Anna Paula Weinhardt Baptista Sincos

**AVALIAÇÃO DOPPLERFLUXOMÉTRICA E ANATOMOPATOLÓGICA
DA ISQUEMIA RENAL: modelo experimental de *kidney-kidney*
*crosstalk***

Tese apresentada à Sociedade Beneficente
Israelita Brasileira Albert Einstein para
obtenção do Título de Doutor em Ciências
da Saúde.

São Paulo

2017

Anna Paula Weinhardt Baptista Sincos

**AVALIAÇÃO DOPPLERFLUXOMÉTRICA E ANATOMOPATOLÓGICA
DA ISQUEMIA RENAL: modelo experimental de *kidney-kidney*
*crosstalk***

Tese apresentada à Sociedade Beneficente
Israelita Brasileira Albert Einstein para
obtenção do Título de Doutor em Ciências
da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Oskar Grau Kaufmann
Coorientadores: Prof. Dr. Nelson Wolosker e
Prof. Dr. Ricardo Aun

São Paulo

2017

S616a

Sincos, Anna Paula Weinhardt Baptista

Avaliação dopplerfluxométrica e anatomopatológica da isquemia renal : modelo experimental de *kidney-kidney crosstalk* / Anna Paula Weinhardt Baptista Sincos. -- São Paulo, 2017.
xiv, 50 f., il.

Tese (Doutorado) – Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *Duplex scan and histologic assessment of acute renal injury in a kidney-kidney crosstalk swine experimental model.*

1. Insuficiência renal. 2. Ultrassonografia Doppler. 3. Isquemia. 4. Modelos animais. 5. Fluxometria por laser-Doppler.

NLM – WJ 342

SOCIEDADE BENEFICENTE ISRAELITA BRASILEIRA ALBERT EINSTEIN

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

Anna Paula Weinhardt Baptista Sincos

**AVALIAÇÃO DOPPLERFLUXOMÉTRICA E ANATOMOPATOLÓGICA
DA ISQUEMIA RENAL: modelo experimental de *kidney-kidney*
*crosstalk***

Presidente da banca: Prof. Dr. Oskar Grau Kaufmann

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Dr. Carlos Ventura Pinto

Dr. Walter Campos Júnior

Profa. Dra. Suzan Menasce Goldman

Membros suplentes:

Dr. Alex Lederman

Dra. Nayara Cioffi Batagini

Aprovada em: 11/12/2017.

Dedicatória

Ao meu esposo, Igor Rafael Sincos, meu maior exemplo e razão de tudo.

Aos meus amados pais, Fausto Cesar e Thais, meus alicerces.

Agradecimentos

Agradeço ao caro Professor Doutor Ricardo Aun, cirurgião vascular do Hospital Israelita Albert Einstein e coorientador desta tese. Obrigada por me permitir fazer parte de sua equipe, pela receptividade e pelo suporte em tantas batalhas. Muito obrigada por sua confiança em meu trabalho e no meu esforço. Obrigada por compartilhar sua visão científica, sua experiência e, especialmente, sua generosidade em me proporcionar esta chance de crescimento pessoal e profissional. O senhor serve de inspiração constante em minha carreira. Meus agradecimentos são extensivos a sua digna esposa, Leilah Vilela Aun, por seu carinho e disponibilidade perenes.

Aos meus prezados orientadores, professores e estimados amigos, Prof. Dr. Oskar Kaufmann e Prof. Dr. Nelson Wolosker. Agradeço pela confiança e pelo crédito em mim depositados. Vocês são os responsáveis diretos por todos os aspectos desta tese. Foram fundamentais desde a formação das ideias, da aquisição do financiamento e na execução do projeto. Minha eterna gratidão por esses anos de convivência, nos quais vocês têm me ensinado a arte da pesquisa científica de qualidade.

Ao querido amigo e mentor, Prof. Dr. Nicos Labropoulos, por compartilhar seu conhecimento e apreço pela ciência.

Aos docentes e funcionários da Pós-Graduação *Stricto Sensu* pela excelência e dedicação à pesquisa.

Aos queridos colegas do curso de pós-graduação, em especial: Angela Mazzeo, Ananda Razzo Mei, Fernanda Ferraz, Marcela Balbo Russi, Camila Succi, Taisa Ferrari Marinho, Frederico Jacy Monteiro de Lima e Oren Smaletz, pelo apoio mútuo e companheirismo. Sem vocês, tudo teria sido mais difícil.

Agradeço aos meus queridos amigos-irmãos, Dr. Felipe Coelho Neto e Dr. Manoel Lobato, pelo exemplo de comprometimento e pela troca de experiências.

Meu muitíssimo obrigada aos estagiários da Clínica Endovascular SP e do Hospital Israelita Albert Einstein, em especial a Raquel Leal, Andrea Klepacz e Matheus Cavichioli, pelo valioso auxílio e participação nas cirurgias.

À Vitoria Penido, aluna da Graduação da Faculdade de Medicina do Hospital Israelita Albert Einstein, por seu entusiasmo na iniciação científica. Agradeço aos colegas de equipe do Serviço de Cirurgia Vascular do Hospital Israelita Albert Einstein, em especial aos Doutores Alex Lederman, Fernando Saliture, Boulanger

Mioto Netto, Igor Rafael Sincos, Vinicius Bertoldi, Bruno Donegá Constantin, Adjaldes Moraes e Aline Bigatão Simplício, pela amizade e parceria.

À Professora Doutora Katia Leite, patologista responsável pelo estudo histológico desta tese.

