidade cardiovascular, sugerindo que a NR possa estar associada a uma redução da sobrevida global em longo prazo. Esses riscos são ainda maiores para aqueles pacientes portadores de rim único, insuficiência renal pré-operatória, hipertensão arterial sistólica, diabetes mellitus e idade avançada. (22, 23, 24, 25).

Diante desse contexto, técnicas poupadoras de néfrons como a nefrectomia parcial, ablação e vigilância ativa, surgiram como opções viáveis para o manejo destes pacientes.

Inicialmente, foram descritas três técnicas para a realização de cirurgia poupadora de néfrons: ressecção do tumor sem isquemia, nefrectomia parcial com isquemia quente ou isquemia regional através da compressão do parênquima renal (26).

A ressecção tumoral sem clampeamento pode ser utilizada para pequenas massas renais com baixo risco de sangramento, estando indicada apenas para casos bem selecionados (26).

A técnica empregando a compressão do parênquima renal permite a remoção de lesões sem o clampeamento do pedículo vascular. Como a constrição do parênquima é seletiva, a isquemia renal fica limitada apenas ao tecido adjacente a neoplasia. O tecido remanescente não é afetado, e o risco de insuficiência renal transitória ou definitiva é reduzido. Esta manobra de compressão foi realizada pela primeira vez na cirurgia aberta usando as mãos e, em seguida, braçadeiras (27).

Descrita pela primeira vez por Simon J et al. (2005), a pinça laparoscópica de Simon (Aesculap AG, Tuttlingen, Alemanha) é uma ferramenta desenvolvida para a compressão externa do parênquima renal, sendo colocada ao longo do tecido imediatamente circundante a lesão tumoral, criando assim uma isquemia renal regional durante a cirurgia minimamente invasiva (27). No entanto, a taxa de sangramento é maior quando comparada a isquemia quente.

A lesão parenquimatosa, resultante do processo de isquemia-reperfusão, ainda é a principal preocupação durante o período perioperatório, sendo a causa mais frequente de insuficiência renal aguda e crônica subsequente (28).

O mecanismo de lesão decorrente do processo de isquemia-reperfusão reflete as propriedades metabólicas das diferentes regiões do rim. A oxigenação do parênquima renal é caracterizada por altos níveis de oxigênio (O₂) na zona cortical e uma diminuição progressiva em direção à medula e as papilas. Assim, as células de cada uma das regiões (zona cortical, medular e papilar) são adaptadas aos diferentes níveis de O₂ dos respectivos microambientes, o que faz com que áreas específicas do rim sejam mais susceptíveis a lesão isquêmica do que outras. A região cortical, por exemplo, possui uma grande reserva de O₂ e, por isso, está relativamente protegida. Já as células epiteliais medulares se localizam em áreas com baixas reservas de O₂, o que faz essas células serem mais susceptíveis à hipóxia. As células epiteliais papilares, por sua vez, por pertencerem a um ambiente hipóxico contínuo, podem resistir mediante metabolismo anaeróbico transitório. No entanto, a diminuição da perfusão por longos períodos resultam em lesão parenquimatosa, cujo grau varia de acordo com a intensidade da isquemia (29, 30).

A interrupção do fluxo sanguíneo renal e a diminuição do aporte de O₂, seguida de reperfusão, desencadeiam uma série de eventos que levam à morte tecidual. Existem quatro fases distintas em resposta ao processo de isquemia-reperfusão. A fase de adaptação, caracterizada pela depleção de adenosina trifosfato (ATP) celular, resulta em um desequilíbrio de eletrólitos, edema celular e indução de resposta inflamatória. A fase de extensão é caracterizada pela restauração do fluxo sanguíneo renal e desencadeia inúmeros eventos

inflamatórios mediados por citocinas e linfócitos. A fase de manutenção é caracterizada pela inflamação induzida pela morte celular, apesar da resolução da hipóxia. E a fase de reparação é marcada pela proliferação celular com posterior restauração da função. A disfunção renal resulta, então, de uma combinação entre lesão vascular e tubular. A lesão endotelial causa vasoconstrição e disfunção do músculo liso vascular, o que leva à hipóxia do parênquima e lesão do epitélio tubular. As células tubulares lesionadas e mortas, por sua vez, descamam e obstruem o fluxo de urina, prejudicando a filtração glomerular. Assim, o processo de isquemia-reperfusão provoca lesão endotelial e tubular, estresse oxidativo e aumento da resposta inflamatória, a qual resulta em lesões renais irreversíveis (31, 32, 33).

A técnica de isquemia-reperfusão é amplamente utilizada na cirurgia renal preservadora de néfrons, tendo por objetivo a redução do sangramento intra-operatório, possibilitando um procedimento cirúrgico mais seguro. A isquemia renal pode ser produzida classicamente por oclusão simultânea da artéria e da veia renal ou pelo clampeamento da artéria renal isoladamente (34).

Tal clampeamento impõe, necessariamente, a lesão isquêmica do parênquima, causando certo grau de dano ao rim com consequente perda funcional (28, 35). Em pacientes com co-morbidades pré-existentes, disfunção renal prévia ou idade avançada, o impacto negativo da isquemia pode, potencialmente, ser ainda maior (22).

Apesar de Plaine e Hinman (1965) não terem observado diferença na função renal entre as técnicas de clampeamento arterial isolado e de oclusão concomitante da artéria e da veia renal, usando o coelho como modelo animal, outros estudos utilizando o suíno, cujo rim apresenta características anatômicas e fisiológicas mais próximas do rim humano, demonstraram que a oclusão arterial e venosa em bloco é mais prejudicial à função renal, sugerindo que a perfusão retrógrada através da veia renal, evitaria a congestão venosa do rim (36, 37).

Embora o clampeamento A tenha demonstrado benefícios em relação a oclusão AV, o controle hemostático em bloco ainda é utilizado por vários grupos por diminuir o risco de sangramento.

Gill IS et al. (2012) descreveu um novo conceito de NP conhecido como "zero" isquemia, com o objetivo de eliminar completamente a isquemia cirúrgica ao remanescente renal. Esta técnica incorpora a microdissecção seletiva da artéria renal, juntamente com a cuidadosa redução intra-operatória da pressão arterial. A dissecção da artéria renal principal é realizada para expor ramos arteriais secundários, terciários ou quaternários, seguido de clampeamento seletivo da irrigação tumoral (38, 39).

Apesar de estudos recentes demonstrarem uma maior preservação da função renal após a oclusão arterial seletiva, não existe até o momento na literatura trabalhos que avaliem quantitativamente o dano glomerular causado pelo clampeamento seletivo em comparação com as demais técnicas (40, 41).

Testes funcionais como a dosagem sérica de ureia, creatinina e a taxa de filtração glomerular têm sido utilizados para avaliar os efeitos da isquemia durante a NP em estudos clínicos e experimentais. No entanto, muitas vezes a função renal em curto prazo não é alterada mesmo após uma grande perda de glomérulos, e assim, estudos estereológicos devem ser priorizados. Para o aprimoramento de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a investigar objetivamente a morfologia glomerular após o clampeamento arterial seletivo.

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

Avaliar a repercussão da isquemia renal quente, após o clampeamento arterial seletivo (ramo caudal da artéria renal), utilizando testes funcionais (dosagem dos níveis séricos de ureia e creatinina) e métodos estereológicos (densidade volumétrica glomerular, volume glomerular médio, relação córtico-medular, densidade glomerular e número de glomérulos), utilizando o suíno como modelo experimental.

1.2 Específicos

Comparar os dados referentes ao clampeamento arterial seletivo com aqueles obtidos após oclusão arteriovenosa ou arterial isolada.

Avaliar possíveis diferenças quanto ao grau de lesão isquêmica glomerular de acordo com a técnica de clampeamento vascular utilizada.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Local do Estudo

Os procedimentos foram realizados nas instalações do laboratório de cirurgia experimental da fazenda escola, da faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF), em Cachoeiras de Macacú – RJ. As análises histológicas foram realizadas na Unidade de Pesquisa Urogenital da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), no Rio de Janeiro – RJ.

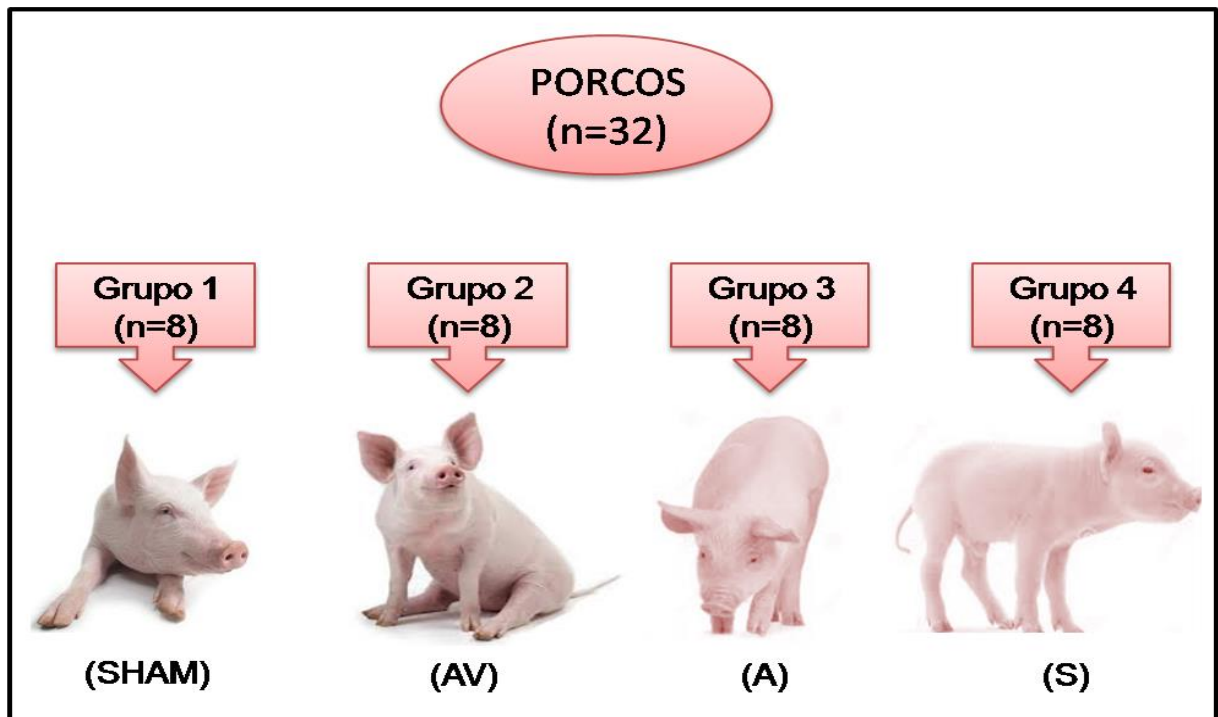
2.2 Animais

Todos os experimentos foram realizados de acordo com a legislação brasileira para o uso científico de animais, e este projeto foi formalmente aprovado pelo Comitê de Ética local para a experimentação animal (Anexo A).

Foram utilizados 32 porcos machos (*Sus Domesticus*), pesando 20 kg em média. Os animais foram acondicionados em baias coletivas e, receberam água e ração comercial *ad libidum* durante todo o experimento.

Os porcos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos com 08 animais em cada um deles (Figura 2). No grupo controle (SHAM), ambos os rins foram submetidos exclusivamente ao pneumoperitônio. No segundo grupo (AV) foi realizado o clampeamento em bloco da artéria e veia renal esquerda. No terceiro grupo (A) foi realizado o clampeamento da artéria renal esquerda isolada. E no quarto grupo (S) o ramo caudal da artéria renal esquerda foi ocluído seletivamente de acordo com a anatomia da espécie, previamente descrita. Neste último grupo, a porção inferior do rim esquerdo (CA) correspondente à região que foi submetido à isquemia e a porção superior (CR) referente a área na qual foi mantida a perfusão renal durante o clampeamento, foram avaliadas separadamente. O rim direito não foi manipulado ao longo do experimento e foi utilizado como controle.

Figura 2. Esquema representativo dos grupos em estudo. 1- Pneumoperitônio exclusivo. 2-Clampeamento arteriovenoso (AV). 3- Clampeamento arterial isolado. 4- Clampeamento arterial seletivo (S).



2.3 Técnica Cirúrgica

2.3.1 Anestesia

Os animais foram pré-medicados com acepromazina 0,05 mg/kg, midazolam 0,5 mg/Kg e ketamina 5 mg/Kg por via subcutânea, e transferidos para a mesa pré-operatória onde foi realizada a punção venosa, coleta de 10 ml de sangue periférico e anestesia peridural com Lidocaína 1% e Morfina 0,2 mg/ml (Figura 3). Os animais seguiram então para a mesa cirúrgica, onde se procedeu a intubação oro-traqueal seguida de anestesia geral com Propofol 2mg/Kg por via intravenosa.

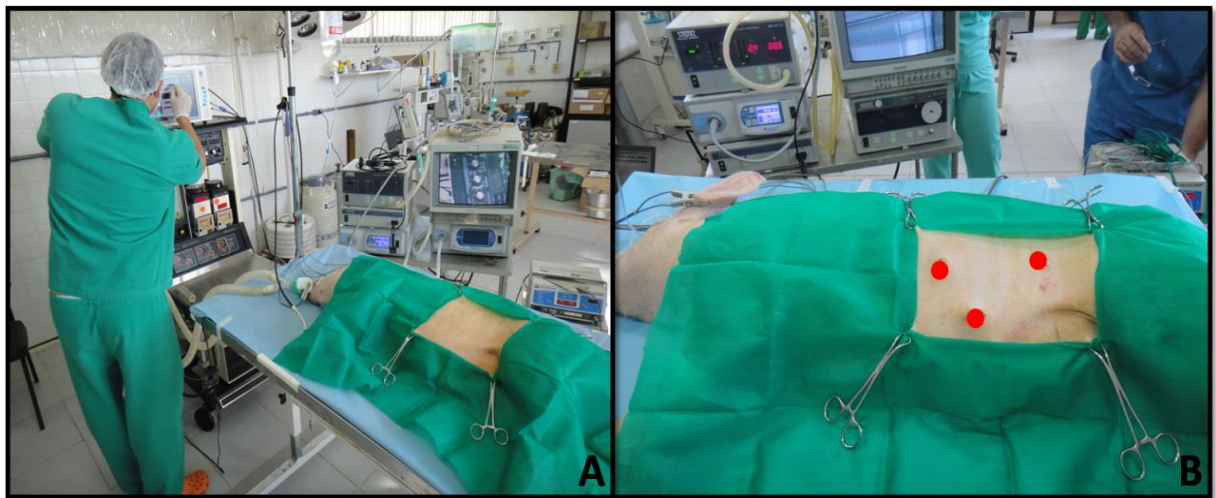
Figura 3. Fotos das etapas da anestesia peridural. A- Assepsia e colocação de campo estéril. B- Punção do espaço peridural. C- Confirmação do local de punção. D- Introdução do anestésico no espaço peridural.



2.3.2 Posicionamento

Os animais foram então posicionados em decúbito lateral direito e preparados para cirurgia sob técnica asséptica (Figura 4).

Figura 4. Fotos do posicionamento do animal na mesa cirúrgica. A- Decúbito lateral direito. B- Marcação dos locais para inserção dos portais.



2.3.3 Cirurgia laparoscópica

Após o posicionamento, antissepsia e colocação de campos estéreis, o procedimento cirúrgico foi iniciado. O rim esquerdo foi abordado por via laparoscópica transperitoneal com a colocação de três trocartes em uma adaptação à técnica realizada em humanos.

O primeiro trocar foi introduzido sob visão direta pela técnica de Hasson, seguido de confecção do pneumoperitônio, estabelecido com insuflação de dióxido de carbono (CO₂) a uma pressão 12 mmHg. Uma vez obtida a distensão abdominal adequada, outros dois trocartes foram introduzidos por punção, sempre guiados por visão endoscópica. O peritônio sobre a margem lateral do rim foi incisado, sendo o órgão completamente exposto, seguido de dissecação do hilo e isolamento dos vasos renais (Figuras 5 e 6).

Figura 5. Fotos dos tempos da abordagem renal laparoscópica. A- Inventário da cavidade abdominal. B- Incisão do peritônio. C- Exposição do rim esquerdo. D- Dissecção e exposição do hilo renal esquerdo.

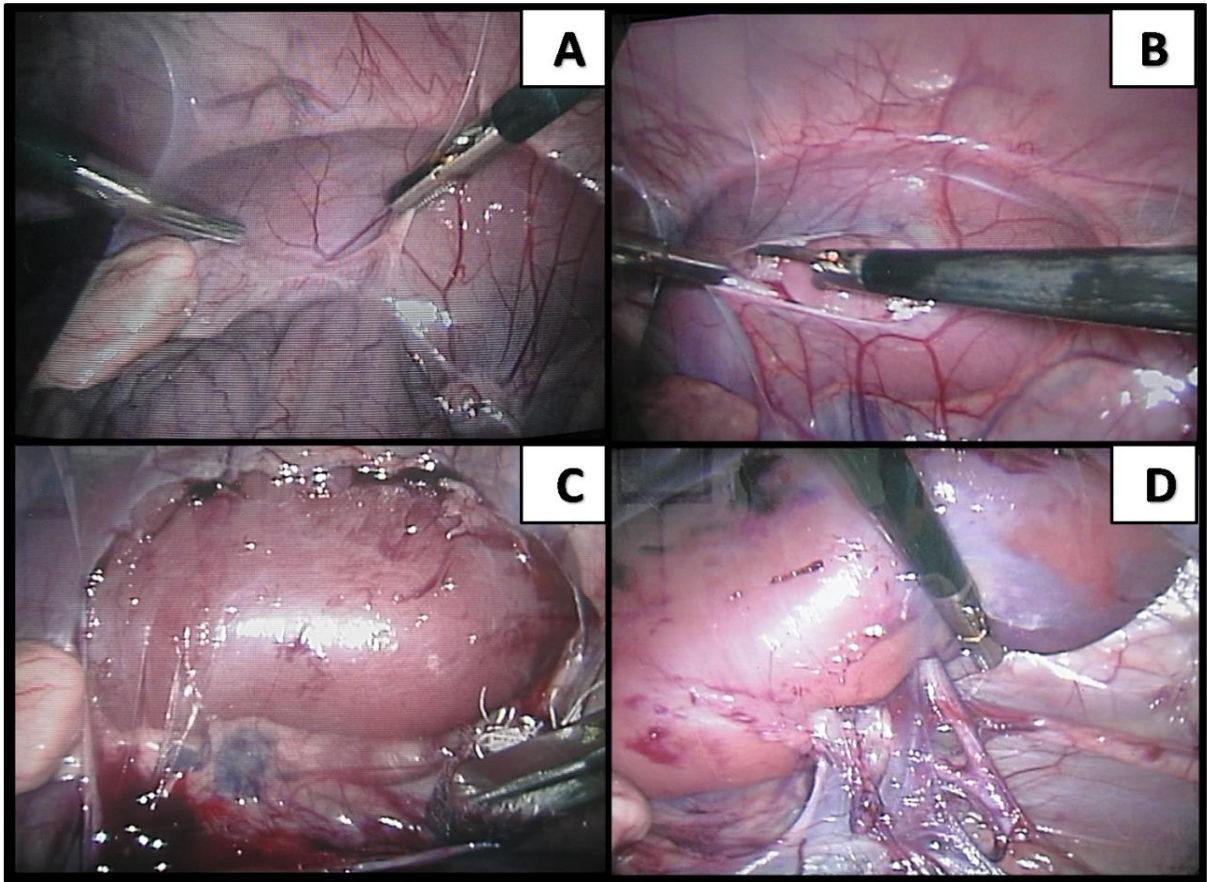
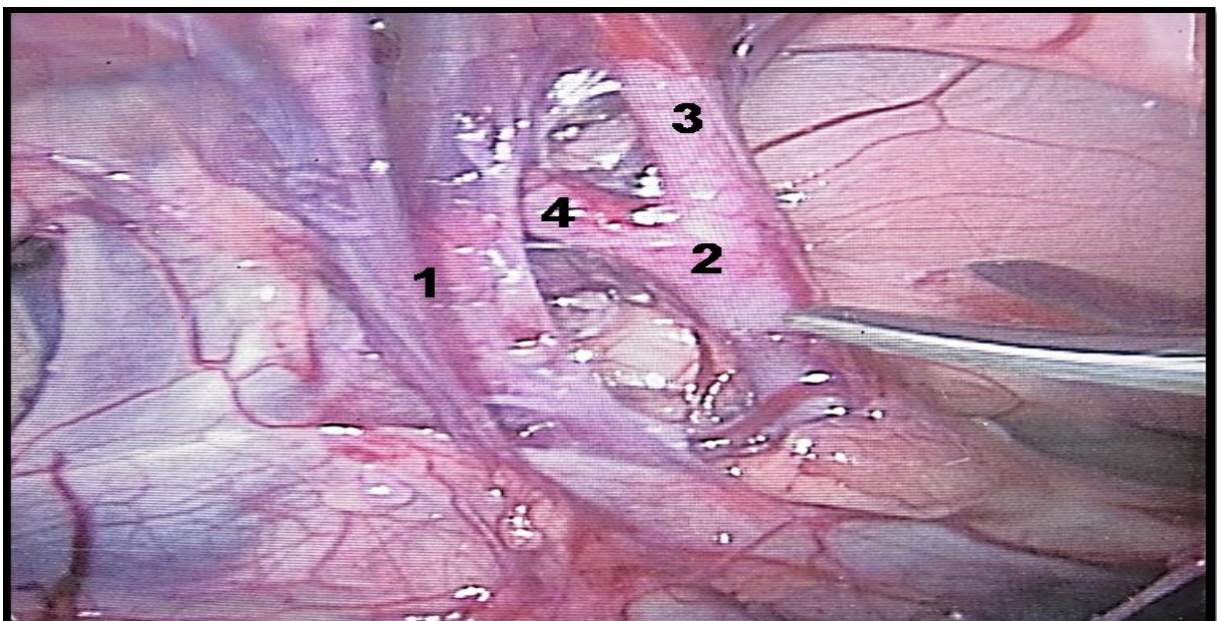