À Prezada Elivane Vitor, profissional responsável pela metodologia estatística deste estudo.

Às médicas veterinárias Valéria Vieira Chida e Luciana Cintra, e a toda equipe de colaboradores do CETEC do Hospital Israelita Albert Einstein, pela dedicação e cuidado com os animais utilizados neste estudo.

Aos meus sogros, Dr. Davi e Maria Cristina, meu sincero agradecimento pela preocupação e suporte.

Aos meus irmãos Cassiano Ricardo, Thatianna, Guilherme e Ilana Cristina, meu muito obrigado pelo incentivo e admiração mútuos.

À Deus, por me permitir seguir sempre em frente e pelas incontáveis bênçãos em minha vida.

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	xi
Lista de abreviaturas e símbolos	xii
Resumo	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos.....	3
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
3 MÉTODOS	6
3.1 Procedimentos anestésicos e perioperatórios	6
3.2 Técnica cirúrgica	8
3.3 Avaliação do procedimento	11
3.4 Coleta de amostras	11
3.4.1 Biópsia renal.....	11
3.4.2 Dados dopplerfluxométricos	12
3.5 Análise histológica.....	13
3.6 Análise dopplerfluxométrica.....	15
3.7 Análise estatística.....	16
3.8 Aspectos éticos	17
4 RESULTADOS	18
4.1 Resultados da análise dopplerfluxométrica	18
4.2 Resultado da análise histológica	22
4.2.1 Análise da presença de lesões por tipo	22
4.2.2 Avaliação da presença de lesões nas biópsias	28
5 DISCUSSÃO	33
5.1 Limitações	41
6 CONCLUSÃO.....	42
7 ANEXOS.....	43
8 REFERÊNCIAS	45
Abstract	
Apêndices	

Lista de figuras

Figura 1. Animal anestesiado sob ventilação assistida no Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia do Hospital Israelita Albert Einstein.....	7
Figura 2. Punção de artéria femoral direita para monitorização de pressão arterial invasiva.....	8
Figura 3. Dissecção do hilo renal e reparo das estruturas.....	9
Figura 4. Doppler intraoperatório para análise do fluxo renal com aferição do índice de resistência, índice de pulsatilidade e análise do padrão espectral	10
Figura 5. Doppler intraoperatório no tempo zero evidenciando fluxo adequado com boa perfusão renal.....	10
Figura 6. Coleta de biópsia renal com lâmina de bisturi frio	12
Figura 7. (A) Alterações degenerativas tubulares; (B) cilindros pigmentados; (C) congestão vascular e edema; (D) infiltrado neutrofílico intersticial; (E) hemorragia intersticial.....	14
Figura 8. Em (A) fluxo renal ao Doppler pulsado com padrão espectral de baixa resistência (índice de resistência $<0,70$) e padrão de alta resistência (fluxo reverso), em (B).....	15
Figura 9. Valores médios ajustados e intervalos de confiança para o índice de resistência nos Grupos A e AV	19
Figura 10. Valores médios ajustados e intervalos de confiança para o índice de pulsatilidade nos Grupos A e AV	21
Figura 11. Número de biópsias com presença de congestão vascular e edema.....	23
Figura 12. Número de biópsias com presença de infiltrado inflamatório intersticial.....	24
Figura 13. Número de biópsias com presença de alterações degenerativas de células tubulares.....	25
Figura 14. Número de biópsias com presença de cilindros pigmentados	26
Figura 15. Número de biópsias com hemorragia intersticial	27
Figura 16. Proporção de biópsias com presença de lesão	29
Figura 17. Proporções estimadas de lesão e intervalos de confiança de 95%	30
Figura 18. Imagem ecográfica ao Modo B (A), Doppler colorido (B e C) e Doppler de potência (D), mostrando o exato momento da trombose renal do rim não isquêmico ...	36

Figura 19. Doppler de potência, mais sensível que o Doppler em cores, para confirmação de ausência de fluxo após clampeamento do hilo esquerdo.....	37
Figura 20. Aumento do índice de resistência ($=0,89$) do rim direito, aos 40 minutos de isquemia do rim contralateral.....	38
Figura 21. Clampeamento somente da artéria renal esquerda, no Grupo A	39

Lista de tabelas

Tabela 1. Valores médios ajustados e erros padrão para o índice de resistência no rim não isquêmico	18
Tabela 2. Resultados das comparações múltiplas para índice de resistência no rim não isquêmico de acordo com tipo de clampeamento.....	19
Tabela 3. Valores médios ajustados e erros padrão do índice de pulsatilidade no rim não isquêmico	20
Tabela 4. Resultados das comparações múltiplas para índice de pulsatilidade no rim não isquêmico, de acordo com o tipo de clampeamento.....	20
Tabela 5. Presença de congestão vascular e edema nas biópsias realizadas nos rins isquêmicos e não isquêmicos, de acordo com o tipo de clampeamento	23
Tabela 6. Distribuição da presença de infiltrado inflamatório intersticial nas biópsias realizadas nos rins isquêmicos e não isquêmicos, de acordo com o tipo de clampeamento	24
Tabela 7. Presença de alterações degenerativas de células tubulares nas biópsias realizadas nos rins isquêmicos e não isquêmicos, de acordo com o tipo de clampeamento	25
Tabela 8. Presença de cilindros pigmentados nas biópsias realizadas nos rins isquêmicos e não isquêmicos, de acordo com o tipo de clampeamento	26
Tabela 9. Número de biópsias com hemorragia intersticial nos rins isquêmicos e não isquêmicos, de acordo com o tipo de clampeamento	27
Tabela 10. Presença de qualquer lesão nas biópsias realizadas nos rins isquêmicos e não isquêmicos, de acordo com o tipo de clampeamento	30
Tabela 11. Comparações múltiplas entre momentos quanto à presença de lesões nos rins isquêmicos e não isquêmicos, de acordo com o tipo de clampeamento	31
Tabela 12. Comparações múltiplas entre grupos quanto à presença de lesões nos rins isquêmicos e não isquêmicos, de acordo com o tipo de clampeamento	32