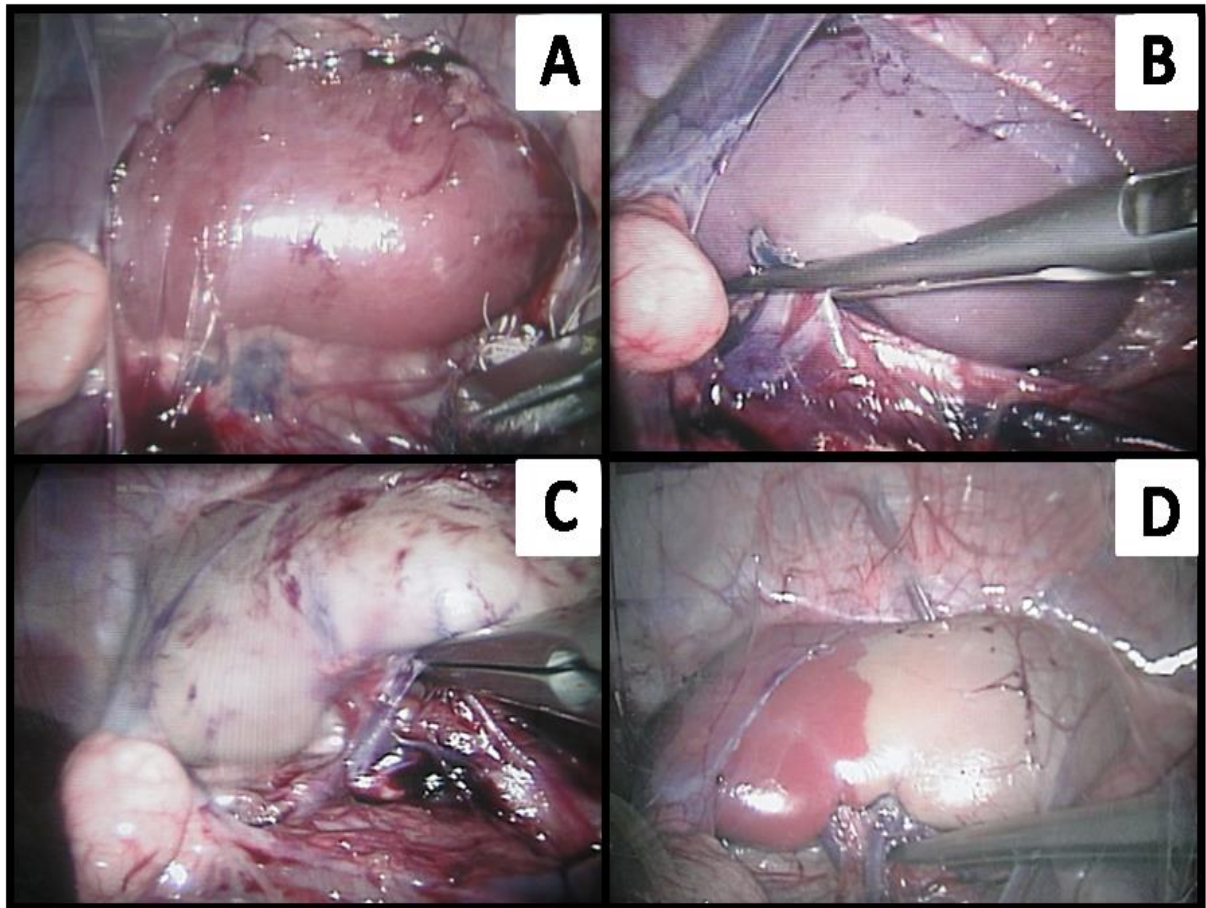
Figura 6. Foto da anatomia do hilo renal esquerdo (modelo suíno). 1-Veia renal. 2- Artéria renal. 3- Ramo caudal da artéria renal. 4- Ramo cranial da artéria renal.



2.3.4 Clampeamento vascular

Uma pinça vascular laparoscópica foi então posicionada conforme a técnica cirúrgica preestabelecida. O tempo de isquemia quente foi de 30 minutos em todos os animais dos grupos AV, A e S. No grupo controle (SHAM), ambos os rins foram submetidos exclusivamente ao pneumoperitônio após dissecação do hilo renal esquerdo. Após esse período, o clampeamento vascular era desfeito e o procedimento cirúrgico interrompido. Os portais eram então retirados e a aponeurose e pele suturadas de maneira rotineira. (Figura 7).

Figura 7. Fotos das diferentes técnicas de clampeamento vascular renal. A- Rim esquerdo pré-clampeamento. B- Clampeamento arteriovenoso. C- Clampeamento arterial. D- Clampeamento arterial seletivo.



2.3.5 Analgesia pós-operatória

Após a extubação, os animais foram recolocados na baia e após a recuperação anestésica, alimento e água foram oferecidos.

Os animais receberam analgesia com tramadol 2mg/kg via subcutânea a cada 12 h por 48 horas após a cirurgia.

2.4 Eutanásia e coleta de amostras

Após 21 dias da intervenção cirúrgica, todos os animais foram submetidos à eutanásia com sobredose de anestésico Tiopental Sódico (Cristália, São Paulo, Brasil) seguido de cloreto de potássio 4 g administrado pela via intravenosa. Uma vez, retiradas às vísceras da cavidade abdominal, ambos os rins foram seccionados longitudinalmente e fixados por imersão em solução de formol a 4% em tampão fosfato-salino.

2.5 Avaliações biométricas

2.5.1 Peso do rim e Teste de Scherle

Após a dissecação dos rins, cada um destes foi pesado e seus volumes determinados pelo teste de Scherle. O teste de Scherle é um método utilizado para determinar o volume de corpos com superfície irregular baseado no princípio de Arquimedes, isto é, um corpo total ou parcialmente imerso em um fluido sofre um empuxo que é igual ao peso do volume do fluido deslocado pelo corpo. Como o líquido utilizado foi a água, cuja densidade é igual a 1 g/cm³, consideramos 1 g = 1cm³ (42).

2.5.2 Relação córtico-medular

Após a retirada dos fragmentos, os rins foram inicialmente seccionados longitudinalmente a partir do hilo renal, resultando em uma face anterior e outra posterior. Foram realizadas secções transversais em cada uma das faces com um diâmetro de 14 mm, que corresponde à largura da lâmina utilizada no procedimento (Figura 8). Cada uma das secções transversais foi então fotografada digitalmente com câmera Zeiss AxioCam ERc5s em microscópio óptico Carl Zeiss microscopy GmbH (Carl Zeiss, Gttingen, Alemanha) para determinação da relação córtico-medular (43).

Tal parâmetro foi avaliado com auxílio do software Image J através da função “cell counter”. Foi usada uma grade de 100 pontos sobreposta às fotografias de secções transversas dos rins (Figura 9).

A relação córtico-medular foi então estimada usando-se o princípio de Cavalieri e o volume cortical absoluto foi calculado multiplicando-se a relação córtico-medular pelo volume renal estimado pelo teste de Scherle (10, 42, 44).

No grupo S, a porção inferior do rim esquerdo (CA) e a sua porção superior correspondente (CR) não apresentavam volumes conhecidos, e por esse motivo, não tiveram a relação córtico-medular analisada.

Figura 8. Fotografia da secção renal (princípio de Cavalieri). A- secção longitudinal (corte ao longo do maior eixo da peça). B- secção transversal (14 mm de largura).

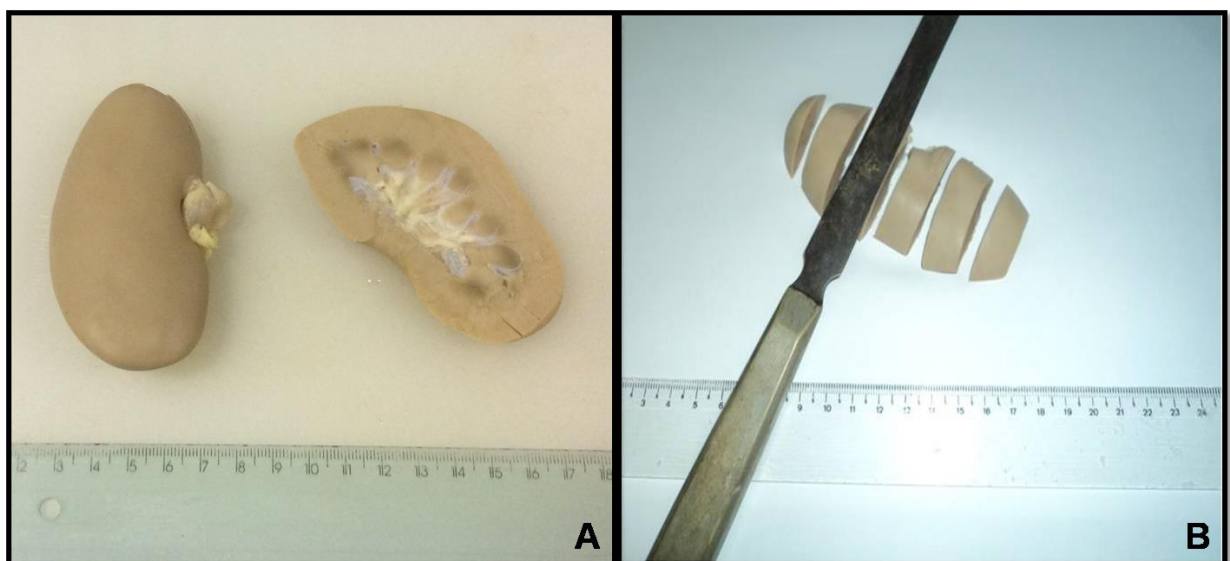
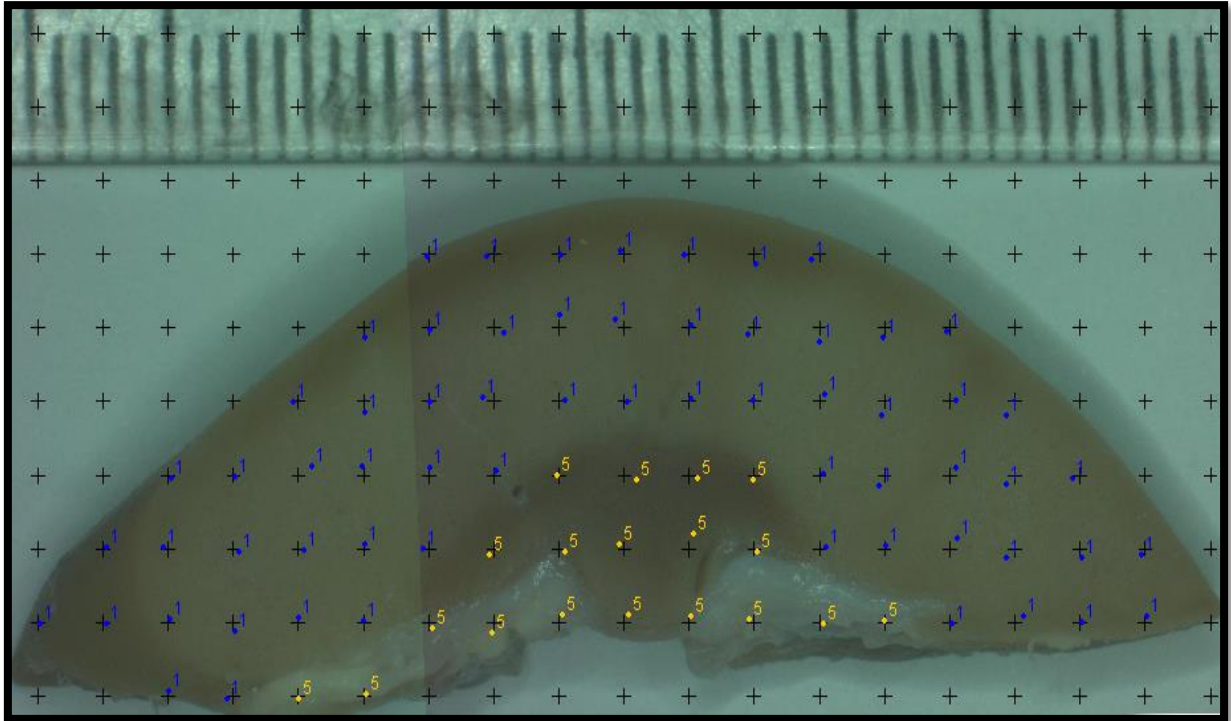


Figura 9. Fotografia de corte transversal do rim. As cruzeiros são os 100 pontos da grade sobreposta à imagem para quantificação da relação córtico-medular. Os números 1 (azul) representam a cortical e os números 5 (amarelo) a medular renal.



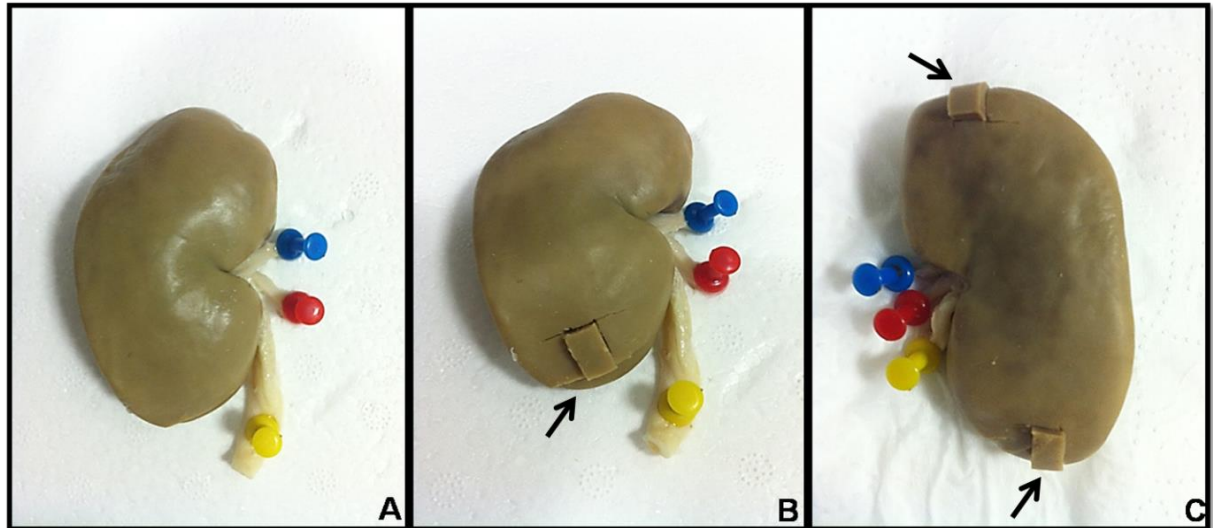
2.6 Avaliação da função renal

Os níveis séricos de creatinina e ureia foram determinados pelo teste cinético (Bioclin100, Rio de Janeiro, RJ) em amostras coletadas antes da cirurgia, 10 dias após a cirurgia e imediatamente antes da eutanásia (21 dias) para avaliar a função renal. O valor registrado resultou da média de duas dosagens consecutivas.

2.7 Análises estruturais

Foi retirado um fragmento cortical do polo inferior do rim direito e um fragmento do polo inferior do rim esquerdo nos grupos SHAM, AV e A. No grupo S foram removidos dois fragmentos do rim esquerdo, sendo um do polo inferior (correspondendo à região do rim que foi submetido à isquemia) e um do polo superior (Figura 10).

Figura 10. Foto dos locais de retirada dos fragmentos para estudo. Azul- Veia renal. Vermelho- Artéria renal. Amarelo- Ureter. A- Rim direito. B- Fragmento do polo inferior do rim direito (seta). C- Fragmento do polo inferior e superior do rim esquerdo (seta).



Os fragmentos foram fixados em formol, desidratados em banhos de concentrações crescentes de álcool etílico e clarificados em xilol e, posteriormente, incluídos em parafina e secções de $5\mu\text{m}$ obtidas em micrótomo.

Tais cortes foram corados com hematoxilina e eosina, e fotografados digitalmente com câmara Olympus DP70 (Olympus, Tóquio, Japão) em microscópio óptico Olympus BX51 para a verificação da densidade volumétrica glomerular (V_v) e do volume glomerular médio (VGM).

2.8 Densidade volumétrica do glomérulo

Para o cálculo da densidade do volume glomerular (V_v) foram analisados 25 campos histológicos obtidos de cinco diferentes secções do córtex renal, com auxílio do software Image J (NIH, Bethesda, Maryland, EUA), sendo esta estimada pelo método de contagem de pontos, onde foi sobreposta à imagem a ser analisada uma grade de área quadrangular, delimitada por linhas e que contém 21 pares de pontos (grade M42) unidos por uma linha de comprimento conhecido (43, 45).

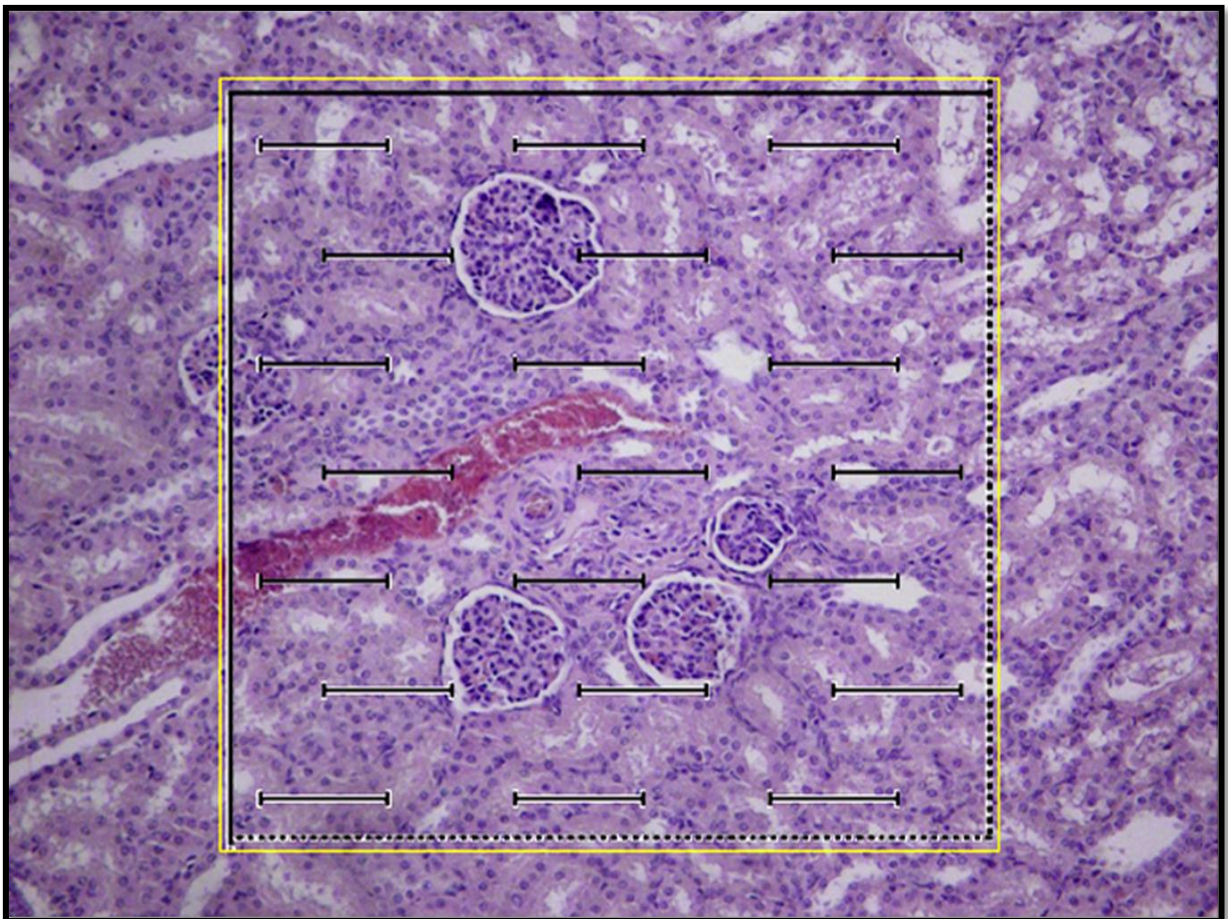
Os glomérulos que foram atravessados pela linha inferior e lateral direita foram desconsiderados e eliminados da análise. Os demais glomérulos dentro da área quadrangular

entraram na avaliação e os pontos que se sobrepuseram a eles foram contabilizados (Figura 11).

O V_v é dado por P_p/P_t , onde P_p é o número de pontos que se sobrepõem aos glomérulos e P_t o número total de pontos da grade, sendo expresso em porcentagem, que indica o percentual do córtex de cada rim ocupado pelos glomérulos.

Para a captura das imagens foi utilizado o microscópio óptico Olympus BX51, fotografadas em aumento de 200x.

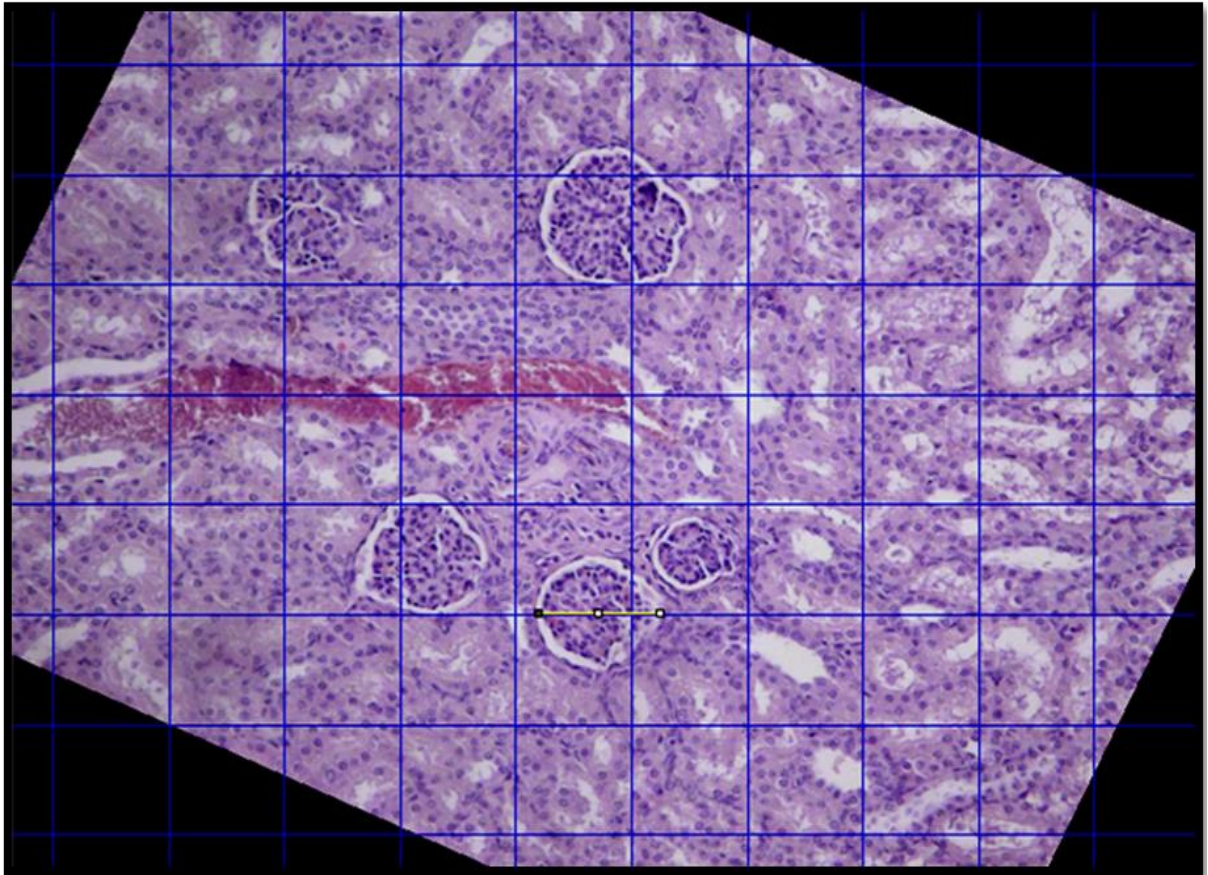
Figura 11. Fotomicrografia de corte transversal dos glomérulos renais. As extremidades das 21 linhas são os 42 pontos da grade sobreposta à imagem para quantificação da densidade volumétrica do glomérulo V_v [glom]. He 200x.



2.9 Volume glomerular médio

Novamente com auxílio do software Image J, o volume glomerular médio (VGM) foi estimado com o uso de uma régua logarítmica de 32 mm de comprimento, composta de uma série de 15 classes (Figura 12), analisando aleatoriamente, pelo menos 50 glomérulos por rim, utilizando a função “straight line” previamente calibrada (46). As imagens foram fotografadas em aumento de 200x.

Figura 12. Fotomicrografia de corte transversal dos glomérulos renais. A linha reta amarela mostra o traçado para a mensuração do volume médio do glomérulo (VGM). HE 200x.



2.10 Densidade Glomerular

A densidade glomerular (D_v), expressa como o número de glomérulos por milímetro cúbico do córtex renal, foi calculada dividindo-se o V_v [glom] pelo VGM (46).

2.11 Número de Glomérulos

O número de glomérulos (N_v), expressa como o número de glomérulos por rim, foi calculado utilizando-se a fórmula abaixo: (46).

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

$N[\text{Glom}]$ – Número de glomérulos

$V_v[\text{Glom}]$ – Densidade volumétrica do glomérulo

RCM – Relação córtico-medular

VR – Volume renal

VGM – Volume glomerular médio

No grupo S, a porção inferior do rim esquerdo (CA) e a sua porção superior correspondente (CR) não apresentavam volumes conhecidos e por esse motivo não tiveram o número de glomérulos analisados.

2.12 Análise estatística

Os dados foram tabulados e para cada parâmetro morfológico, os rins esquerdos de cada grupo em questão foram comparados com os rins direitos, utilizando-se o teste t Student. Além disso, os rins esquerdos dos quatro grupos estudados foram comparados entre si, usando-se one way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Os níveis médios de creatinina e

ureia no soro também foram comparados usando-se one way ANOVA. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todos os resultados foram apresentados como média +/- desvio padrão de cada grupo.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliações biométricas

3.1.1 Peso do rim e Teste de Scherle

A média dos pesos e volumes dos rins direitos em relação aos dos rins esquerdos não apresentaram diferença significativa nos grupos SHAM, AV, A e S (Figuras 13 e 14). Da mesma maneira, quando comparada a média dos pesos e volumes dos rins direitos e esquerdos entre os grupos em estudo, nenhuma diferença foi observada. (Figuras 15 e 16). Os resultados expressos em média +/- desvio padrão de cada grupo estão apresentados na tabela 1.

Figura 13. Média dos pesos dos rins direitos e esquerdos (g) dos animais pertencentes aos grupos: SHAM, AV, A e S. $p < 0,05$.

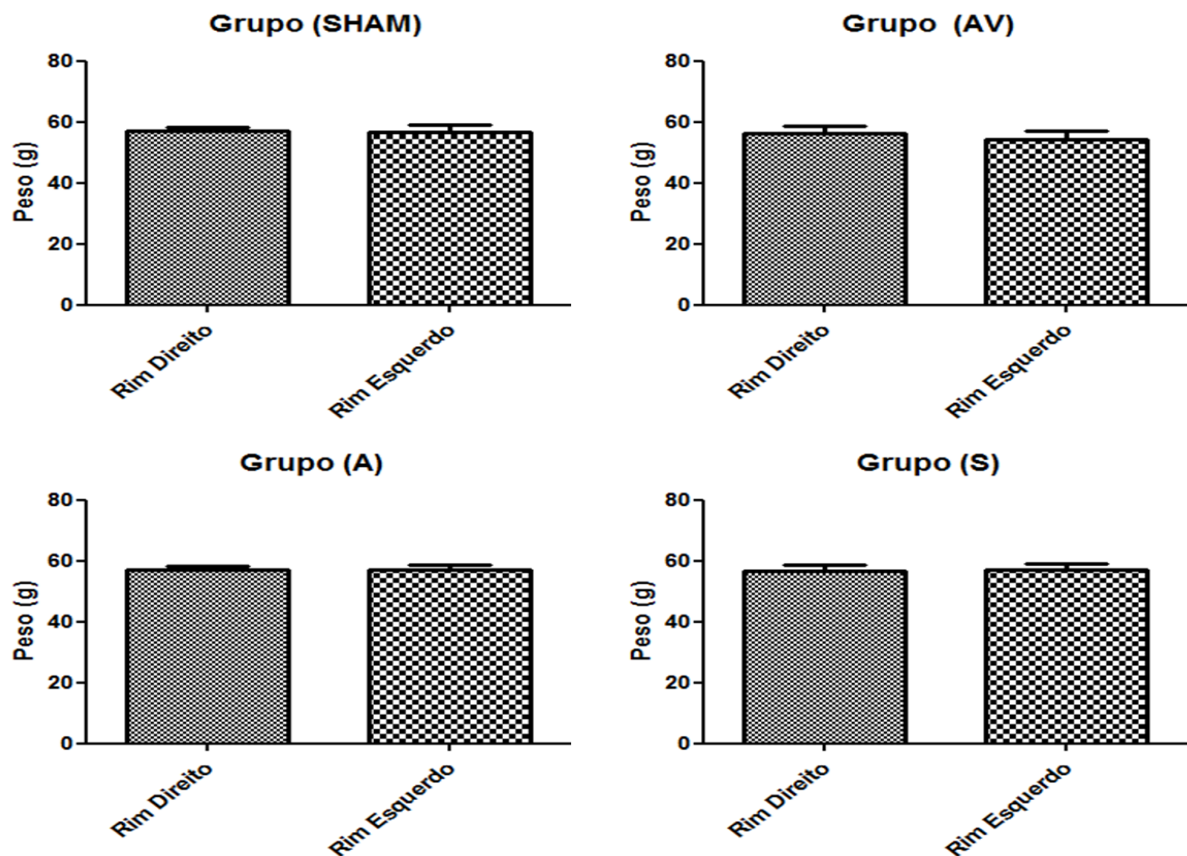


Figura 14. Média dos volumes dos rins direitos e esquerdos (cm³) dos animais pertencentes aos grupos: SHAM, AV, A e S. $p < 0,05$

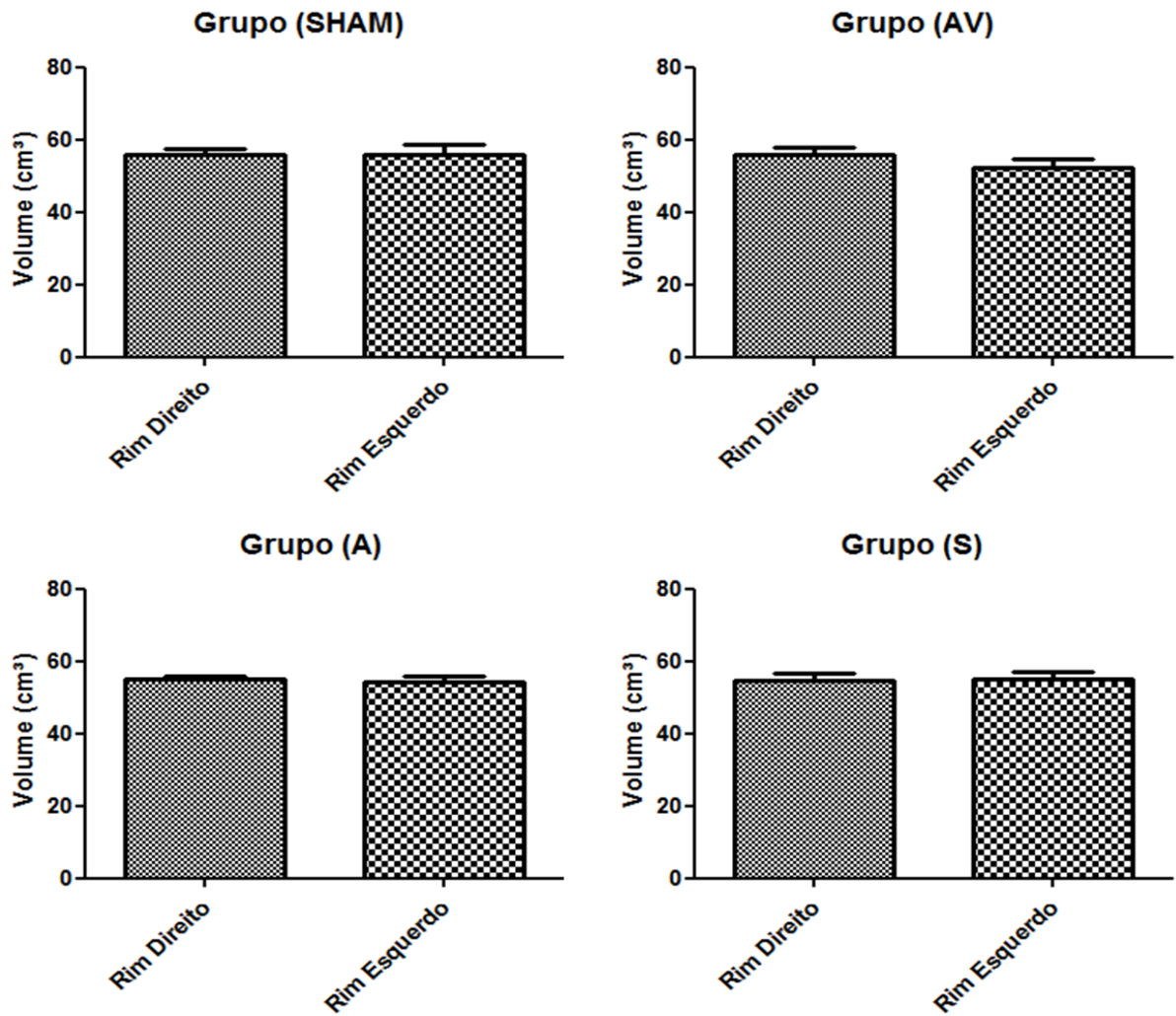


Figura 15. Comparação da média dos pesos (g) dos rins direitos e esquerdos entre os grupos em estudo: SHAM, AV, A e S. $p < 0,05$.

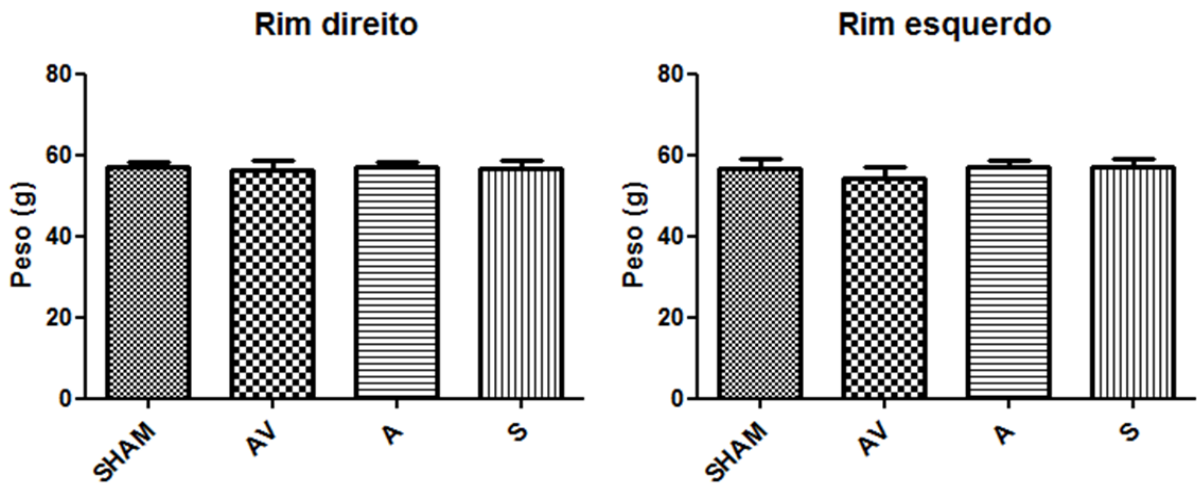


Figura 16. Comparação da média dos volumes (cm³) dos rins direitos e esquerdos entre os grupos em estudo: SHAM, AV, A e S. $p < 0,05$.

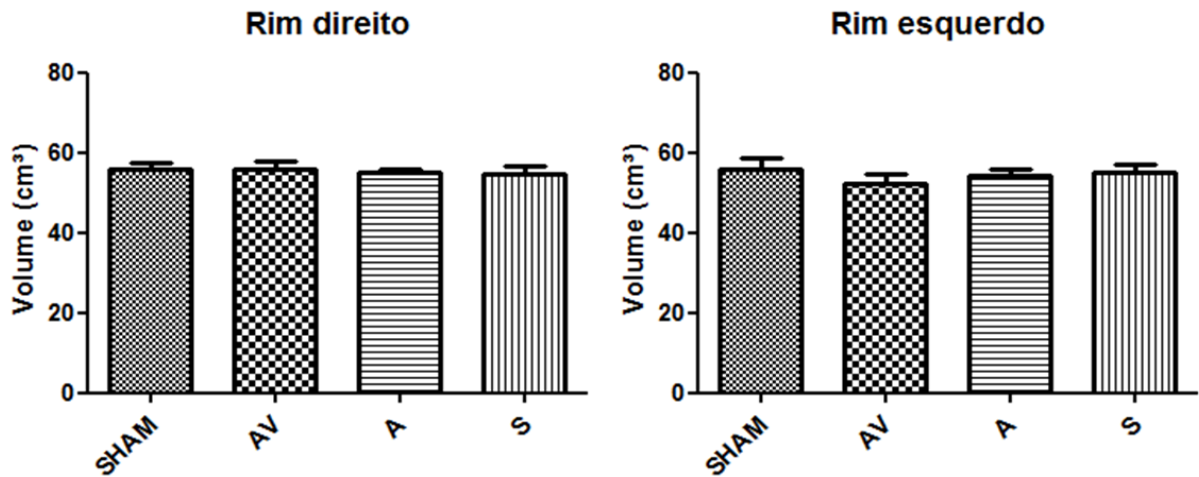


Tabela 1. Peso e volume dos rins dos animais pertencentes aos grupos: SHAM, AV, A e S.