Lista de abreviaturas e símbolos

µg	Microgramas
µm	Micrômetros
AAALAC	Associação Americana para Acreditação e Cuidados de Animais de Laboratório (<i>Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care</i>)
ATP	Adenosina-trifosfato
CETEC	Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia
CEUA	Comissão de ética na utilização de animais
cm ³	Centímetros cúbicos
EEG	Equação de estimação generalizada
EROS	Espécies reativas de oxigênio
Fe ⁺⁺	Ferro sérico
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Grupo A	Grupo com clampeamento arterial
Grupo AV	Grupo com clampeamento arterial e venoso
HE	Hematoxilina-eosina
IP	Índice de pulsatilidade
IR	Índice de resistência
IRA	Insuficiência renal aguda
Kg	Quilogramas
LIM	Laboratório de Investigação Médica número 55 (Urologia)
mg	Miligramas
MHz	Megahertz
min	Minutos
NTA	Necrose tubular aguda
P	Valor-p utilizado na análise estatística
PAI	Pressão arterial invasiva
TA	Tempo de aceleração
UI	Unidades internacionais
VDF	Velocidade diastólica final
VPS	Velocidade de pico sistólico

Resumo

Introdução: A instalação da insuficiência renal aguda pós-isquêmica correlaciona-se diretamente com o tempo de intervenção cirúrgica, gravidade da patologia instalada e complexidade do procedimento. Na prática clínica, a insuficiência renal aguda pré-renal relacionada a procedimentos cirúrgicos é agravada pela reperfusão. Estudos experimentais têm demonstrado que a isquemia renal pode estar associada ao surgimento de lesões leves a moderadas em órgãos à distância, tais como fígado, pulmão, coração e cérebro, num mecanismo conhecido como *organ crosstalk*. Considerando-se a importância clínica dos pacientes com insuficiência renal aguda, decidimos estudar a relação entre as alterações morfológicas e estruturais sofridas pelo rim em diferentes tempos de isquemia, e diferentes tipos de clampeamento, com o uso do Doppler vascular tanto do rim ipsilateral quanto do contralateral à lesão.

Objetivo: Analisar os possíveis efeitos da isquemia no rim contralateral, em diferentes tipos de clampeamento e identificar parâmetros ecográficos ao Doppler capazes de prever o grau de lesão renal.

Métodos: O estudo experimental foi conduzido com 18 suínos divididos randomicamente em dois grupos de trabalho: Grupo A; no qual foi realizado clampeamento unilateral da artéria renal esquerda. O rim direito (contralateral) foi mantido não isquêmico. Grupo AV; no qual houve clampeamento unilateral envolvendo a artéria e a veia renal esquerda. O rim direito foi mantido não isquêmico. Após o clampeamento dos vasos, todos os animais foram submetidos a biópsias e mapeamentos com Doppler vascular em intervalos no tempo 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 minutos. Além disso, após 30 e 60 minutos de reperfusão (120 e 150 minutos de procedimento cirúrgico total), nova avaliação dopplerfluxométrica e biópsia foram realizadas. Os tecidos foram submetidos à análise histopatológica por microscopia óptica e os dados encontrados comparados com os parâmetros de Doppler vascular registrados no intraoperatório: índice de resistência e índice de pulsatilidade.

Resultados: A análise dopplerfluxométrica do rim contralateral não isquêmico mostrou elevação acima dos valores normais de referência do índice de resistência e índice de pulsatilidade no Grupo A, a partir de 30 minutos ($p < 0,001$) de isquemia. O clampeamento da artéria e veia renal simultaneamente está relacionado a um menor número de alterações histológicas e ausência de trombose. Quanto à proporção de lesões ao longo do tempo, houve aumento significativo tanto no rim isquêmico quanto no rim não isquêmico, em ambos os grupos, independente do tipo de

clameamento. **Conclusão:** A avaliação do índice de resistência e índice de pulsatilidade do rim contralateral à isquemia é um elemento útil na previsão da instalação de dano renal. O rim não isquêmico sofre de forma aguda em decorrência da isquemia contralateral e o tipo de clameamento do hilo parece ter influência sobre o fenômeno de *crosstalk*, representado pela piora da perfusão, aumento do índice de resistência e índice de pulsatilidade, e tendência a trombose.