	Grupo SHAM		Grupo AV		Grupo A		Grupo S	
	RD	RE	RD	RE	RD	RE	RD	RE
Peso (g)	56,94 ± 3,406	56,69 ± 6,881	56,38 ± 6,948	54,44 ± 7,627	57,13 ± 3,523	56,94 ± 5,088	56,63 ± 6,340	56,94 ± 5,590
Volume (cm³)	55,88 ± 4,042	55,81 ± 7,625	55,75 ± 5,536	52,19 ± 7,126	54,88 ± 3,144	54,31 ± 4,494	54,63 ± 6,329	54,94 ± 6,344

3.1.2 Relação córtico-medular

A média da relação córtico-medular dos rins direitos em relação a dos rins esquerdos não apresentaram diferença significativa nos grupos SHAM, AV e A. Da mesma maneira, quando comparada a média da relação córtico-medular dos rins direitos e esquerdos entre os grupos em estudo, nenhuma diferença foi observada. Os resultados expressos em média +/- desvio padrão de cada grupo estão apresentados na tabela 2.

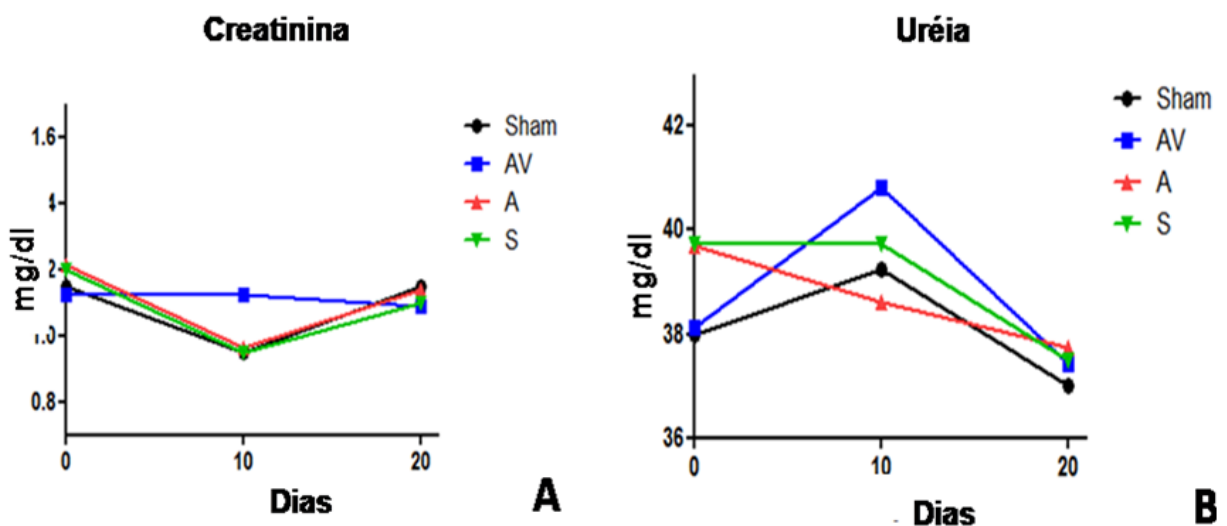
No grupo S, a porção inferior do rim esquerdo (CA) e a sua porção superior correspondente (CR) não apresentavam volumes conhecidos e, por esse motivo, não tiveram a relação córtico-medular analisada.

3.2 Avaliação da função renal

O nível sérico de creatinina e ureia nas amostras pré-operatórias foram 1,15 mg/dL e 38,0 mg/dL para o grupo Sham; 1,12 mg/dL e 38,12 mg/dL para o grupo AV; 1,21 mg/dL e 39,7 mg/dL para o grupo A; e 1,20 mg/dL e 39,7 mg/dL para o grupo S. No 10º pós-operatório a dosagem da creatinina no soro foi de 0,95 mg/dL e da uréia foi de 39,2 mg/dL para o grupo Sham; 1,12 mg/dL e 40,8 mg/dL para o grupo AV; 0,96 mg/dL e 38,6 mg/dL para o grupo A; e 0,95 mg/dL e 39,7 mg/dL para o grupo S. Após 21 dias da cirurgia a creatinina sérica foi de 1,15 mg/dL e ureia foi de 37,0 mg/dL para Sham grupo; 1,08 mg/dL e 37,43 mg/dL para o grupo AV; 1,13 mg/dL e 37,7 mg/dL para o grupo A; e 1,10 mg/dL e 37,5 mg/dL para o grupo S.

Não houve diferença significativa dos níveis séricos de creatinina e ureia nos diferentes momentos de coleta, entre os grupos em estudo. Em nenhum momento os animais apresentaram níveis de ureia ou creatinina acima do valor de referência para a espécie (Figura 17).

Figura 17. Gráfico demonstrativo dos níveis séricos de creatina e ureia nos diferentes momentos do estudo. A - níveis séricos de creatinina. B- níveis séricos de ureia.



3.3 Densidade volumétrica glomerular

A análise da densidade volumétrica glomerular $V_v[\text{glom}]$, não revelou diferença significativa dos rins direitos em relação a dos rins esquerdos nos grupos SHAM, A, S (CR) e S (CA) (Figura 18). Da mesma maneira, quando comparada a ($V_v[\text{glom}]$) dos rins direitos e esquerdos entre os grupos SHAM, A, S (CR) e S (CA) nenhuma diferença foi observada. (Figura 19). Já no grupo AV a $V_v[\text{glom}]$ dos rins esquerdos apresentou uma redução significativa quando comparada ao do rim contralateral. Do mesmo modo, quando comparada a $V_v[\text{glom}]$ dos rins esquerdos do grupo AV com a dos grupos SHAM, A S (CR) e S (CA), uma diminuição importante foi encontrada (Tabela 2).

Figura 18. Média das densidades volumétricas glomerulares dos rins direitos e esquerdos (%) dos animais pertencentes aos grupos: SHAM, AV, A e S. $p < 0,05$.

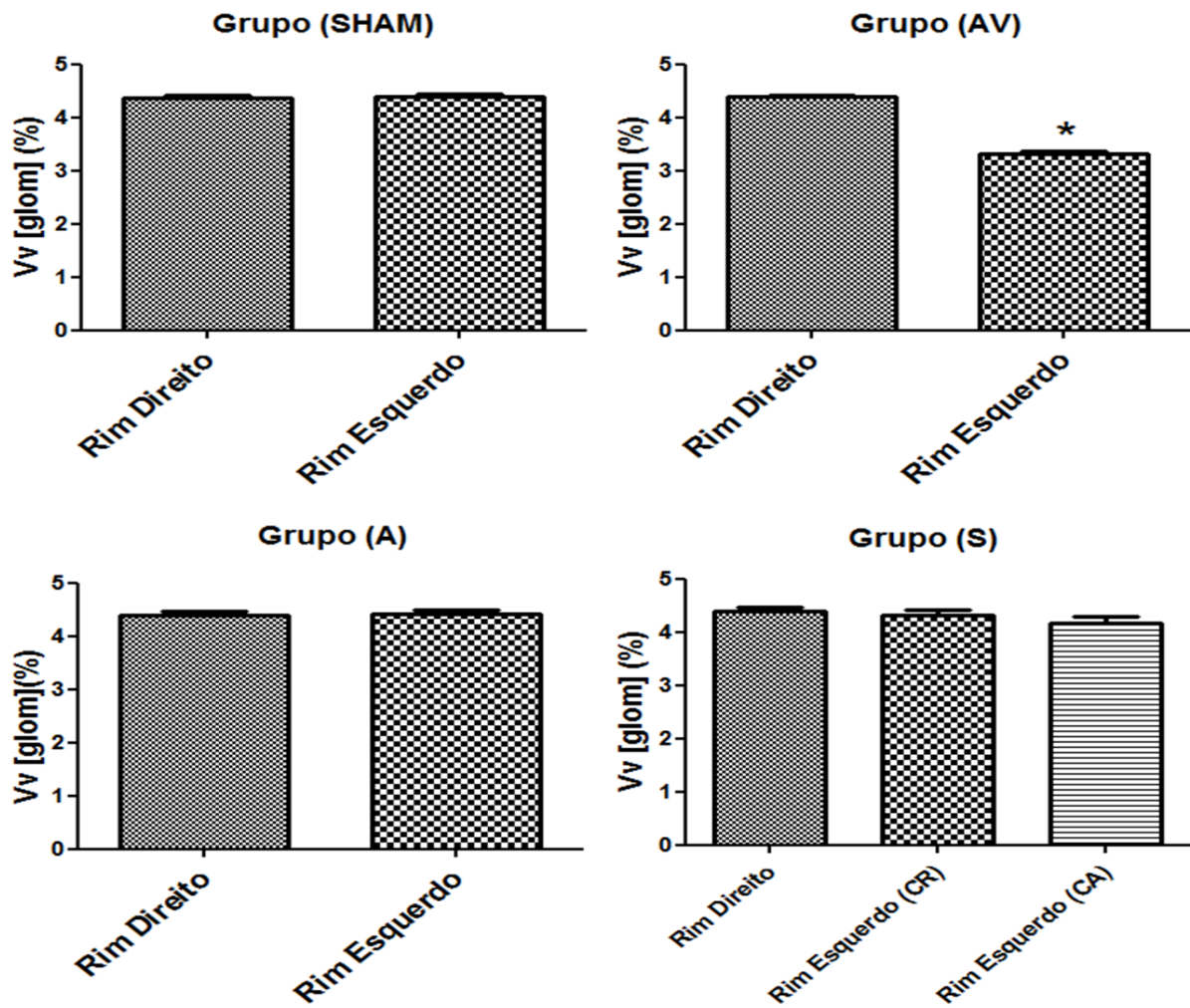
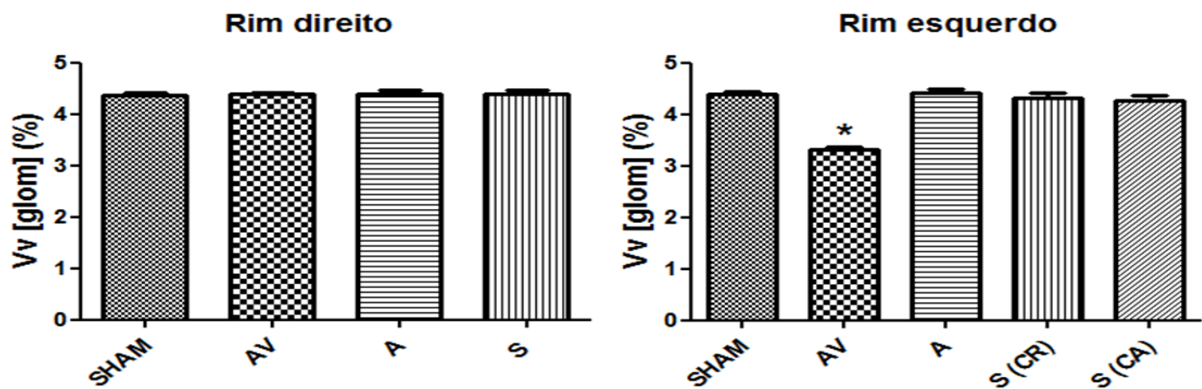


Figura 19. Comparação da média das densidades volumétricas glomerulares (%) dos rins direitos e esquerdos entre os grupos em estudo: SHAM, AV, A e S. $p < 0,05$.



3.4 Volume glomerular médio

A análise do volume glomerular médio VGM (μm^3) não revelou diferença significativa dos rins direitos em relação aos rins esquerdos nos grupos SHAM, A, S (CR) e S (CA) (Figura 20). Da mesma maneira, quando comparado o VGM ($10^3 \mu\text{m}^3$) dos rins direitos e esquerdos entre os grupos SHAM, A S (CR) e S (CA), nenhuma diferença foi observada. (Figura 21). Já no grupo AV, o VGM ($10^3 \mu\text{m}^3$) dos rins esquerdos apresentou uma redução significativa quando comparado ao do rim contralateral. Do mesmo modo, quando comparado o VGM ($10^3 \mu\text{m}^3$) dos rins esquerdos do grupo AV com o dos grupos SHAM, A, S (CR) e S (CA), uma diminuição importante foi encontrada (Tabela 2).

Figura 20. Média do volume glomerular médio dos rins direito e esquerdo (μm^3) dos animais pertencentes aos grupos: SHAM, AV, A e S. $p < 0,05$.

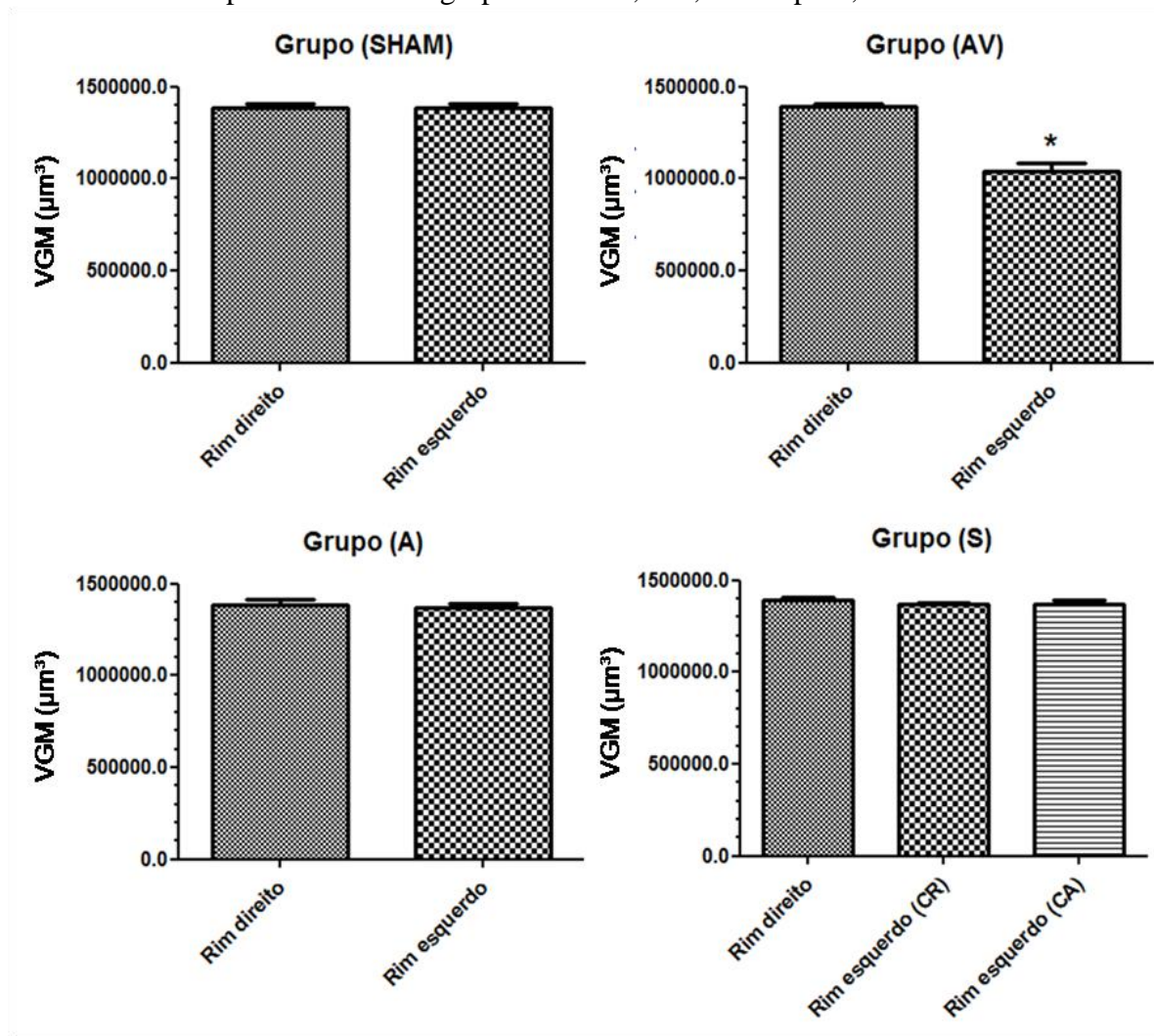
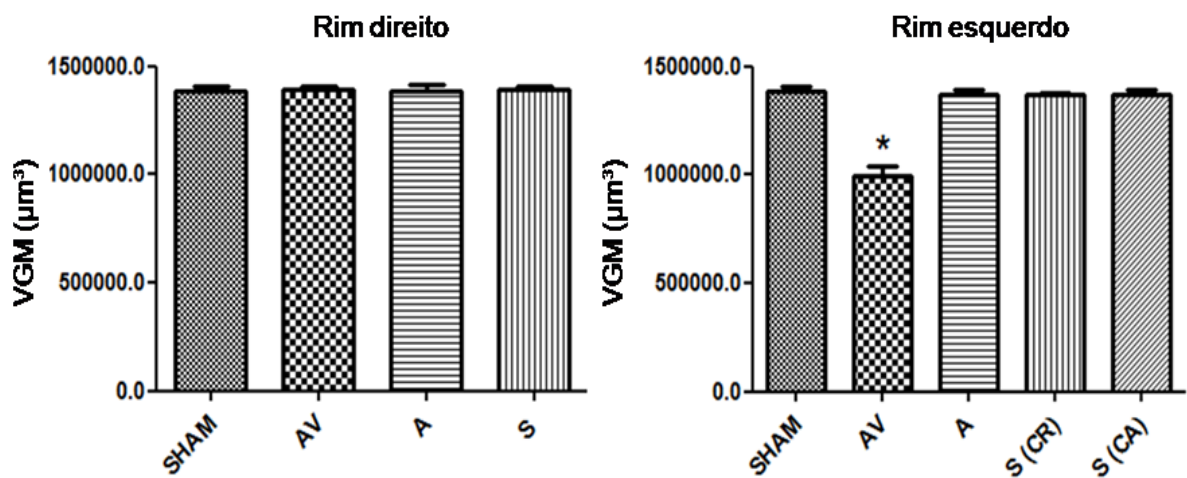


Figura 21. Comparação da média do volume glomerular médio (μm^3) dos rins direito e esquerdo entre os grupos em estudo: SHAM, AV, A e S. $p < 0,05$.



3.5 Número de Glomérulos

A análise do número de glomérulos $Nv(\text{glom}/\text{rim})$ não revelou diferença significativa dos rins direitos em relação aos rins esquerdos nos grupos SHAM e A (Figura 22). Da mesma maneira, quando comparado o $Nv(\text{glom}/\text{rim})$ dos rins direitos e esquerdos entre os grupos SHAM e A, nenhuma diferença foi observada (Figura 23). Já no grupo AV, o $Nv(\text{glom}/\text{rim})$ dos rins esquerdos apresentou uma redução significativa quando comparado ao do rim contralateral. Do mesmo modo, quando comparado o $Nv(\text{glom}/\text{rim})$ dos rins esquerdos do grupo AV com ao dos grupos SHAM e A, uma diminuição importante foi encontrada (Tabela 2).

Figura 22. Média do número de glomérulos dos rins direito e esquerdo (glom/rim) dos animais pertencentes aos grupos: SHAM, AV e A. $p < 0,05$.

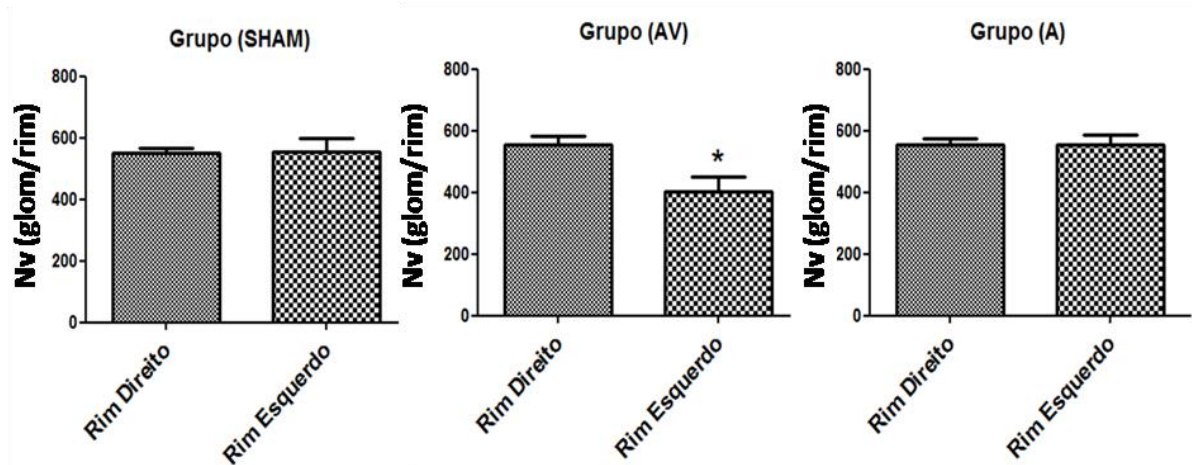


Figura 23. Comparação da média do número de glomérulos (glom/rim) dos rins direito e esquerdo entre os grupos em estudo: SHAM, AV e A. $p < 0,05$.