1 INTRODUÇÃO

A insuficiência renal aguda (IRA) é definida como uma rápida diminuição na taxa de filtração glomerular que pode ocorrer em um período de minutos a dias. As causas de lesão renal aguda são divididas em três categorias: pré-renal, pós-renal (ou obstrutiva) e intrínseca (renal).⁽¹⁾

A lesão pré-renal é considerada uma resposta funcional à hipoperfusão, na qual a estrutura do rim é preservada.⁽¹⁾ Quando a pressão de perfusão cai abaixo da capacidade autorregulatória do rim, vasoconstritores endógenos aumentam a resistência arteriolar local, levando a uma diminuição na taxa de filtração glomerular, o que resulta em insuficiência renal pré-renal.⁽²⁾

Na prática clínica, a lesão renal pré-renal é seguida da reperfusão, que ocorre principalmente em quadros clínicos de hipotensão e sepse, assim como em procedimentos cirúrgicos tais como: nefrectomia parcial, transplantes renais, cirurgias de revascularização do miocárdio e cirurgias vasculares.⁽³⁾

Nestas cirurgias, a interrupção do fluxo sanguíneo renal é um procedimento adotado rotineiramente.⁽⁴⁾ Nelas, o tempo de clampeamento pode levar a lesões isquêmicas irreversíveis do parênquima renal.⁽⁵⁾ A lesão isquêmica do rim geralmente resulta em dano às células do néfron e das células da vascularização renal, levando à IRA que só é diagnosticada quando essas perturbações fisiopatológicas atingem um grau suficiente para manifestar anormalidades bioquímicas na circulação (elevação de ureia e creatinina).⁽⁶⁾

Após a finalização da manobra cirúrgica, o fluxo sanguíneo é restabelecido e a reperfusão renal, neste cenário, intensifica as lesões causadas pela isquemia por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), da ocorrência de desarranjo celular, hipercoagulabilidade e congestão da microcirculação.⁽⁷⁻¹¹⁾

Em geral, a IRA derivada de procedimentos cirúrgicos apresenta caráter transitório, mas, pode evoluir para doença renal definitiva, de acordo com a gravidade e a duração da lesão que está diretamente relacionada com o tempo de isquemia.^(4,12) O tempo de clampeamento renal seguro ainda é controverso e não há dados suficientes na literatura que avaliem o comportamento e a participação do rim contralateral à isquemia, na instalação da necrose tubular aguda (NTA). Estudos

experimentais têm demonstrado que a IRA pode estar associada ao surgimento de lesões leves a moderadas em órgãos à distância, tais como fígado, pulmão e cérebro.⁽¹³⁾

O dano renal gerado pela hipóxia é caracterizado por apoptose e necrose das células epiteliais tubulares. Isso é capaz de gerar ativação do sistema imune, induzindo infiltração local do tecido por células inflamatórias e aumento concomitante da produção de citocinas, neutrófilos e macrófagos. A perda aguda das células epiteliais tubulares, ricas em mitocôndrias, eletrólitos como o cálcio (Ca^{++}) e oligoelementos como o ferro sérico (Fe^{++}), acarreta um desequilíbrio bioquímico local. Esses efeitos locais podem provocar uma reação sistêmica, resultando em sequelas a órgãos distantes. Esse processo é chamado *kidney-organ crosstalk* (interferência entre órgãos), e já foi demonstrado em estudos experimentais prévios, com lesões a distância no pulmão, coração, cérebro, fígado, baço e vísceras.⁽¹³⁻¹⁵⁾ Essas lesões são mais comumente caracterizadas por infiltração de células imunes e alteração da permeabilidade microvascular, levando ao edema e finalmente à morte celular.

Há muitos estudos que demonstraram que a lesão renal aguda pode levar a um risco aumentado de falência respiratória, lesão hepática aguda e deterioração das funções cardíacas e cerebrais.⁽¹³⁻¹⁶⁾ Entretanto, ainda não há estudos que tenham avaliado o fenômeno do *kidney-kidney crosstalk*, isto é, se o efeito da cascata de inflamação, ativação leucocitária e estresse oxidativo da reperfusão renal podem ocasionar dano ao rim contralateral, através do Doppler vascular.

Outro tema controverso, sem consenso na literatura, é a relação entre o risco de lesão renal de acordo com o tipo de clampeamento realizado: apenas interrupção do fluxo arterial *versus* clampeamento arterial e venoso no rim ipsilateral ao procedimento.^(17,18)

O uso do Doppler vascular é um recurso bem estabelecido para avaliação circulatória do território renal, principalmente para análise e acompanhamento de enxertos e de sua viabilidade.^(19,20) Nas últimas décadas, a Ecografia bidimensional (Modo B), em combinação com o Doppler colorido e espectral tornou-se o método de diagnóstico por imagem de escolha para a avaliação de enxertos renais, uma vez que é um recurso barato, não-invasivo, facilmente executável e que permite o diagnóstico precoce de complicações que ameacem o rim. Os parâmetros espectrais mais utilizados na avaliação renal incluem a velocidade de pico sistólico da onda (VPS), tempo de aceleração (TA), índice de resistência (IR) e índice

de pulsatilidade (IP).^(19,21) Uma artéria renal normal apresenta fluxo sistólico e diastólico positivos (acima da linha de base) devido à baixa resistência vascular distal. O Doppler espectral pode apresentar um IR elevado em casos de disfunção do enxerto renal ou em doenças parenquimatosas, pois o aumento do IR resulta de diferentes causas de edema intersticial. Medidas seriadas do IR podem ser úteis para estabelecer padrões de piora de uma lesão ou, ainda, monitorizar intervenções terapêuticas, quando estudamos o território renal. Apesar do IR não ser capaz de identificar qual a causa da disfunção do rim, um IR normal no pós-operatório imediato é um elemento preditivo de função renal adequada.^(21,22) O ultrassom Doppler já foi realizado em diversos modelos experimentais animais (coelhos, suínos e cães) que buscavam identificar alterações precoces de perfusão do rim.^(20,23-26) O IR foi o único parâmetro avaliado em grande parte destes estudos, dada a confiabilidade de suas medidas, uma vez que o IR não sofre interferência do ângulo Doppler. Em nosso estudo, a avaliação seriada do IR e IP procurou identificar possíveis alterações de perfusão no rim contralateral, um elemento ecográfico preditivo de desenvolvimento de IRA, além de analisar os efeitos dos diferentes tipos de clampeamento nos rins ipsi e contralateral à isquemia.

1.1 Objetivos

1. Avaliar as consequências da isquemia no rim contralateral ao clampeamento.
2. Analisar se há diferenças entre os diferentes tipos de clampeamento.
3. Identificar um marcador dopplerfluxométrico preditor do tempo seguro de isquemia correlacionando com os achados histológicos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A isquemia oriunda da hipoperfusão gera diminuição no aporte de oxigênio para as células renais, com consumo das reservas de energia em forma de adenosina-trifosfato (ATP). Em decorrência da hipóxia, há liberação de óxido nítrico, prostaglandinas e ocorrência de vasodilatação mediada pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona,⁽¹⁾ na tentativa de dirimir os efeitos da hipóxia celular e suas consequências.^(6,27) A alteração na hemodinâmica renal produz uma cascata de efeitos celulares, tais como: alteração na atividade das bombas de eletrólitos, com aumento das concentrações de cálcio e sódio intracelular, aumento na pressão osmótica e na reabsorção transepitelial de solutos. Essas alterações promovem edema celular, perda da função mitocondrial e geração de EROs, caracterizando a instalação da IRA.^(28,29) Uma vez iniciada a IRA, inúmeros mediadores inflamatórios são recrutados, promovendo dano tubular com invasão leucocitária do parênquima.^(6,10) As células tubulares sob condições isquêmicas podem não sofrer qualquer lesão, sofrer lesão e se recuperar, ou ainda, sofrer dano irreversível por necrose ou apoptose.^(30,31) A alteração mais frequentemente observada é a NTA e as áreas mais susceptíveis à necrose no tecido renal são a alça de Henle e o túbulo contorcido proximal.^(10,27,28) As células endoteliais renais podem, ainda, desenvolver propriedades trombogênicas devido à perda da capacidade antiaderente durante o quadro isquêmico, favorecendo a adesão leucocitária e plaquetária no advento da reperfusão.^(28,32) Há inúmeros estudos na literatura que correlacionam a cascata inflamatória da isquemia renal com o aparecimento de lesões em órgãos à distância, tais como pulmão, fígado, cérebro e coração.^(13,15,29) Essas lesões seriam decorrentes da interferência do rim isquêmico nos demais órgãos, e já foi demonstrada em trabalhos experimentais prévios.^(16,33,34)

Na prática cirúrgica é comum a indução de isquemia renal transitória, entretanto, não há consenso sobre o intervalo de tempo adequado para prevenir os efeitos danosos da isquemia.^(32,35) Conforme estudo publicado por Simmons et al.,⁽³⁾ 30 minutos de isquemia parece ser um tempo seguro para preservar a função renal pós-operatória, quando a função renal prévia ao procedimento é normal. Mir et al.,⁽³⁶⁾ entretanto, acreditam que o uso do tempo de isquemia (25-30 minutos) como elemento preditivo da instalação de IRA possui limitações. Os autores sugerem que a qualidade e a quantidade de parênquima renal preservados são mais fidedignos

na previsão da função renal final, após nefrectomia parcial, do que o tempo de clampeamento do pedículo vascular. Além disso, ainda há controvérsias sobre qual o melhor padrão de interrupção do fluxo sanguíneo intraoperatório, na prevenção de IRA: somente arterial, permitindo fluxo venoso retrógrado e alguma perfusão renal; ou arterial e venoso, com obstrução total ao fluxo da região irrigada e menor chance de hemorragia.^(17,18,37-42)

O uso do Doppler vascular para análise da perfusão renal e para controle da função de enxertos renais é bem estabelecida.^(21,23,43-47) Os parâmetros dopplerfluxométricos tais como IR, IP, padrão de onda espectral e TA fornecem informações bastante fidedignas de como se comporta a perfusão renal e se há algum obstáculo à vascularização adequada do parênquima.^(19,20,25,48-50) Yoon et al.,⁽²⁰⁾ por exemplo, demonstraram em um modelo experimental com coelhos que alterações no IR precederam o aumento no nível da creatinina sérica no curso de IRA reversível.

3 MÉTODOS

O estudo foi realizado no Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia (CETEC) do Hospital Israelita Albert Einstein, acreditado pela Associação Americana para Acreditação e Cuidados com Animais de Laboratório (AAALAC - *Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care*), entre janeiro de 2016 e dezembro de 2016.

O modelo animal foi desenvolvido com 18 suínos da raça Large White. Os animais eram jovens, fêmeas, com idade que variou entre de 3-4 meses e com peso entre 29 a 35kg.

Os animais foram divididos em dois grupos, com nove suínos em cada (AV e A). No Grupo AV foi realizado clampeamento da artéria e veia, no hilo renal esquerdo, e nenhum clampeamento no rim contralateral (direito). No Grupo A, foi realizado clampeamento somente da artéria renal no hilo esquerdo e nenhum clampeamento no rim contralateral (direito). A partir daí, foram realizadas biópsias e análises ecográficas seriadas no tempo zero e a cada 10 minutos, de ambos os rins, num total de 90 minutos de isquemia. Após a isquemia, foi realizada a mesma análise (ecográfica e histológica) aos 30 e 60 minutos de reperfusão (tempo cirúrgico total de 120 e 150 minutos).