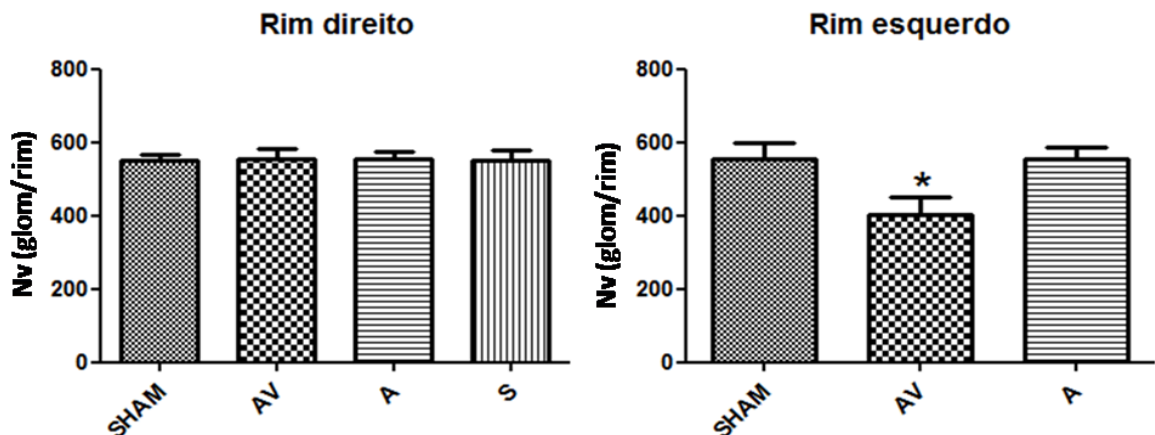


Tabela 2. Dados estereológicos de rins de animais pertencentes aos grupos: SHAM, AV, A e S.

	Grupo SHAM		Grupo AV		Grupo A		Grupo S		
	RD	RE	RD	RE	RD	RE	RD	RE CR	RE CA
Vv[glom] (%)	4,37 ±0,15	4,38 ±0,18	4,38 ±0,13	3,31 ±0,17	4,40 ±0,15	4,415 ±0,2	4,40 ±0,2	4,32 ±0,2	4,27 ±0,2
VGM (10 ⁵ um ³)	13,8 ±0,53	13,8 ±0,79	13,9 ±0,52	9,9 ±0,13	13,85 ±0,95	13,6 ±0,64	13,9 ±0,37	13,7 ±0,21	13,6 ±0,76
Dv (glom/mm ³)	31,57 ± 1,8	31,81 ± 2,3	31,54 ±1,8	32,40 ±1,7	31,92 ± 2,4	32,35 ± 1,8	31,94 ± 1,8	31,60 ± 1,7	30,55 ± 3,8
Nv (glom/rim)	55,07 ±4,6	55,47 ±1,3	55,54 ±8,1	40,23 ±1,3	55,49 ±6,1	55,41 ±9,4	55,49 ±8,7		
RCM (%)	71,58 ± 2,4	70,44 ± 4,1	71,81 ± 2,4	70,16 ±2,3	71,97 ± 3,1	70,93 ± 3,4	71,97 ± 3,1		

Dados apresentados como média ± desvio padrão

Vv(glom)= densidade volumétrica glomerular; VGM= volume glomerular médio; Dv= densidade glomerular; Nv= número de glomérulos/rim; RCM= Relação córtico-medular

Diferenças significativas= p< 0,05 (dados em negrito)

Figura 24. Fotomicrografia de corte transversal dos glomérulos renais (modelo suíno). He 200x. A- Rim direito grupo SHAM. B- Rim esquerdo grupo SHAM. C- Rim esquerdo grupo AV. D- Rim esquerdo grupo A. E- Polo cranial do rim esquerdo do grupo S. F- Polo caudal do rim esquerdo do grupo S. (➤) Glomérulo renal.

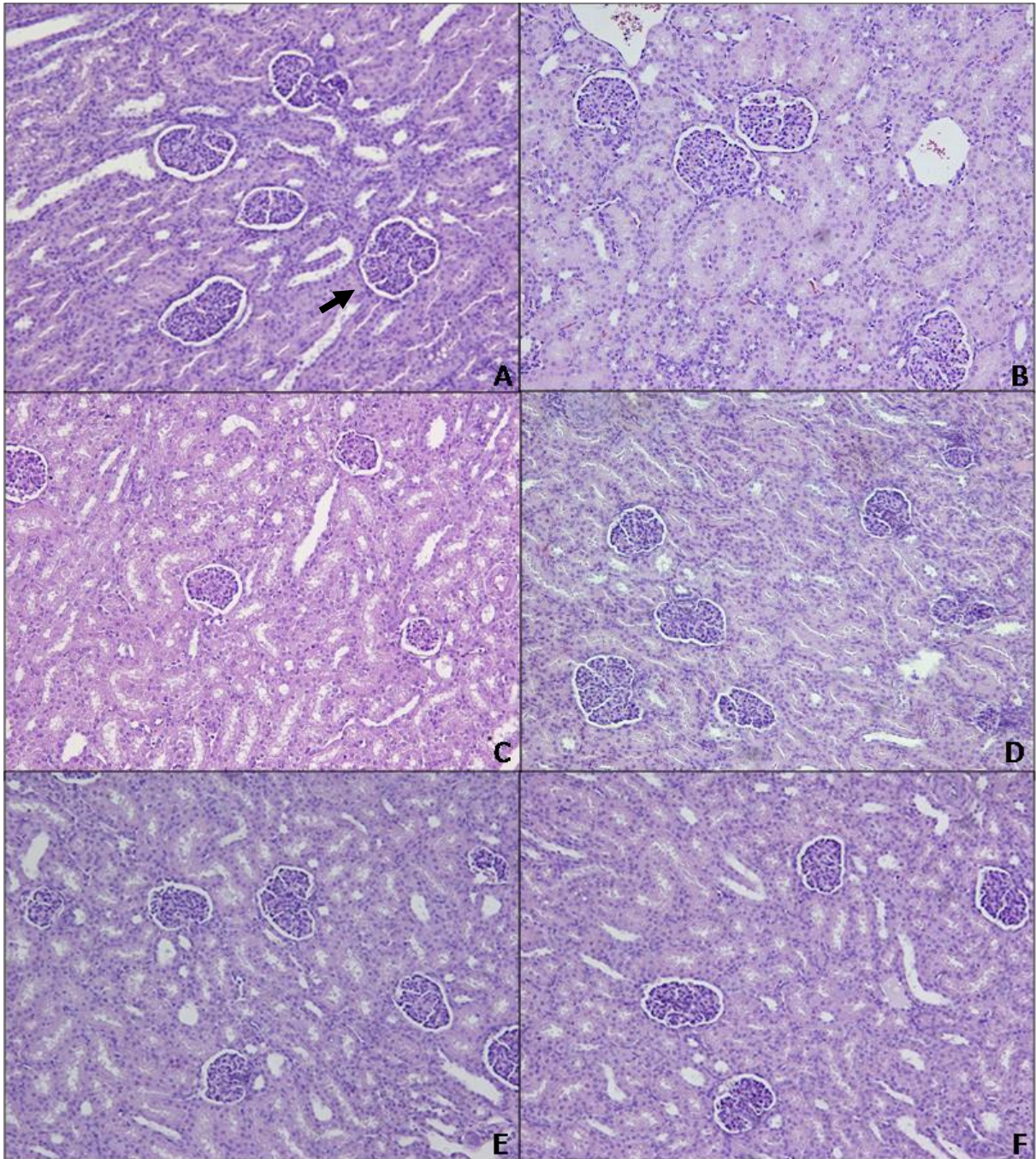


Tabela 3. Dados biométricos e estereológicos de rins de animais pertencentes aos grupos: SHAM, AV, A e S.

	Nº	Peso (g)		Volume (mm ³)		RCM (%)		Vv[glom] (%)		VGM (10 ⁵ um ³)		Dv (glom/mm ³)		Nv (glom/rim)	
		RD	RE	RD	RE	RD	RE	RD	RE	RD	RE	RD	RE	RD	RE
SHAM	1	51,5	48,5	51	46	68,91	65,68	4,476	4,285	13,5	12,9	33,05	33,09	52,06	42,85
	2	55,5	55	55	53	70,52	73,67	4,380	4,285	13,6	13,1	32,11	32,60	54,58	54,55
	3	58,5	56	57	54	72,58	70,15	4,285	4,380	13,6	13,5	31,42	32,35	55,71	53,69
	4	54	46	50	45	71,39	65,97	4,476	4,095	13,4	14,3	33,30	28,57	53,21	34,74
	5	60,5	63	60,5	63	70,38	68,05	4,285	4,285	15,1	14,2	28,34	30,11	51,72	55,32
	6	60,5	61	58	61	71,23	74,28	4,095	4,476	13,9	15,3	29,38	29,21	49,71	59,26
	7	55	66	54,5	65,5	76,77	77,02	4,571	4,571	13,8	13,8	33,03	33,03	63,19	76,19
	8	60	58	61	59	70,87	68,69	4,380	4,666	13,7	13,1	31,88	35,50	60,40	67,3
	Média	56,94	56,69	55,88	55,81	71,58	70,44	4,369	4,381	13,8	13,8	31,56	31,81	55,07	55,47
Arterio-venoso	9	52	50	52	48	69,50	67,92	4,380	3,333	13,7	10,8	31,88	30,65	50,49	33,32
	10	53	54,5	54	49,5	72,23	71,00	4,476	3,142	14,4	11,0	31,01	28,39	54,16	31,36
	11	64,5	62	62,5	60	72,27	66,71	4,476	3,523	13,6	11,5	32,81	30,47	66,35	42,98
	12	55,5	55,5	54,5	52,5	74,71	72,82	4,380	3,047	13,5	8,9	32,35	33,88	57,72	39,48
	13	48,5	50	52,5	49	71,25	70,47	4,571	3,238	14,6	11,0	31,25	29,25	53,44	32,71
	14	69	68	66	65	75,69	73,30	4,190	3,523	13,0	8,4	32,11	41,94	67,24	70,42
	15	56,5	52	54,5	51	69,05	70,04	4,380	3,428	13,8	9,2	31,66	36,90	52,19	45,20
	16	52	43,5	50	42,5	69,78	69,04	4,190	3,238	14,3	11,6	29,23	27,76	42,747	26,38
	Média	56,38	54,44	55,75	52,19	71,81	70,16	4,381	3,310	13,9	9,9	31,54	32,40	55,54	40,23
Arterial	17	59	58	57	56	69,05	70,04	4,563	4,662	12,9	13,7	35,24	33,93	63,30	62,07
	18	64,5	62,5	60,5	58,5	69,78	69,04	4,662	4,662	14,8	13,5	31,45	34,43	61,90	64,84
	19	53,5	61,5	50,5	58,5	72,90	72,32	4,365	4,464	14,5	14,7	30,04	30,31	48,28	57,25
	20	57,5	55,5	55,5	53,5	69,23	76,23	4,365	4,464	13,0	13,8	33,45	32,26	56,11	58,74
	21	54	47,5	53	44,5	76,24	71,05	4,265	4,067	15,3	13,9	27,84	29,18	47,99	37,54

	Nº	Peso (g)		Volume (mm³)		RCM (%)		Vv[glom] (%)			VGM (10 ⁵ um³)			Dv (glom/mm³)			Nv (glom/rim)	
Arterial	22	57,5	61,5	55,5	58,5	76,77	74,75	4,265	4,365		12,9	13,2		32,94	32,95		59,88	62,90
	23	55	53	52	50	71,39	65,97	4,464	4,166		13,1	12,4		33,96	33,45		56,28	45,98
	24	56	56	55	55	70,38	68,05	4,265	4,464		14,0	13,8		30,39	32,26		50,20	53,90
	Média	57,13	56,94	54,88	54,31	71,97	70,93	4,402	4,415		13,6	13,9		31,91	32,35		55,49	55,41
Seletivo	25	53	56	51	54	69,05		4,464	4,365	4,166	135	13,7	13,9	32,96	32,01	32,93	52,08	
	26	66,5	66	63,5	64	69,78		4,563	4,464	4,662	140	13,6	12,6	32,51	31,58	33,22	62,97	
	27	54	52,5	52	50,5	72,90		4,464	4,365	4,265	137	14,1	14,0	32,49	32,48	31,74	52,19	
	28	60	60	58	58	69,23		4,662	4,662	4,563	135	13,4	13,4	34,43	34,43	32,74	64,46	
	29	56	58	54	58	76,24		4,067	4,067	4,067	145	13,5	13,9	27,99	30,04	30,94	54,02	
	30	45	47,5	43	43,5	76,77		4,365	4,265	4,166	142	13,5	13,1	29,27	31,05	27,55	44,23	
	31	60,5	60,5	60,5	59,5	71,39		4,464	3,968	4,067	135	13,7	15,1	32,23	28,68	31,17	48,34	
	32	58	55	55	52	70,38		4,464	4,464	4,265	1,41	13,8	13,0	31,58	32,59	31,31	53,25	
	Média	56,63	56,94	54,63	54,94	71,97		4,402	4,32^{CR}	4,27^{CA}	1,39	13,7^{CR}	13,6^{CA}	31,68	31,60^{CR}	31,45^{CA}	55,49	

4 DISCUSSÃO

Animais de médio porte, como porcos, são utilizados frequentemente em vários modelos experimentais de videolaparoscopia, incluindo estudos de NRL e NPL, bem como técnicas de hemostasia, devido não só à semelhança da sua anatomia com a do ser humano, mas também à facilidade técnica decorrente do seu tamanho e à possibilidade de aproveitar-se o instrumental laparoscópico convencional, motivo pelo qual optamos pela utilização do suíno em nosso estudo (47, 48).

Usando moldes do sistema arterial do rim suíno, Pereira-Sampaio M et al. (2004) observou diferenças entre a ramificação da artéria renal do porco e o padrão descrito para a artéria renal humana. Verificou-se a existência de uma única artéria por rim, e que a mesma dividiu-se em ramo cranial e caudal em 93,4% dos casos, o que possibilitou o clampeamento seletivo do segmento caudal da artéria renal em nosso experimento (10).

Atualmente, sabe-se que cada minuto adicional de isquemia é deletério ao órgão, e que o tempo total não deve ultrapassar 30 minutos (28). Tracy CR et al. (2010) utilizou-se a projeção digital de luz de imagens hiperespectral para construir um "mapa" de oxigenação tecidual "em tempo real" para determinar se há diferenças na oxigenação do tecido renal durante a oclusão vascular arterial versus arteriovenosa. No modelo suíno, a oxiemoglobina diferiu significativamente entre a oclusão A e AV por até 35 minutos após o início da isquemia, indicando uma possível "janela isquêmica" na qual a oclusão A pode proporcionar benefício sobre a oclusão AV (49). Como tal, a prática clínica atual é a de limitar o tempo de isquemia inferior a 30 min.

Inicialmente, foram descritas três técnicas para a realização de cirurgia poupadora de néfrons: ressecção do tumor sem isquemia, nefrectomia parcial com isquemia quente ou isquemia regional através da compressão do parênquima renal (49). Em nosso estudo, o rim esquerdo foi abordado por via laparoscópica transperitoneal com clampeamento do pedículo vascular conforme técnica definida previamente (arteriovenoso, arterial ou arterial seletivo). O rim direito não foi manipulado ao longo do experimento e foi utilizado como controle.

A repercussão das técnicas de isquemia permanece incerta na literatura. O presente estudo avaliou como as diferentes técnicas de clampeamento vascular podem alterar os parâmetros morfométricos e funcionais do rim.

Estudos realizados em animais demonstraram um efeito deletério superior da isquemia renal naqueles submetidos ao clampeamento AV, em oposição à oclusão exclusiva da artéria.

O clampeamento arterial isolado permite a perfusão retrógrada do sangue através da veia renal, levando a uma diminuição da congestão venosa (26, 50).

Orvieto e colaboradores compararam a influência da isquemia arterial à arteriovenosa durante a nefrectomia parcial aberta e laparoscópica utilizando o suíno como modelo animal. A abordagem aberta foi associada a uma menor alteração dos níveis séricos de creatinina no 1 e 3 dias de pós-operatório no grupo A, quando comparada ao grupo AV. Este benefício, no entanto, não foi observado no grupo laparoscópico. Os autores postularam que durante a NPL, o pneumoperitônio pode ter prejudicado o refluxo venoso, eliminando os benefícios do clampeamento arterial isolado (26).

Recentemente, De Souza DB et al. (2012) demonstrou, utilizando o suíno como modelo animal, que a densidade glomerular diminuiu no parênquima após a NPL com isquemia quente (51). Até o presente momento o número de glomérulos renais não havia sido quantificado.

Embora estudos experimentais anteriores tenham demonstrado alteração da morfologia renal, caracterizada pela redução da densidade glomerular após isquemia quente arteriovenosa (51), o presente estudo comparou no modelo suíno os dados obtidos após clampeamento em bloco com aqueles alcançados após oclusão arterial ou seletiva (ramo caudal da artéria renal esquerda).

Bagetti-Filho HJ et al. (2012) utilizando o rato como modelo animal, concluiu que o clampeamento AV provoca uma diminuição significativa da densidade glomerular, enquanto a oclusão arterial isolada reduz, mas não de forma substancial (52). Por sua vez, Umul M et al. (2016) obteve resultados semelhantes aos anteriores utilizando o coelho como modelo experimental (53). Em nosso estudo, o clampeamento arteriovenoso resultou em redução glomerular quando comparado à oclusão arterial isolada, no entanto, não observamos qualquer dano significativo à morfologia ou função renal após oclusão arterial quando comparado ao seu contralateral ou ao grupo SHAM, corroborando com os estudos acima. Os presentes dados sugerem que o dano glomerular seja mínimo quando o período de isquemia quente, por clampeamento arterial, for inferior a 30 minutos.

Nesse contexto, em 2011, Gill IS et al. (2012) descreveu um novo conceito de nefrectomia parcial conhecido como "zero" isquemia, com o objetivo de eliminar completamente a isquemia cirúrgica ao remanescente renal. A dissecação da artéria renal principal é realizada para expor ramos arteriais secundários, terciários ou quaternários, seguido de clampeamento seletivo da irrigação tumoral (38). Em nosso estudo foi realizado

no grupo seletivo o clampeamento do ramo secundário da artéria renal (ramo caudal da artéria renal).

Em uma análise multivariada, os autores demonstraram que a perda funcional pós-NP está relacionada com o número de artérias segmentares ocluídas durante a NP. O clampeamento de uma, duas ou três artérias segmentares reduziu a taxa de filtração glomerular em 26%, 41% e 51%, respectivamente (54).

Embora alguns estudos recentes tenham demonstrado vantagem do clampeamento arterial seletivo sobre a oclusão da artéria principal na preservação da função renal (55, 56), há controvérsias em relação a eficácia clínica.

A oclusão arterial segmentar durante abordagem aberta com isquemia renal descrita por Nohara T et al. (2008), demonstrou um menor aumento da creatinina sérica em curto prazo naqueles submetidos ao clampeamento seletivo em relação à oclusão da artéria renal principal (57). Shao P et al. (2011) por sua vez, publicou uma série de 75 pacientes submetidos à clampeamento arterial seletivo laparoscópico ou arterial isolado, contemplando uma preservação da função renal pós-operatória favorável à técnica seletiva (54). Desai MM et al. (2014), de maneira semelhante, demonstrou maior preservação da função renal após nefrectomia parcial robô assistida com oclusão vascular superseletiva quando comparado à técnica de clampeamento arterial. Isto foi demonstrado pelos níveis inferiores de creatinina no soro durante a primeira semana após a cirurgia, diferentemente do estudo em questão que avaliou o dano glomerular através de parâmetros morfológicos (58).