O experimento teve um tempo de duração total que variou entre 2,5-3,5 horas, o qual englobou 90 minutos de isquemia e, pelo menos, 30 minutos de reperfusão. Esses valores foram adotados porque os modelos animais, tanto em cães como suínos, apresentam uma maior tolerância à isquemia renal e o mecanismo de injúria por isquemia é deflagrado mais tardiamente do que no ser humano. Além disso, as alterações morfológicas da reperfusão são percebidas mais tardiamente.⁽⁵¹⁾

3.1 Procedimentos anestésicos e perioperatórios

O procedimento anestésico foi realizado sob supervisão de uma médica veterinária. Todos os animais foram previamente anestesiados com injeção intramuscular de Ketamina (10,0mg/kg) e Midazolan (0,25mg/kg), misturados na mesma seringa. Passados 15 minutos da injeção, a veia marginal da orelha foi cateterizada com cateter de calibre 20 ou 22 (BD Insytem, Becton Therapy Systems

Inc., Estados Unidos da América), para servir de acesso venoso para a indução anestésica, que foi realizada com Tiopental 7mg/kg. A reposição hídrica de jejum foi calculada de acordo com o protocolo: dose de manutenção de 10mL/kg/h de cristaloide durante a operação, e 2mL/kg/h de cristaloide em infusão rápida, no início da cirurgia e sempre que a pressão arterial média caiu abaixo do valor mínimo estipulado de 70mmHg. Foram utilizados tubos endotraqueais tamanho 6,5 a 8,5 (Portex[®]) para a intubação dos animais (Figura 1). A anestesia foi mantida inalatória com Isoflurano 2%. Para ventilação, mantivemos um volume corrente de 10mL/kg, ajustado conforme parâmetros fisiológicos necessários. A analgesia foi mantida com Fentanil, com dose inicial de 2,5µg/kg.

Figura 1. Animal anestesiado sob ventilação assistida no Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia do Hospital Israelita Albert Einstein

As funções vitais e os parâmetros fisiológicos de respiração foram mantidos durante a ventilação mecânica. A frequência cardíaca e pressão arterial invasiva foram avaliadas continuamente durante o procedimento, após acesso em artéria femoral comum direita guiada por ultrassonografia⁽⁵¹⁾ (Figura 2). Todos os animais receberam 150UL/kg de Heparina não fracionada sistêmica, antes do clampeamento do hilo renal. Apesar do uso de heparina em cirurgias urológicas ser controverso, nosso protocolo seguiu heparinização sistêmica devido ao potencial

trombogênico desses animais, constatado em estudos experimentais prévios.^(52,53) O uso de drogas vasoativas foi proscrito para evitar interferências no fluxo e na análise ecográfica. Hipotensão foi manejada apenas com reposição volêmica. Após o término da operação e coleta dos dados, ainda sob anestesia geral, os animais foram submetidos à eutanásia com overdose de Thiopental e Cloreto de Potássio 19,1% endovenoso (dose de 15-30mg/kg).

Figura 2. Punção de artéria femoral direita para monitorização de pressão arterial invasiva

3.2 Técnica cirúrgica

Com o animal anestesiado na posição de decúbito dorsal horizontal, realizou-se a higienização local e colocação dos campos cirúrgicos com técnica não estéril. Todos os animais foram submetidos à monitorização hemodinâmica com PA invasiva. Os animais foram divididos em dois grupos:

- **Grupo AV:** Total de nove animais com clampeamento unilateral de artéria e veia renal esquerdas. Rim direito foi mantido não isquêmico.

- **Grupo A:** Total de nove animais com clampeamento unilateral da artéria renal esquerda. Rim direito foi mantido não isquêmico.

Efetuuou-se laparotomia xifopúbica mediana e acesso ao retroperitônio com mobilização das alças. Após dissecação e reparo dos vasos renais (Figura 3), bilateralmente, registrou-se a aferição do diâmetro da artéria renal (valor

médio de 3-4mm) e padrão do fluxo renal ao Doppler, no tempo zero, para descartar qualquer alteração prévia (Figuras 4 e 5). Após a certificação de que ambos os rins eram morfológicamente adequados para análise, sem atrofias e com volume máximo de 12cm³, efetuou-se biópsia no tempo zero, em ambos os rins. A seguir, realizamos clampeamento do hilo renal esquerdo com clampe vascular tipo *bulldog* e o direito permaneceu não isquêmico. A partir daí, foram realizadas biópsias seriadas pareadas do parênquima renal e análise ecográfica com Doppler da artéria renal (primeiro ramo segmentar) nos tempos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 minutos, em ambos os rins.

Em vermelho, a artéria renal; em azul, a veia renal; e em branco, a pelve renal.
Figura 3. Dissecção do hilo renal e reparo das estruturas

isquemia também foi biopsiado e ecografado nos tempos 30 e 60 minutos da reperfusão. As biópsias foram realizadas delicada e randomicamente, de forma pareada (polo superior direito com polo superior esquerdo, polo inferior direito com polo inferior esquerdo e assim por diante) com lâmina de bisturi número 11 e exérese de pequeno segmento do parênquima renal, medindo em torno de 0,5cm³. Esse segmento biopsiado foi mantido em solução de formaldeído 10% para posterior confecção das lâminas e análise histológica.

3.3 Avaliação do procedimento

Foram inicialmente contabilizados 18 animais. Entretanto, um animal foi excluído por óbito devido a uma complicação anestésica, não relacionada ao experimento, e os grupos ficaram assim divididos:

- **Grupo A:** oito animais operados.
- **Grupo AV:** nove animais operados.

3.4 Coleta de amostras

3.4.1 Biópsia renal

As biópsias foram realizadas utilizando-se lâmina de bisturi frio para coleta de amostras em formato cuneiforme (Figura 6). O material foi armazenado individualmente em tubos do tipo Falcon contendo solução de formol 10% e mantidos a temperatura ambiente até seu processamento no Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Urologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM55 – FMUSP).

Figura 6. Coleta de biópsia renal com lâmina de bisturi frio

3.4.2 Dados dopplerfluxométricos

Utilizou-se aparelho de ultrassom Philips HD7 e transdutor linear com frequência entre 7 e 11MHz, para análise aos modos Bidimensional, Doppler Colorido, Doppler pulsado e Doppler de potência. O transdutor foi posicionado diretamente sobre o hilo renal de interesse, utilizando-se o próprio parênquima renal como janela acústica. As artérias e veias renais foram analisadas quanto à morfologia, diâmetro e padrão do fluxo, bilateralmente, antes de realizarmos qualquer manobra de isquemia. O registro da análise ecográfica ao Doppler colorido e pulsado foi realizado no tempo zero para descartarmos qualquer alteração prévia, com o transdutor no sentido do eixo longitudinal do vaso e a amostra posicionada bem no centro do vaso. O Doppler de potência foi utilizado sempre que precisamos confirmar ausência de fluxo, pois é mais sensível que o Doppler em cores.

3.5 Análise histológica

Foram enviados para estudo anatomopatológico os fragmentos coletados da região cortical do parênquima renal, durante a isquemia e após a reperfusão. As biópsias foram processadas de modo habitual e incluídas em parafina. Cortes de 3µm foram corados pela hematoxilina-eosina (HE). Como as amostras foram coletadas em períodos muito próximos em relação ao tempo de isquemia, as alterações histológicas observadas foram muito discretas, necessitando de método mais objetivo para sua observação. Para isso, as lâminas foram fotografadas em microscópio óptico (NIKON®) e as diferenças histológicas entre os grupos analisadas em sistema de imagem J-Image. Considerando que a NTA é a alteração mais frequentemente relacionada à isquemia, avaliamos:⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾

1. Alterações degenerativas de células tubulares.
2. Presença de cilindros pigmentados (depósito proteico).
3. Congestão vascular e vacuolização de células tubulares (edema)
4. Infiltrado neutrofílico intersticial.
5. Hemorragia intersticial (Figura 7).

Figura 7. (A) Alterações degenerativas tubulares; (B) cilindros pigmentados; (C) congestão vascular e edema; (D) infiltrado neutrofílico intersticial; (E) hemorragia intersticial

Os casos foram classificados qualitativamente de acordo com a presença da lesão em: ausência de lesão: (0); presença de lesão: (1).

3.6 Análise dopplerfluxométrica

A análise dopplerfluxométrica foi realizada em ambos os hilos renais, durante o clampeamento e após sua liberação. Tais registros foram repetidos a cada 10 minutos, até que se completassem 90 minutos de isquemia. E nova análise com coleta de dados, nos tempos 30 e 60 minutos pós-reperfusão. Os parâmetros espectrais utilizados para avaliação da perfusão renal incluíram o IR e IP. O IR e IP foram calculados automaticamente pelo *software* do aparelho de ultrassom e os valores considerados envolveram 2 casas decimais. Foi considerado normal o IR menor que 0,70 e elevado quando maior ou igual a 0,70. Foi considerado normal o IP menor que 1,20 e elevado quando maior ou igual a 1,20 (Figura 8).^(44,46) Esses valores foram estipulados levando-se em consideração os valores médios basais para esse grupo de animais e os valores normais para a espécie humana. Nos casos em que os valores de base de IR e IP extrapolassem a média e desvio padrão do grupo (por exemplo um IR <0,35), os animais seriam descartados da análise. O fluxo da veia renal foi considerado adequado quando apresentou padrão monofásico, de baixa velocidade, com fasicidade respiratória mínima, compatível com função cardíaca preservada. O ganho da cor foi mantido de forma a minimizar ruídos e artefatos de movimento, em torno de 50, sem interferir na detecção de fluxos baixos. O Doppler pulsado utilizou escala média de 3,8MHz. Finalmente, o filtro de parede foi mantido em nível baixo, para otimizar o registro de pequenas velocidades.^(49,57)

Figura 8. Em (A) fluxo renal ao Doppler pulsado com padrão espectral de baixa resistência (índice de resistência <0,70) e padrão de alta resistência (fluxo reverso), em (B)

3.7 Análise estatística

As variáveis categóricas foram descritas por frequências absolutas e porcentagens e as numéricas por médias, desvios padrão e valores mínimos e máximos.

A distribuição dos dados foi estudada por meio de histogramas e *boxplots* e para a análise inferencial dos dados ecográficos foram aplicados modelos mistos com distribuição normal e estrutura de correlação autorregressiva de primeira ordem. Nestes modelos consideramos como variáveis explicativas o grupo de estudo e o momento de avaliação, além do efeito de interação entre grupo e momento.

Os resultados foram apresentados por valores médios ajustados e erros padrão, além de gráficos com intervalo de confiança de 95%, e os valores-p obtidos nas comparações múltiplas entre os momentos de avaliação e entre grupos foram corrigidos pelo método de Bonferroni sequencial.