Por outro lado, Furukawa J et al. (2016) em um estudo recente, não observou diferença significativa na taxa de filtração glomerular quatro semanas após nefrectomia parcial robô assistida entre os grupos submetidos ao clampeamento arterial e arterial seletivo. Tal diferença a favor do grupo seletivo foi demonstrada apenas na primeira semana após a cirurgia (59). Benway BM et al. (2009) e Komninos C et al. (2015) demonstrou uma vantagem funcional da oclusão arterial seletiva em relação ao clampeamento arterial total somente em curto prazo. Devido ao pequeno período de seguimento, este pode ter pouco significado na recuperação renal a longo prazo (60, 61). Em nosso estudo, foi observado que a isquemia seletiva não foi superior (ou inferior) à oclusão arterial isolada três semanas após o procedimento.

No entanto, a fim de estabelecer a isquemia seletiva, o pedículo renal deve ser dissecado ao longo e às vezes torna-se necessária dissecação intrarenal. Isso adiciona dificuldades técnicas, aumento do risco de sangramento e maior tempo cirúrgico, como demonstrado por Shao P et al. (2011), quando dentre os 38 casos em que realizou-se o

clampeamento segmentar da artéria renal, 7 foram convertidos ao método convencional. Como nenhuma vantagem foi observada neste estudo à favor da isquemia seletiva, é possível pensar que o clampeamento da artéria principal deva ser favorecido em detrimento da isquemia seletiva. No entanto, nos parâmetros avaliados neste estudo, nenhuma desvantagem da isquemia seletiva foi notada, e, portanto, não devemos desencorajar o uso desta técnica.

Berczi C et al. (2015) estudando a função renal em pacientes com rim único submetido à nefrectomia parcial com isquemia quente, demonstrou que a maioria dos pacientes apresentavam insuficiência renal crônica pós-operatória. Isto pode sugerir que estudos sobre a função renal após nefrectomia parcial com isquemia, em pacientes com ambos os rins, pode ter sido afetado pela função renal compensatória do rim contralateral (62). O nosso estudo avaliou o número de glomérulos, tanto no rim operado quanto no rim contralateral, evitando assim o viés que pode ocorrer quando a função renal é avaliada nos pacientes com rim contralateral normal. Além disso, os nossos resultados demonstram claramente que a perda de glomérulos, bem como a quantidade diminuída de néfrons funcionais, contribui para a redução da função renal, o que pode não ser detectável em testes funcionais, mas constitui-se um fator de risco para a função renal após longo período de isquemia quente.

O estudo da isquemia renal, analisando-se o número de glomérulos, parece ser um método valioso, dado que o objetivo desta cirurgia para tratar pequenas massas renais é justamente evitar a perda de néfrons. Muitas vezes, o número de néfrons não se correlaciona diretamente com a função renal em curto prazo. Temos observado que a função renal normalmente permanece inalterada mesmo após uma grande perda de néfrons (63). No entanto, como estes néfrons avariados não podem ser reparados, o indivíduo torna-se mais propenso a desenvolver insuficiência renal em longo prazo, o que pode explicar a diminuição da função renal observada após alguns anos em pacientes submetidos à isquemia renal por nefrectomia parcial (64, 65, 66).

O nível sérico de ureia e creatinina não foi um indicador preciso da função renal pós-operatória, visto que o modelo animal utilizado no estudo não era rim único. Além disso, no grupo S, a porção inferior do rim esquerdo (CA) e a sua porção superior correspondente (CR) não apresentavam volumes conhecidos e, por esse motivo, não tiveram a relação córtico-medular analisada. Deve-se ressaltar ainda, que este é um estudo animal e seus resultados não devem ser diretamente transpostos para os seres humanos. Embora o suíno seja o modelo mais adequado para comparação com a anatomia e fisiologia renal humana, este ainda é um cenário experimental. Além disso, estes animais eram saudáveis, sem tumor renal ou qualquer outra condição clínica o que, mais uma vez, não representa os pacientes submetidos à NP.

Mais estudos são necessários para confirmar estas questões e correlacionar-se com a prática clínica.

CONCLUSÃO

O clampeamento arteriovenoso com 30 minutos de isquemia quente resulta em uma diminuição estatisticamente significativa do número de glomérulos. Por outro lado, as técnicas de clampeamento arterial ou seletiva não promoveram dano glomerular representativo. Assim, as técnicas de clampeamento arterial ou seletiva devem ser preferidas em relação à oclusão arteriovenosa, por apresentarem menor efeito deletério à função renal.

Além disso, no presente estudo, a técnica de oclusão arterial seletiva não traz nenhum benefício, quando comparada ao clampeamento da artéria renal principal, o que pode justificar a oclusão da artéria principal em detrimento da isquemia seletiva, dada as dificuldades técnicas e risco de sangramento relacionadas à última.

REFERENCIAS

1. Campbell SC, Novick AC, Beldegrun A, Blute ML, Chow GK, Derweesh IH, Faraday MM, Kaouk JH, Leveillee RJ, Matin SF, Russo P, Uzzo RG; Practice Guidelines Committee of the American Urological Association. Guideline for management of the clinical T1 renal mass. *J Urol*. 2009 Oct; 182(4):1271-9.
2. Escudier B, Eisen T, Porta C, Patard JJ, Khoo V, Algaba F, Mulders P, Kataja V; ESMO Guidelines Working Group. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2012 Oct; 23 Suppl 7:vii65-71.
3. Robson CJ, Churchill BM, Anderson W. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol*. 1969 Mar; 101(3):297-301.
4. Moll F, Rathert P. The surgeon and his intention: Gustav Simon (1824-1876), his first planned nephrectomy and further contributions to urology. *World J Urol*. 1999 Jun; 17(3):162-7.
5. Wells S. Successful Removal of Two Solid Circum Renal Tumors. *Br Med J*. 1884 Apr 19; 1(1216):758.
6. Herr HW. A history of partial nephrectomy for renal tumors. *J Urol*. 2005 Mar; 173(3):705-8.
7. Sampaio FJ, Aragao AH. Anatomical relationship between the intrarenal arteries and the kidney collecting system. *J Urol*. 1990 Apr; 143(4):679-81.
8. Sampaio FJ, Schiavini JL, Favorito LA. Proportional analysis of the kidney arterial segments. *Urol Res*. 1993; 21(6):371-4.
9. Sampaio FJ, Passos MA. Renal arteries: anatomic study for surgical and radiological practice. *Surg Radiol Anat*. 1992; 14(2):113-7.
10. 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.
11. Sampaio FJ and Aragão AH: Anatomical relationship between the renal venous arrangement and the kidney collecting system. *J Urol*. 1990 Nov; 144(5): 1089-93.
12. Bagetti Filho HJ, Pereira-Sampaio MA, Favorito LA, Sampaio FJ. Pig kidney: anatomical relationships between the renal venous arrangement and the kidney collecting system. *J Urol*. 2008 Apr; 179(4): 1627-30.
13. Clayman RV, Kavoussi LR, Soper NJ, Dierks SM, Meretyk S, Darcy MD, Roemer FD, Pingleton ED, Thomson PG, Long SR. Laparoscopic nephrectomy: initial case report. *J Urol*. 1991 Aug; 146(2):278-82.

14. Winfield HN, Donovan JF, Godet AS, Clayman RV. Laparoscopic partial nephrectomy: initial case report for benign disease. *J Endourol.* 1993 Dec; 7(6): 521-6.
15. Hollingsworth JM, Miller DC, Daignault S, Hollenbeck BK. Rising incidence of small renal masses: a need to reassess treatment effect. *J Natl Cancer Inst.* 2006 Sep 20; 98(18):1331-4.
16. Welch HG, Black WC. Overdiagnosis in cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2010 May 5; 102(9): 605-13.
17. Robson CJ, Churchill BM, Anderson W. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *Trans Am Assoc Genitourinary Surg.* 1968; 60:122-9.
18. Blom JH, Van Poppel H, Maréchal JM, Jacqmin D, Schröder FH, de Prijck L, Sylvester R; EORTC Genitourinary Tract Cancer Group. Radical nephrectomy with and without lymph-node dissection: final results of European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) randomized phase 3 trials 30881. *Eur Urol.* 2009 Jan; 55(1): 28-34.
19. Kletscher BA, Qian J, Bostwick DG, et al: Prospective analysis of multifocality in renal cell carcinoma: influence of histological pattern, grade, number, size, volume and deoxyribonucleic acid ploidy. *J Urol.* 1995 Mar; 153 (3 Pt 2):904-6.
20. Kletscher BA, Qian J, Bostwick DG, Andrews PE, Zincke H. Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas): the basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics. *Pathol Res Pract.* 1986 May; 181(2):125-43.
21. Montie JE. The incidental renal mass: management and alternatives. *Urol Clin North Am.* 1991 Aug; 18(3):427-36.
22. Huang WC, Levey AS, Serio AM, Snyder M, Vickers AJ, Raj GV, Scardino PT, Russo P.. Chronic kidney disease after nephrectomy in patients with renal cortical tumors: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol.* 2006; 7(9):735–740.
23. Pahernik S, Ziegler S, Roos F, Melchior SW, Thüroff JW. Small renal tumors: correlation of clinical and pathological features with tumor size. *J Urol.* 2007 Aug; 178(2):414-7.
24. Thompson RH, Boorjian SA, Lohse CM, Leibovich BC, Kwon ED, Chevillie JC, Blute ML. Radical nephrectomy for pT1a renal masses may be associated with decreased overall survival compared with partial nephrectomy. *J Urol.* 2008 Feb; 179(2):468-71.
25. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med.* 2004 Sep 23; 351(13): 1296-305.

26. Orvieto MA, Zorn KC, Mendiola F, et al. Recovery of renal function after complete renal hilar versus artery alone clamping during open and laparoscopic surgery. *J Urol.* 2007 Jun; 177(6): 2371-4.
27. Simon J, Bartsch G Jr, Finter F, Hautmann R, de Petriconi R. Laparoscopic partial nephrectomy with selective control of the renal parenchyma: initial experience with a novel laparoscopic clamp. *BJU Int.* 2009 Mar; 103(6): 805-8.
28. 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.
29. Silva P. Energy and fuel substrate metabolism in the kidney. *Semin Nephrol.* 1990 Sep; 10(5):432-44.
30. Sheridan AM, Bonventre JV. Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2000 Jul; 9(4):427-34.
31. Schumer M, Colombes MC, Sawczuck. Morphologic, biochemical and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am J Pathol.* 1992 Apr; 140(4):831-8.
32. Alderliesten M, de Graauw M, Oldenampsen J, Qin Y, Pont C, van Buren L, van de Water B. Extracellular signal regulated kinase activation during renal ischemia/reperfusion mediates focal adhesion dissolution and renal injury. *Am J Pathol.* 2007 Aug; 171(2):452-62.
33. Unal D. Antioxidative effects of exogenous nitric oxide versus antioxidant vitamins on renal ischemia reperfusion injury. *Urol Res.* 2002 Jul; 30(3):190-4.
34. Berger AK, Stein RJ, Aron M, Gill IS, Desai MM. Laparoscopic Partial Nephrectomy: A Decade of Evolution. *J Endourol.* 2011 Feb; 25(2):145-50.
35. Shekarris B, Shah G, Upadhyay J. Impact of temporary hilar clamping during laparoscopic partial nephrectomy on postoperative renal function: a prospective study. *J Urol.* 2004 Jul; 172(1):54-7.
36. Plaine LI, Hinman F Jr. Malignancy in asymptomatic renal masses. *J Urol.* 1965 Oct; 94(4):342-7.
37. Neely WA, Turner MD. The effect of arterial, venous, and arteriovenous occlusion on renal blood flow. *Surg Gynecol Obstet.* 1959 Jun; 108(6):669-72.
38. 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. *J Urol.* 2012 Mar; 187(3):807-14.
39. Abreu ALC, Gill IS, Desai MM. Zero-ischemia robotic partial nephrectomy (RPN) for hilar tumors. *BJU Int.* 2011 Sep; 108(6 Pt 2):948-54.

40. Schirmer HKA, Taft JL, Scott WW. Renal metabolism after occlusion of the renal artery and after occlusion of the renal artery and vein. *Surg Gynecol Obstet.* 1966 Sep; 123(3): 539-4.
41. Frank RS, Frank TS, Zelenock GB, D'Alecy LG: Ischemia with intermittent reperfusion reduces functional and morphologic damage following renal ischemia in the rat. *Ann Vasc Surg.* 1993 Mar; 7(2):150-5.
42. Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie.* 1970 Jun; 26(1):5760.
43. 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.
44. Aguila MB, Pinheiro AR, Aquino JC, Gomes AP, Mandarin-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. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2005 May; 76(1-4):74-85.
45. Nyengaard JR. Stereologic methods and their application in kidney research. *J Am Soc Nephrol.* 1999 May; 10(5):1100-23.
46. 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.
47. Clayman RV, Kavoussi LR, Long SR, Dierks SM, Meretyk S, Soper NJ. Laparoscopic nephrectomy: initial report of pelviscopic organ ablation in the pig. *J Urol.* 1991 Aug; 146(2): 278-82.
48. McDougall EM, Clayman RV, Chandhoke PS, Kerbl K, Stone AM, Wick MR. Laparoscopic partial nephrectomy in the pig model. *J Urol.* 1993 Jun; 149(6):1633-6.
49. Tracy CR, Terrell JD, Francis RP, Wehner EF, Smith J, Litorja M, Hawkins DL, Pearle MS, Cadeddu JA, Zuzak KJ. Characterization of renal ischemia using dlp hyperspectral imaging: a pilot study comparing artery-only occlusion versus artery and vein occlusion. *J Endourol.* 2010 Mar; 24(3): 321-5.
50. Birkeland S, Vogt A, Krog J, Semb C. Renal circulatory occlusion and local cooling. *J Appl Physiol.* 1959 Mar; 14(2):227-32.
51. de Souza DB, de Oliveira LL, da Cruz MC, Abílio 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.

52. 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.
53. Umul M, Cal AC, Turna B, Oktem G, Aydin HH. Effect of complete hilar versus only renal artery clamping on renal histomorphology following ischemia/reperfusion injury in an experimental model. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016 Feb; 20(4):589-97.
54. Shao P, Qin C, Yin C, Meng X, Ju X, Li J, Lv Q, Zhang W, Xu Z.. Laparoscopic partial nephrectomy with segmental renal artery clamping: Technique and clinical outcomes. *Eur Urol.* 2011 May; 59(5): 849-55.
55. Satkunasivam R, Tsai S, Syan S, et al. Robotic unclamped "minimal-margin" partial nephrectomy: ongoing refinement of the anatomic zero-ischemia concept. *Eur Urol.* 2015 Oct; 68(4):705-12.
56. Simone G, Gill IS, Mottrie A, et al. Indications, techniques, outcomes, and limitations for minimally ischemic and off-clamp partial nephrectomy: a systematic review of the literature. *Eur Urol.* 2015 Oct; 68(4):632-40.
57. Nohara T, Fujita H, Yamamoto K, Kitagawa Y, Gabata T, Namiki M. Modified anatomic partial nephrectomy with selective renal segmental artery clamping to preserve renal function: A preliminary report. *Int J Urol.* 2008 Oct; 15(11): 961-6.
58. Desai MM, de Castro Abreu AL, Leslie S, Cai J, Huang EY, Lewandowski PM, Lee D, Dharmaraja A, Berger AK, Goh A, Ukimura O, Aron M, Gill IS. Robotic partial nephrectomy with superselective versus main artery clamping: a retrospective comparison. *Eur Urol.* 2014 Oct; 66(4):713-9.
59. Furukawa J, Miyake H, Hinata N, Muramaki M, Tanaka K, Fujisawa M. Renal Functional and Perioperative Outcomes of Selective Versus Complete Renal Arterial Clamping During Robot-Assisted Partial Nephrectomy: Early Single-Center Experience With 39 Cases. *Surg Innov.* 2016 Jun; 23(3):242-8.
60. Benway BM, Baca G, Bhayani SB, Das NA, Katz MD, Diaz DL, Maxwell KL, Badwan KH, Talcott MR, Liapis H, Cabello JM, Venkatesh R, Figenschau RS. Selective versus nonselective arterial clamping during laparoscopic partial nephrectomy: Impact upon renal function in the setting of a solitary kidney in a porcine model. *J Endourol.* 2009 Jul; 23(7):1127-33.
61. Komninos C, Shin TY, Tulliao P, Han WK, Chung BH, Choi YD, Rha KH. Renal function is the same 6 months after robot-assisted partial nephrectomy regardless of clamp technique: analysis of outcomes for off-clamp, selective arterial clamp and main artery clamp techniques, with a minimum follow-up of 1 year. *BJU Int.* 2015 Jun; 115(6):921-8.
62. Berczi C, Thomas B, Bacso Z, Flasko T. Long-Term Oncological and Functional Outcomes of Partial Nephrectomy in Solitary Kidneys. *Clin Genitourin Cancer.* 2015 Nov 26. pii: S1558-7673(15)00313-4.

63. 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.
64. Mir MC, Ercole C, Takagi T, Zhang Z, Velet L, Remer EM, Demirjian S, Campbell SC. Decline in renal function after partial nephrectomy: etiology and prevention. *J Urol.* 2015 Jun; 193(6):1889-98.
65. Clark MA, Shikanov S, Raman JD, Smith B, Kaag M, Russo P, et al. Chronic kidney disease before and after partial nephrectomy. *J Urol.* 2011 Jan;185(1):43-8.
66. McKiernan J, Simmons R, Katz J, Russo P. Natural history of chronic renal insufficiency after partial and radical nephrectomy. *Urology.* 2002 Jun; 59(6):816-20.

APÊNDICE A - Formato final do 1^o artigo científico submetido

8 – ORIGINAL ARTICLE EXPERIMENTAL UROLOGY

Glomerular loss after arteriovenous and arterial clamping for renal warm ischemia in a swine model¹

Gustavo Ruschi Bechara^I, José Aurelino Damasceno-Ferreira^{II}, Leonardo Albuquerque dos Santos Abreu^{III}, Waldemar Silva Costa^{IV}, Francisco José Barcellos Sampaio^V, Marco Aurélio Pereira-Sampaio^{VI}, Diogo Benchimol De Souza^{VII}

DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-865020160110000008>

^IMaster, Postgraduate Program in Physiopathology and Surgical Sciences, Urogenital Research Unit, Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), Brazil. Conception and design of the study, acquisition and interpretation of data, final approval of the manuscript.

^{II}Master, Postgraduate Program in Physiopathology and Surgical Sciences, Urogenital Research Unit, UERJ, Rio de Janeiro-RJ. Assistant Professor, Department of Veterinary Clinical Pathology, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niteroi-RJ, Brazil. Acquisition and interpretation of data, manuscript preparation, final approval of the manuscript.

^{III}Master, Postgraduate Program in Physiopathology and Surgical Sciences, Urogenital Research Unit, UERJ. Assistant Professor, Faculty of Medicine, Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro-RJ, Brazil. Acquisition and interpretation of data, manuscript preparation, final approval of the manuscript.

^{IV}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 of the manuscript.

^VPhD, 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 of the manuscript.

^{VI}PhD, Associate Professor, Postgraduate Program in Physiopathology and Surgical Sciences, Urogenital Research Unit, UERJ, Rio de Janeiro-RJ. Associate Professor, Department of Morphology, UFF, Niteroi-RJ, Brazil. Conception and design of the study, acquisition and interpretation of data, manuscript preparation, final approval of the manuscript.

^{VII}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 of the manuscript.

ABSTRACT

PURPOSE: To evaluate the glomerular loss after arteriovenous or arterial warm ischemia in a swine model.

METHODS: Twenty four pigs were divided into Group Sham (submitted to all surgical steps except the renal ischemia), Group AV (submitted to 30 minutes of warm ischemia by arteriovenous clamping of left kidney vessels), and Group A (submitted to 30 minutes of ischemia by arterial clamping). Right kidneys were used as controls. Weigh, volume, cortical volume, glomerular volumetric density (Vv[Glom]), volume-weighted glomerular volume (VWGV), and the total number of glomeruli were measured for each organ.

RESULTS: Group AV showed a 24.5% reduction in its left kidney Vv[Glom] and a 25.4% reduction in the VWGV, when compared to the right kidney. Reductions were also observed when compared to kidneys of sham group. There was a reduction of 19.2% in the total number of glomeruli in AV kidneys. No difference was observed in any parameters analyzed on the left kidneys from group A.

CONCLUSIONS: Renal warm ischemia of 30 minutes by arterial clamping did not caused significant glomerular damage, but arteriovenous clamping caused significant glomerular loss in a swine model. Clamping only the renal artery should be considered to minimize renal injury after partial nephrectomies.

Key words: Nephrectomy. Warm Ischemia. Kidney Glomerulus. Models, Animal. Swine.

Bechara GR *et al.*

Introduction

The diagnosis of small renal masses has been rising over the past two decades¹, and partial nephrectomy is being increasingly performed to treat this type of tumor². The goal of partial nephrectomy is to remove the tumor while preserving the healthy kidney parenchyma, sparing the maximum possible number of nephrons³. For achieving a bloodless field during kidney dissection, commonly the organ is submitted to transient warm ischemia.

Warm ischemia during partial nephrectomy is identified as a factor that negatively influences the postoperative renal function and is the most frequent cause of chronic and acute renal failure^{4,5}. Despite some techniques for avoiding the use of warm ischemia during partial nephrectomy⁶, the hemostatic control by clamping the renal vessels is still used by several groups⁷.

Classically, the renal pedicle was clamped en bloc avoiding the removal of the perivascular adipose tissue. This would save about 30 minutes of intraoperative time for dissecting the vessels, and cushion the renal vessels from the vascular clamp⁸. However, some studies have shown that renal function is better preserved when only the renal artery is clamped for a partial nephrectomy⁹⁻¹¹. Recently, a study in rats submitted to 60 minutes of kidney warm ischemia demonstrated that arterial only clamping did not impair the renal parenchyma, different from arteriovenous clamping that decreased the glomerular number¹². Although these studies have shown some advantages on clamping only the renal artery, the impact of this technique for preserving glomeruli in swine is not known.

The aim of this study was to evaluate glomerular losses after arterial only or arteriovenous warm ischemia in a swine model, by using unbiased stereologic methods.

Methods

All experiments were performed in accordance with the Brazilian law for scientific use of animals, and this project was formally approved by the local ethics committee for animal experimentation (CEUA039-2013).

Twenty four male pigs weighing 20kg (mean) were used in this study. The animals were divided into three groups with 8 animals in each: Group Sham was submitted to all surgical steps except the renal ischemia; Group AV was submitted to renal warm ischemia by clamping the renal artery and vein; and Group A was

submitted to renal ischemia by only renal artery occlusion.

Under general anesthesia, the animals were placed in right lateral decubitus and a laparoscopic approach with three trocars was used to access the left kidney, as previously described¹³. After identifying and dissecting the renal vessels, a laparoscopic vascular clamp was positioned according to the experimental group. Thus, for group AV the clamp should occlude both artery and vein, for group A only renal artery was occluded, and for group Sham the clamp was positioned but not closed. Animals of groups AV and A were submitted to 30 minutes of left kidney warm ischemia, while animals of group Sham were maintained under anesthesia for the same period. Hereafter, the clamp was removed and reperfusion was observed in the ischemic kidneys. The right kidneys were not manipulated during the experiment and were used as controls. No method for achieving cold ischemia was used.

All animals were submitted to euthanasia 21 days after surgery by anesthetic overdose (pentobarbital). Both left and right kidneys were collected and fixed in 4% buffered formaldehyde. Kidneys were weighed and their volumes were estimated by the Scherle method¹⁴. The cortical-medullary ratio was estimated by using the Cavalieri principle¹⁵ and the absolute cortical volume (CV) was calculated by multiplying the cortical-medullary ratio by the renal volume.

Fragments of renal cortex were collected from the 48 kidneys and were processed for stereological analysis. The specimens were routinely processed for paraffin embedding, sectioned at 5µm thickness, and stained by hematoxylin & eosin. From each kidney, 25 randomly histological fields of the cortex were analyzed. These fields were photographed with a digital camera (DP70, Olympus, Tokyo, Japan) coupled with a microscope (BX51, Olympus) under the same conditions (magnification x200; resolution 2.040x1.536 pixels) and stored in a TIFF file.

Glomerular volume density ($V_v[\text{glom}]$), which indicates the proportional volume occupied by the glomeruli in the cortex, was estimated by the point-counting technique with a M42 test-system¹⁶. The volume-weighted glomerular volume (V_{WGV}), which indicates the mean volume of each glomerulus, was estimated with the point-sampled intercepts method analyzing 50 glomeruli per animal¹⁷. Analyses of $V_v[\text{glom}]$ and V_{WGV} were done using the ImageJ software (version 1.46r, NIH, Bethesda, Maryland, EUA)

The estimation of the total number of glomeruli per kidney was calculated by multiplying the CV by the $V_v[\text{glom}]$

Glomerular loss after arteriovenous and arterial clamping for renal warm ischemia in a swine model

and dividing the result by the VWGV^{14,15}.

Serum creatinine and urea levels were measured in samples obtained before surgery, 10 days after surgery, and immediately before euthanasia.

For each morphological parameter, left kidneys were compared to right organs of each group using the Student's *t*-test. Also the left kidneys of the three studied groups were compared using one way ANOVA with Bonferroni's post test. Mean creatinine and urea serum levels were also 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

For all groups, the left kidneys' weight and volume were statistically similar to that of right kidneys. Also, no difference was observed when the left kidney of groups Sham, AV and A were compared. Additionally, no difference was present regarding the absolute cortical volume of the studied kidneys.

The Vv[glom] was diminished by 24.5% in kidneys submitted to en bloc clamping, in comparison to the right kidneys of this group. The left kidneys of groups Sham and A were not different from their right controls. When comparing the left kidneys of the three groups, we found that the Vv[glom] of group AV was also 24.5% lower than the Sham group. No difference was found between the left kidneys of Sham and A group (Figure 1).

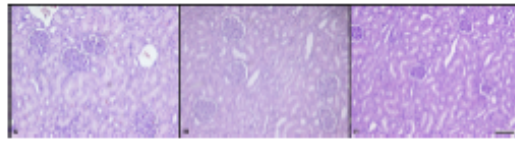


FIGURE 1 - Photomicrographs of cortical fields from kidneys submitted to Sham surgery (A) and warm ischemia by arterial (B) or arteriovenous clamping (C). Hematoxylin and eosin, x200, scale bar represent 100 μ m.

The VWGV showed similar results. The left kidneys of group AV were 25.4% smaller than its right controls. For the groups Sham and A, left and right organs were similar. When comparing the VWGV among the three groups, it was noted that group AV glomeruli had 24.9% lower volume than those of group Sham. Again, no difference was found between the left kidneys of Sham and A group for this parameter.

When analyzing the number of glomeruli per kidney it was observed that the left kidneys of group AV were the only affected organs, with a reduction of 19.2% in comparison to its contralateral control. Arterial clamping did not affect the number of glomeruli as no difference was found when comparing the results of the left kidneys of group A to its right control. All morphological data are listed in Table 1.

There was no significant difference in creatinine and urea serum levels at the different times of withdrawal in the studied groups (Table 2).

TABLE 1 - Stereological data of right and left kidneys of pigs submitted to sham surgery or to left renal ischemia 30 minutes by clamping the renal artery and vein (AV) or the renal artery (A).

	Sham			AV			A		
	Right	Left	<i>p</i> value	Right	Left	<i>p</i> value	Right	Left	<i>p</i> value
Kidney weight (g)	56.9 \pm 3.4	56.7 \pm 6.9	0.93	56.4 \pm 6.9	54.4 \pm 7.6	0.60	57.1 \pm 3.5	56.9 \pm 5.0	0.93
Kidney volume (ml)	55.9 \pm 4.0	55.8 \pm 7.6	0.98	55.7 \pm 5.5	52.2 \pm 7.1	0.28	54.9 \pm 3.1	54.3 \pm 4.9	0.79
Cortical volume (ml)	40.0 \pm 3.1	39.5 \pm 7.0	0.85	40.1 \pm 5.1	36.6 \pm 5.5	0.60	39.5 \pm 2.1	38.5 \pm 4.3	0.93
Vv[glom] (%)	4.4 \pm 0.1	4.4 \pm 0.2	0.88	4.4 \pm 0.1	3.3 \pm 0.2*	<0.0001	4.4 \pm 0.1	4.4 \pm 0.2	0.89
VWGV (10 ⁴ μ m ³)	13.9 \pm 0.5	13.8 \pm 0.8	0.88	13.9 \pm 0.5	10.4 \pm 1.2*	<0.0001	13.8 \pm 0.9	13.6 \pm 0.6	0.65
Glomeruli (millions)	1.26 \pm 0.1	1.26 \pm 0.2	0.98	1.30 \pm 0.1	1.05 \pm 0.2	0.02	1.26 \pm 0.1	1.25 \pm 0.2	0.89

*Different from left kidney of Sham group; Data expressed as mean \pm S.D.

Bechara GR *et al.*

TABLE 2 - Serum creatinine and urea levels drawn before surgery and on postoperative days 10 and 21 of pigs submitted to sham surgery or to left renal ischemia 30 minutes by clamping the renal artery and vein (AV) or the renal artery (A).

		Preoperative	10 days Postoperative	21 days Postoperative	p value
Sham	Creatinine	1.15 ± 0.13	0.95 ± 0.17	1.15 ± 0.29	0.38
	Urea	38.0 ± 1.4	39.2 ± 6.3	37.0 ± 3.0	0.64
AV	Creatinine	1.12 ± 0.31	1.12 ± 0.15	1.09 ± 0.27	0.94
	Urea	38.1 ± 6.1	40.8 ± 5.5	37.4 ± 2.7	0.38
A	Creatinine	1.21 ± 0.19	1.03 ± 0.17	1.14 ± 0.25	0.31
	Urea	39.7 ± 3.7	38.6 ± 7.8	37.7 ± 4.0	0.78

Data expressed as mean ± S.D.

Discussion

In 2007, Spaliviero and Gill suggested that clamping the renal vessels en bloc for laparoscopic partial nephrectomy would have advantages over dissecting the renal pedicle and clamping the renal artery alone⁶. Since then, great progress has been made in studying methods for achieving renal ischemia for nephron sparing surgery. Even so, many groups use different techniques for tumor removal with or without ischemia⁷, and clamping the renal artery only or artery and veins remains a controversial point. While some studies found a better preservation of renal function when only the renal artery is clamped⁸⁻¹², this is the first study to address the number of glomeruli after en bloc versus arterial clamping for achieving renal warm ischemia in the pig model.

The mechanisms that explain the advantages of clamping the artery only are still unknown. However, during arterial only ischemia the kidney blood may flow through the renal vein as it is not occluded, decreasing venous congestion. Ischemia-reperfusion process induces oxidative stress and increased inflammatory response, releasing oxygen reactive species in the bloodstream¹⁶. These molecules should be reduced by antioxidants or may cause cell harm and death¹⁷. We may suppose that during an en bloc renal ischemia the oxygen reactive species generated become restrained inside the kidney causing harm to the organ with cell death and possibly leading to glomerular losses observed in the present study. On the other hand, when only the artery is clamped, these molecules can flow to bloodstream through the unobstructed renal veins, being reduced by antioxidants.

Orvieto *et al.*¹⁸ observed that clamping only the renal artery during an open partial nephrectomy in a swine model causes less impact on renal function than clamping the renal artery and veins. However, the benefit of clamping only the renal artery was not observed when the laparoscopic approach was used for partial

nephrectomy. The authors postulated that the pneumoperitoneum may partially occlude the venous backflow, eliminating the benefits of the isolated arterial clamping¹⁹. Our study showed different results since (despite the abdominal insufflation) the kidneys submitted to ischemia by clamping only the renal artery had no significant decrease in glomerular number as compared to those submitted to en bloc clamping. Furthermore, it was previously demonstrated in a rodent study, that pneumoperitoneum used under adequate pressures does not cause harm to kidney morphology¹⁵. Even so, in the aforementioned study¹⁸ the authors used a prolonged warm ischemia time (120 minutes) what could explain the different results observed in our experiment.

Berczi *et al.*¹⁸ studying renal function in patients with solitary kidney undergoing partial nephrectomy with renal warm ischemia demonstrated that most patients had chronic renal failure. This may suggest that studies on renal function after partial nephrectomy with warm ischemia in patients with two kidneys may have been affected by patients' renal function being compensated by the contralateral kidney, which suffered no damage. Our study assessed the number of glomeruli, in both the operated kidney and the contralateral kidney, thus avoiding the bias that can occur when renal function is evaluated in patients with contralateral kidney. Furthermore, our results clearly demonstrate that the loss of glomeruli, thereby also the diminished amount of functional nephrons, reduced renal function. This may not be detectable in functional tests, but it is a risk factor in long-term renal function after renal warm ischemia.

Studying the renal ischemia by analyzing the number of glomeruli seems to be a valuable method, as the objective of this surgery is to treat small renal tumors while avoiding the loss of nephrons. Many times, the number of nephrons does not directly correlate with short-term renal function. We have observed that renal function commonly remains unaltered even after a great loss

of nephrons¹⁴. However, as these lost nephrons cannot be restored, the individual is more likely to develop renal insufficiency/failure at the long term. This may explain the decrease in renal function observed after some years in patients submitted to renal ischemia for partial nephrectomy^{4,19,20}.

Future studies investigating the effects of clamping the renal artery or artery and vein are warranted. For instance, it is not known if the better results of the artery-only clamping are seen when cold ischemia is used. Furthermore, if the oxygen reactive species and the oxidative stress are involved in the glomerular loss after ischemia by arterial or en bloc clamping, studies investigating the use of antioxidants would be interesting.

We should point out that this is an animal study and its results should not be directly transposed to humans. Although the swine is the most adequate model for comparison to human kidney anatomy and physiology^{13,21}, this is still an experimental setting and different from the clinical setting. Further, these animals were healthy individuals, without renal tumor or any other medical condition which, again, does not represents the patients submitted to partial nephrectomy.

Conclusions

In our swine model, the renal warm ischemia of 30 minutes by arterial clamping did not caused significant glomerular damage or nephron loss. By the other hand, when arteriovenous clamping was used, 30 minutes of warm ischemia caused a decrease in the number of glomeruli. Thus, whenever possible, clamping only the renal artery for warm ischemia should be favored over en bloc clamping to minimize renal injury after partial nephrectomies.

References

- Kane CJ, Mallin K, Ritchey J, Cooperberg MR, Carroll PR. Renal cell cancer stage migration: analysis of the National Cancer Data Base. *Cancer*. 2008 Jul 1;113(1):78-83. PMID: 18491376.
- 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 Sep;60(3):501-15. doi: 10.1016/j.eururo.2011.05.044.
- 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.
- Mir MC, Ercole C, Takagi T, Zhang Z, Velet L, Remer EM, Demirjian S, Campbell SC. Decline in renal function after partial nephrectomy: etiology and prevention. *J Urol*. 2015 Jun;193(6):1889-98. PMID: 25637858.
- Secin FP. Importance and limits of ischemia in renal partial surgery: experimental and clinical research. *Adv Urol*. 2008;102461. doi: 10.1155/2008/102461.
- Simone G, Gill IS, Mottrie A, Kutikov A, Patard JJ, Alcaraz A, Rogers CG. Indications, techniques, outcomes, and limitations for minimally ischemic and off-clamp partial nephrectomy: a systematic review of the literature. *Eur Urol*. 2015 Oct;68(4):632-40. PMID: 25922273.
- Mir MC, Pavan N, Parekh DJ. Current Paradigm for Ischemia in Kidney Surgery. *J Urol*. 2016 Jun;195(6):1655-63. doi: 10.1016/j.juro.2015.09.099.
- Spaliviero M, Gill IS. Laparoscopic partial nephrectomy. *BJU Int*. 2007 May;99(5 Pt B):1313-28. doi: 10.1111/j.1464-410X.2007.06809.x.
- Gong EM, Zorn KC, Orvieto MA, Lucioni A, Msezane LP, Shalhav AL. Artery-only occlusion may provide superior renal preservation during laparoscopic partial nephrectomy. *Urology*. 2008 Oct;72(4):843-6. doi: 10.1016/j.urology.2008.05.020.
- Orvieto MA, Zorn KC, Mendiola F, Lyon MB, Mikhail AA, Gofrit ON, Shalhav AL. Recovery of renal function after complete renal hilar versus artery alone clamping during open and laparoscopic surgery. *J Urol*. 2007 Jun;177(6):2371-4. doi: 10.1016/j.juro.2007.01.115.
- Park Y, Hirose R, Dang K, Xu F, Behrends M, Tan V, Roberts JP, Niemann CU. Increased severity of renal ischemia-reperfusion injury with venous clamping compared to arterial clamping in a rat model. *Surgery*. 2008 Feb;143(2):243-51. doi: 10.1016/j.surg.2007.07.041.
- Bagetti-Filho HU, 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.
- 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):308 e5-9. doi: 10.1016/j.urology.2010.08.017.
- 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.
- 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.IBJU.2013.01.05.
- Sheridan AM, Bonventre JV. Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2000 Jul;9(4):427-34. PMID: 10926180.
- Gregorio BM, De Souza DB, de Moraes Nascimento FA, Pereira LM, Fernandes-Santos C. The potential role of antioxidants in metabolic syndrome. *Curr Pharm Des*. 2016 22(7):859-69. PMID: 26648468.
- Berczi C, Thomas B, Bacso Z, Flasko T. Long-Term Oncological and Functional Outcomes of Partial Nephrectomy in Solitary Kidneys. *Clin Genitourin Cancer*. 2016 14(3):e275-81. doi: 10.1016/j.clgc.2015.11.014.
- Clark MA, Shikanov S, Raman JD, Smith B, Kaag M, Russo P, Wheat JC, Wolf JS, Jr, Matin SF, Huang WC, Shalhav AL, Eggner SE. Chronic kidney disease before and after partial nephrectomy. *J Urol*. 2011 Jan;185(1):43-8. doi: 10.1016/j.juro.2010.09.019.

Bechara GR *et al.*

20. McKiernan J, Simmons R, Katz J, Russo P. Natural history of chronic renal insufficiency after partial and radical nephrectomy. *Urology*. 2002 Jun;59(6):816-20. PMID: 12031359.
 21. 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.
-

Correspondence:

Diogo Benchimol de Souza
Urogenital Research Unit – UERJ
Avenida 28 de Setembro, 87
20551-030 Rio de Janeiro - RJ Brasil
Tel.: (55 21)2868-8399
diogobenchimol@gmail.com

Received: July 18, 2016

Review: Sep 19, 2016

Accepted: Oct 17, 2016

Conflict of interest: none

Financial sources: CNPq, CAPES, and FAPERJ.

¹Research performed at Experimental Farm, Faculty of Veterinary Medicine, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói-RJ, and Urogenital Research Unit, Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), Brazil.

Original Paper

Urologia
InternationalsUrol Int
DOI: 10.1159/000458762Received: October 14, 2016
Accepted: February 3, 2017
Published online: March 30, 2017**Glomerular Morphology and Renal Function after Warm Ischemia by Main Artery or Selective Clamping in a Porcine Model**Gustavo R. Bechara^a José A. Damasceno-Ferreira^{a,c}
Leonardo A.S. Abreu^{a,b} Waldemar S. Costa^a Francisco J.B. Sampaio^a
Marco A. Pereira-Sampaio^{a,d} Diogo B. de Souza^a^aUrological Research Unit, State University of Rio de Janeiro, and ^bFaculty of Medicine, Estácio de Sá University, Rio de Janeiro, ^cDepartment of Veterinary Clinical Pathology, and ^dDepartment of Morphology, Fluminense Federal University, Niterói, Brazil**Keywords**

Partial nephrectomy · Warm ischemia · Nephrons · Animal models · Swine

Abstract

Objective: The study aimed to evaluate the ischemic and non-ischemic areas after selective arterial occlusion by using stereological analysis of glomeruli, and to compare them with main arterial clamping and sham-operated animals. **Materials and Methods:** Twenty-four male pigs were used in the study. The animals were divided into 3 groups with 8 animals in each as follows: group sham, submitted to laparoscopic dissection of the renal pedicle but not submitted to ischemia; group arterial (A), submitted to left renal artery clamping; and group selective (S), submitted to left renal artery caudal branch occlusion. Groups A and S underwent 30 min of warm ischemia. Left and right kidneys were collected after 21 days and renal fragments were processed for stereological evaluation. Glomerular volume density (Vv[glom]), mean glomerular volume (MGV), and glomerular density were measured. Serum creatinine and urea were assessed preoperatively, 10 days after surgery, and before euthanasia. **Results:** There was no significant difference among groups with regard to renal function. Renal weight and vol-

ume were similar among groups. Also, no difference was observed between the groups with regard to Vv[glom], MGV, and glomerular density, both when compared to its right control or when left kidneys were compared. **Conclusions:** Selective arterial clamping technique was neither superior nor inferior to main artery clamping. © 2017 S. Karger AG, Basel

Introduction

Partial nephrectomy (PN) has been performed to treat small renal masses with similar oncological outcomes to radical nephrectomy and less morbidity [1, 2]. Moreover, PN is a nephron-sparing technique, which preserves the renal tissue that it is not affected by the tumor, keeping healthy nephrons that would be lost in the radical surgery. On the other hand, the warm ischemia (WI) regularly used during the PN in order to obtain a bloodless field, can affect the renal function after PN [3]. Thus, parenchymal damage resulting from WI is a big dilemma during PN [4].

Recently, different methods for avoiding WI in the whole kidney, by off-clamp [5] or selective arterial clamping, are being increasingly used [6, 7], restricting the isch-

KARGER

© 2017 S. Karger AG, Basel

E-Mail: karger@karger.com
www.karger.com/doiDiogo Benício de Souza, DVM, PhD
Urological Research Unit - UERJ
Av. 28 de Setembro, 87, Fundos, Vila Isabel
Rio de Janeiro, RJ 28251-030 (Brazil)
E-Mail: diogobenicio@gmail.com



Fig. 1. Laparoscopic view of the pig left kidney submitted to a selective warm ischemia. The vascular clamp is applied to the caudal branch of renal artery, resulting in the ischemia of the caudal pole, which is confirmed by visualization of the different colors of the cranial and caudal poles.

emia to the resected area. While selective clamping techniques have been associated with a better postoperative renal function in comparison to renal artery occlusion by some studies [8–10], other researchers have contested these results [11, 12]. However, these studies were based only on functional outcomes, and there is no quantitative morphological investigation of kidneys after selective ischemia. When evaluating renal function in patients with 2 kidneys, the healthy kidney can compensate the renal function outcomes. Some authors point that studies of renal function in patients or solitary kidney porcine models [8] would provide the most objective results to evaluate the renal damage caused by the WI. On the other hand, animal models with 2 kidneys are useful to evaluate the renal damage because the quantitative analysis of glomeruli of the ischemic kidney compared to the contralateral kidney without ischemia can be done.

It was already demonstrated that rats [13] and pigs [14] undergoing WI exhibited a significant decrease in the number of glomeruli, even without impaired renal function. Thus, the quantitative analysis of glomeruli can be used as an important tool for assessing renal injury promoted by the WI, since it is an objective evaluation of the kidney that underwent WI.

The hypothesis of the present study was that selective arterial occlusion would be deleterious to the corresponding ischemic area, while the non-ischemic renal paren-

chyma would not be affected. Therefore, the aim of this research was to evaluate the glomerular injury in ischemic and non-ischemic areas after selective arterial occlusion by using quantitative analysis of glomeruli, and to compare with main arterial clamping and sham-operated animals.

Materials and Methods

All experiments were performed in accordance with the Brazilian law for scientific use of animals, and this project was formally approved by the local Ethics Committee. The animals were kept in a collective stall and received water and commercial diet *ad libitum*.

Twenty-four male pigs weighing 20 kg (mean) were used in this study. The animals were randomly assigned in to 3 experimental groups with 8 animals in each. All animals in each group underwent video laparoscopy. Animals from group sham were submitted to hilar dissection without vascular clamping, while animals from the group of arterial clamping (A) were submitted to temporary occlusion of the left renal artery and animals from group of selective clamping (S) were submitted to temporary occlusion of the caudal branch of the left renal artery. As known, the renal artery in pigs divides into cranial and caudal branches in 93.4% of the cases, supplying cranial and caudal pole respectively [15]. Cranial branch of the renal artery supplies 50% of the renal parenchyma on average, while the caudal branch supplies 42% [16]. Therefore, by clamping the caudal branch of renal artery, we promoted a selective ischemia of the caudal renal pole, which was confirmed intraoperatively by visualization of the parenchymal color change, limited to caudal pole, as seen in Figure 1. Thus, animals from group S had an ischemic caudal pole (Sc) and a non-ischemic cranial pole (Scr) of the left kidney, which were analyzed as different groups for stereological parameters.

After anesthesia, animals were placed in right lateral decubitus. A laparoscopic approach with 3 trocars was used to access the left kidney. After hilar dissection and identification of the renal artery, vein, and ureter, the animals were submitted to vascular occlusion or not according to each experimental group. The laparoscopic vascular clamp was used on renal artery for promoting WI in animals from group A. In animals from group S, only the caudal branch of the renal artery was clamped and in animals from group sham, no ischemia was done. The ischemia was maintained for a period of 30 min. After this period, the clamp was opened and the kidney recovered the normal color again, so, abdominal laparoscopic portals were closed. The right kidneys were not manipulated during the experiment and were used as controls.

All animals received analgesia for 24 h after surgery. Food and water were given *ad libitum* 6 h after the end of surgery. The recovery of normal ambulation occurred up to 12 h after the procedure. After 21 days, all animals were submitted to euthanasia by thiopental overdose. Both left and right kidneys were removed and fixed by immersion in 4% buffered formaldehyde. After dissection, each kidney was weighed and their volume was determined by Scherle method [17].

Fragments of the renal cortex were collected from caudal pole of all kidneys. In organs removed from group S, fragments from

Table 1. Weight and volume of kidneys from pigs submitted to sham surgery or to left renal arterial or selective ischemia for 30 min

	Sham			Group A			Group S		
	right	left	p value	right	left	p value	right	left	p value
Kidney weight, g	56.9±3.4	56.7±6.7	0.93	57.1±3.5	56.9±5.1	0.79	56.6±6.3	56.9±5.6	0.92
Kidney volume, mL	55.9±4.0	55.8±7.6	0.98	54.9±3.1	54.3±4.9	0.79	54.6±6.3	54.9±6.3	0.92

Data expressed as mean ± SD.

Table 2. Stereological data of kidneys from pigs submitted to sham surgery or to left renal arterial or selective ischemia for 30 min

	Sham			Group A			Group S					
	right	left	p value	right	left	p value	right	left Cr	p value	left Cd	p value	
Vv[glom], %	4.37±0.1	4.30±0.2	0.89	4.40±0.1	4.41±0.2	0.89	4.40±0.2	4.33±0.2	0.49	4.15±0.3	0.11	
MGV, 10 ³ μm ³	13.86±0.5	13.81±0.8	0.88	13.85±0.9	13.66±0.6	0.69	13.91±0.4	13.70±0.2	0.71	13.66±0.8	0.37	
Glomerular density, /mm ³	31.57±1.8	31.81±2.3	0.81	31.92±2.4	32.35±1.8	0.69	31.94±1.8	31.60±1.7	0.71	30.55±3.8	0.37	

Data expressed as mean ± SD. Cr, cranial pole; Cd, caudal pole; Vv[glom], glomerular volume density; MGV, mean glomerular volume.

the cranial pole (which corresponds to the region not submitted to ischemia) were also collected. Thus, there are 2 subgroups of the group S (selective clamping group): one for which samples were collected from the caudal pole (Sca) and another one for which samples were collected from the cranial pole (Scr).

All samples were processed by histological routine methods for stereological analysis. The specimens were embedded in paraffin, sectioned at 5-μm thickness, and stained by hematoxylin and eosin. Twenty-five histological fields, randomly obtained from different sections of the renal cortex, were acquired from each group with a digital camera (DP70, Olympus, Tokyo, Japan) coupled to a microscope (BX51, Olympus).

Glomerular volume density (Vv[glom]), which indicates the volume occupied by glomeruli into the cortex, was estimated by the point-counting technique with a M42 test system [14, 18]. For this, a test grid with 21 lines and 42 point was digitally superimposed to the histological field. Then, each of these 42 points was counted as positive if they were over an glomeruli. The number of points hitting glomerulus is divided by 42 (the total number of points) to obtain the Vv[glom], expressed in percentage. The mean glomerular volume (MGV) was estimated with the point-sampled intercepts method, analyzing at least 50 glomeruli per group [14, 17]. For this, the histological images were rotated in random angles and a system of parallel lines was digitally superimposed to the image. Furthermore, the glomerulus crossed by these lines was measured with a 32-mm long logarithmic ruler composed of a series of 15 classes. Each individual intercept was cubed, and the mean of all values was multiplied by π/3 in every case to obtain the MGV. The glomerular density, expressed as the number of glomeruli per cubic millimeter of renal cortex, was calculated by dividing the Vv[glom] by the MGV [14]. All stereologic evaluations were assessed with the ImageJ software (version 1.46r, NIH, Bethesda, MD, USA).

Blood samples of all animals were obtained before surgery, 10 days after surgery and immediately prior to euthanasia, 21 days after surgery. Serum creatinine and urea levels were determined in these samples.

For each morphologic parameter, left kidneys were compared to right organs of each group using the Student *t* test. One way ANOVA with Bonferroni's post test was used for comparing the left kidneys of all groups. For some parameters, the left kidneys of S group were analyzed separately as left-cranial and left-caudal groups. For all analyses, 2-tailed tests were used. All analyses were performed using the GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Mean differences were considered significant at *p* < 0.05. All results are presented as means ± SD.

Results

The left kidneys weight and volume were not different from right kidneys, in all groups. Similarly, the right and left weight and volume were similar among the left kidney for all groups (Table 1).

Also, no difference was observed among the groups as regards to Vv[glom], MGV, and glomerular density, both in comparison to its right control and when left kidneys were compared. The numerical results are present in Table 2.

Serum creatinine and urea on the preoperative samples were 1.15 and 38.0 mg/dL for group sham; 1.21 and 39.7 mg/dL for group A; and 1.20 and 39.7 mg/dL for

group S. On the postoperative day 10, the serum creatinine was 0.95 mg/dL and urea was 39.2 mg/dL for group sham; 0.96 and 38.6 mg/dL for group A; and 0.95 and 39.7 mg/dL for group S. After 21 days from surgery, the serum creatinine was 1.15 mg/dL and urea was 37.0 mg/dL for group sham; 1.13 and 37.7 mg/dL for group A; and 1.1 and 37.5 mg/dL for group S. There was no significant difference in creatinine and urea serum levels at different times of withdrawal.

Discussion

Bleeding control during PN can be achieved in several ways [5–7], but vascular clamping is still the most important maneuver used for this purpose [19]. Although renal ischemia improves the surgical field, it remains a concern as it represents the most frequent cause of acute and chronic renal failure [3, 4]. The present study brings information on how different clamping techniques influence the kidney morphometric and functional parameters.

Despite previous experimental studies showing that WI alters the normal kidney morphology with reduction of glomerular density [14], this study used en bloc (arteriovenous) clamping. In the present study, we used only arterial or selective ischemia, and this may explain why group A did not show different results from group sham. This corroborates the findings of Bagetti-Filho et al. [13] who showed that arterial ischemia does not significantly reduce these same glomeruli parameters in a rat model. Even after 30 min of WI in this swine model, we did not observe any significant damage to kidney morphology or function when compared to its contralateral or to sham-operated organ. The present data suggest that glomeruli damage is minimal when the period of WI, by arterial clamping, is less than 30 min.

Selective artery clamp techniques were developed as alternatives to the main renal vessels clamp approach. Although recent studies demonstrated the advantage of selective branch artery clamping over main artery clamping in preserving renal function [9, 10], there is controversy regarding the clinical efficacy [11, 12]. In the present study, it was demonstrated that selective ischemia was not superior (nor inferior) to main renal artery clamping in the swine model.

In order to establish selective ischemia, the renal pedicle should be dissected throughout and intrarenal dissection is sometimes also needed. This adds technical difficulties, increased risk of bleeding, and higher

surgical time to the procedure. As no advantage comes with selective ischemia, it is possible to think that main artery clamping should be favored over selective ischemia. However, on the evaluated parameters of this study, no disadvantage of selective ischemia was noted, and thus we should not discourage the use of this technique.

A porcine study showed less renal damage in kidneys submitted to selective ischemia when compared to those with arterial clamping. This was demonstrated by lower serum creatinine levels during the first week after surgery [8]. However, the renal damage seen after 60 and 90 min of ischemia was documented only by functional methods [8]. It was already shown, in different experimental models [14, 18], that functional tests are less sensitive than stereological analysis for detecting renal alterations. Thus, the primary hypothesis of the present study was that it would be possible to demonstrate glomerular losses in kidneys submitted to 30 min of WI.

Functional tests such as serum urea and creatinine levels and glomerular filtration rate are commonly used to assess the effects of WI during PN in clinical and experimental studies. However, many times the short-term renal function is not altered even after a great loss of glomeruli [14, 17], and thus, stereological studies should be favored. To the best of our knowledge, this is the first study to objectively investigate the glomeruli morphology after selective arterial clamping.

The main purpose of nephron sparing surgery is to preserve as many nephrons as possible while treating the renal tumor. In this regard, an objective assessment of the glomeruli may accurately identify the functional units that were damaged during WI. Stereological methods such as those used in our study reduce sampling bias and may increase accuracy in identifying irreversible kidney damage after ischemic injury [14, 18, 20].

The WI time designed for the present study corresponds to the maximum recommended time for clinical settings [21]. Some literature even advocates that WI time should not be higher than 20 or 25 min [21, 22]. For the same reason, longer WI times were not the primary objective of this study. However, considering that in some cases, WI may be much higher than 30 min, it would be important to study the glomerular injury after selective arterial occlusion for longer ischemia times.

Future studies investigating the effects of different methods of renal ischemia are warranted. For instance, it is not known if selective ischemia would have advantages on a renal insufficiency or single kidney model. Furthermore, super-selective clamping techniques may have

advantages as less kidney parenchyma is submitted to ischemia.

We should point out that this is an animal study and its results should not be directly transposed to humans. Although the swine is the most adequate model for comparison to human kidney anatomy and physiology [15, 20, 23], this is still an experimental setting and therefore different from the clinical practice. Furthermore, these animals were healthy individuals, without renal tumor or any other medical condition that, again, does not represent the patients submitted to PN.

Based on this porcine model study, arterial or selective ischemia for 30 min does not promote detrimental alteration in kidney morphology and function. Selective arterial clamping technique was neither superior nor in-

ferior to main artery clamping. More studies are needed to confirm these issues and correlate with clinical practice.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Foundation for Research Support of Rio de Janeiro (FAPERJ), the Coordination for the Improvement of Post-Graduate Students (CAPES), and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Disclosure Statement

The authors have no conflict of interest to disclose.

References

- Toutjot K, Jacquin D, Kavoussi LR, et al: The expanding role of partial nephrectomy: a critical analysis of indications, results, and complications. *Eur Urol* 2010;57:214-222.
- Kalogianni C, Fender H, Mack P, et al: Long-term outcome of nephron-sparing surgery compared to radical nephrectomy for renal cell carcinoma ≥ 4 cm - a matched-pair single institution analysis. *Urol Int* 2016, Epub ahead of print.
- Thompson RH, Lane BR, Lohse CM, et al: Renal function after partial nephrectomy: effect of warm ischemia relative to quantity and quality of preserved kidney. *Urology* 2012;79:356-360.
- Volpe A, Elate ML, Picarra V, et al: Renal ischemia and function after partial nephrectomy: a collaborative review of the literature. *Eur Urol* 2015;68:e1-74.
- Kretzmar MC, Pfalzgraf D, Hücker A, Michel MS: ZIRC-technique: zero ischemia resection in the kidney for high-risk renal masses: peri-operative outcome. *Urol Int* 2015;95:216-222.
- Satkuwatam R, Tsai S, Syan S, et al: Robotic unclamped "minimal-margin" partial nephrectomy: ongoing refinement of the anatomic zero-ischemia concept. *Eur Urol* 2015; e8:705-712.
- Strome G, Gill IS, Motiie A, et al: Indications, techniques, outcomes, and limitations for minimally ischemic and off-clamp partial nephrectomy: a systematic review of the literature. *Eur Urol* 2015;68:632-640.
- Benway BM, Ilaca G, Bhayani SB, et al: Selective versus nonselective arterial clamping during laparoscopic partial nephrectomy: impact upon renal function in the setting of a solitary kidney in a porcine model. *J Endourol* 2009;23:1127-1133.
- Deasi MM, de Castro Abreu AI, Leal S, et al: Robotic partial nephrectomy with superselective versus main artery clamping: a retrospective comparison. *Eur Urol* 2014;66:713-719.
- Shao P, Qin C, Yin C, et al: Laparoscopic partial nephrectomy with segmental renal artery clamping: technique and clinical outcomes. *Eur Urol* 2011;59:849-855.
- Komninos C, Shih TY, Tziantos P, et al: Renal function in the same 6 months after robot-assisted partial nephrectomy regardless of clamp technique: analysis of outcomes for off-clamp, selective arterial clamp and main artery clamp techniques, with a minimum follow-up of 1 year. *HJU Int* 2015;115:921-928.
- Martin GL, Warner JN, Nataras RN, Andrews PE, Humphreys MR, Castle EP: Comparison of total, selective, and nonarterial clamping techniques during laparoscopic and robot-assisted partial nephrectomy. *J Endourol* 2012; 26:152-156.
- Bagetti-Filho HJ, Sampaio FJ, Marques RG, Perera-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;26:1335-1339.
- de Souza DB, de Oliveira LL, da Cruz MC, et al: Laparoscopic partial nephrectomy under warm ischemia reduces the glomerular density in a pig model. *J Endourol* 2012;26:706-710.
- Perera-Sampaio MA, Favortto 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):2077-2081.
- Perera-Sampaio M, Favortto LA, Henry R, Sampaio FJ: Proportional analysis of pig kidney arterial segments: differences from the human kidney. *J Endourol* 2007;21:784-788.
- Benchtmol de Souza D, Silva D, Marinho Costa Silva C, Barcellos Sampaio FJ, Silva Costa W, Martins Cortes C: Effects of immobilization stress on kidneys of Wistar male rats: a morphometrical and stereological analysis. *Kidney Blood Press Res* 2011;34:424-429.
- Souza DB, Costa WS, Cardoso LE, Benchtmol M, Perera-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;39:30-36.
- Guilhonnet R, Bermudez H, Ghelani S, et al: Laparoscopic partial nephrectomy for renal tumor: single center experience comparing clamping and no clamping techniques of the renal vasculature. *J Urol* 2003;169:483-486.
- Bechara GR, Damasceno-Ferreira JA, Abreu LA, et al: Glomerular loss after arteriovenous and arterial clamping for renal warm ischemia in a swine model. *Acta Cir Bras* 2016;31: 753-758.
- Thompson RH, Lane BR, Lohse CM, et al: Comparison of warm ischemia versus no ischemia during partial nephrectomy on a solitary kidney. *Eur Urol* 2010;58:331-336.
- Becker F, Van Poppel H, Hakkenberg OW, et al: Assessing the impact of ischemia time during partial nephrectomy. *Eur Urol* 2009; 56:625-634.
- 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-e9.

ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética



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



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **CEUA/039/2013** sobre "**Avaliação da função renal e da densidade glomerular em porcos após clampeamento temporário hilar, arterial ou seletivo**", sob a responsabilidade de **Francisco José Barcellos Sampaio**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ em **04/10/2013**. Este certificado expira em **04/10/2017**.

Rio de Janeiro, 04 de Outubro de 2013.

Patricia C. Lisboa

Israel Felzenszwalb

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof^{ma} Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
/ass. Prof^a Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ
Matricula 34765-8

☎ (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748
biologia@uerj.br