Foi aplicado o teste exato de Fisher para investigar associação entre grupo de tipo de clampeamento e ocorrência de trombose. As análises foram realizadas com o programa SPSS (IBM Corp, 2016), considerando nível de significância 5%.

A presença de lesões nas biópsias realizadas nos momentos basal e após o clampeamento foi avaliada por um modelo de equações de estimação generalizadas (EEG), considerando a correlação entre as medidas em um mesmo animal em diferentes momentos de avaliação, entre os rins direito e esquerdo de um mesmo animal e entre as diferentes investigações de lesões.⁽³⁷⁾ Este modelo considera a distribuição binomial. As variáveis explicativas foram o grupo de estudo, o momento de avaliação e o efeito de interação entre grupo e momento.

Os resultados foram apresentados por proporções estimadas e erros padrão, além de intervalos de confiança de 95%. Nos casos de comparações múltiplas os valores-p foram corrigidos pelo método de Bonferroni sequencial. As análises foram realizadas com o programa SPSS (IBM Corp, 2016), considerando nível de significância 5%.

3.8 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein e pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA), número 2749-16 (Anexo 1). Foram rigorosamente adotadas e seguidas as recomendações e normatizações prescritas pelo Decreto 6.899, datado de 15 de julho de 2009, para uso de animais em experimentos científicos e para proteção desses animais.

4 RESULTADOS

4.1 Resultados da análise dopplerfluxométrica

Foram avaliados 17 animais no total, oito do Grupo A e nove no Grupo AV. Todos os clampeamentos foram realizados nos rins à esquerda e os rins contralaterais (à direita) foram mantidos como não isquêmicos. No apêndice A apresentamos a descrição numérica e gráfica do IR e de pulsatilidade nos momentos de avaliação basal e após o clampeamento, segundo o grupo (A ou AV).

A avaliação do efeito do clampeamento no valor do IR por meio de modelo misto mostra que há efeito de interação entre grupo e momento ($p < 0,001$), ou seja, há evidências de que a variação no IR ao longo do tempo dependa do grupo de estudo. Como há interação, a comparação entre os grupos deve ser feita separadamente por momento e a comparação entre os momentos deve ser feita separadamente por grupo. Os valores médios ajustados pelo modelo são apresentados na tabela 1 e as comparações múltiplas corrigidas pelo método de Bonferroni sequencial na tabela 2.

Tabela 1. Valores médios ajustados e erros padrão para o índice de resistência no rim não isquêmico

Momento (minutos)	Tipo de clampeamento	
	Grupo A (n=8)	Grupo AV (n=9)
Basal	0,523 (0,054)	0,562 (0,052)
10	0,564 (0,059)	0,576 (0,057)
20	0,591 (0,056)	0,597 (0,054)
30	0,730 (0,053) *†	0,602 (0,051)
40	0,739 (0,052) *†	0,605 (0,050)
50	0,768 (0,051) *†	0,616 (0,049)
60	0,765 (0,059) †	0,626 (0,056)
70	0,724 (0,060) †	0,665 (0,057)
80	0,723 (0,064) †	0,649 (0,061)
90	0,749 (0,062) †	0,639 (0,060)

* Diferença entre grupos; † diferença em relação ao momento basal, dentro do mesmo grupo; Grupo A: clampe arterial; Grupo AV: clampe arterial e venoso.

Tabela 2. Resultados das comparações múltiplas para índice de resistência no rim não isquêmico de acordo com tipo de clameamento

Momento (minutos)	Comparação entre grupos	Comparação com momento basal no Grupo A Valor-p	Comparação com momento basal no Grupo AV Valor-p
Basal	0,543	--	--
10	0,865	0,317	0,710
20	0,930	0,131	0,621
30	0,041	<0,001	0,528
40	0,031	<0,001	0,511
50	0,013	<0,001	0,378
60	0,057	<0,001	0,488
70	0,425	<0,001	0,091
80	0,353	<0,001	0,387
90	0,157	<0,001	0,470

Grupo A: clampe arterial; Grupo AV: clampe arterial e venoso.

Comparando a avaliação basal aos demais momentos no Grupo A em relação ao IR, foram encontradas evidências de diferenças a partir de 30 minutos. No Grupo AV, não observamos evidências de diferenças significativas entre os momentos, apesar de termos observado um acréscimo nos valores, sendo a média estimada no momento basal de 0,562 e aos 90 minutos de 0,639.

A comparação entre os grupos nos diferentes momentos mostra evidências de diferenças entre 30, 40 e 50 minutos (Tabela 2 e Figura 9).

Figura 9. Valores médios ajustados e intervalos de confiança para o índice de resistência nos Grupos A e AV

A avaliação do efeito de clampeamento no valor do IP por meio de modelo misto mostra que há efeito de interação entre grupo e momento ($p=0,014$), ou seja, há evidências de que a variação no IP ao longo do tempo dependa do grupo de estudo. Como há interação, a comparação entre os grupos deve ser feita separadamente por momento e a comparação entre os momentos deve ser feita separadamente por grupos. Os valores médios ajustados pelo modelo são apresentados na tabela 3 e as comparações múltiplas corrigidas pelo método de Bonferroni sequencial na tabela 4.

Tabela 3. Valores médios ajustados e erros padrão do índice de pulsatilidade no rim não isquêmico

Momento (minutos)	Tipo de clampeamento	
	Grupo A (n=8)	Grupo AV (n=9)
0	0,841 (0,123)	0,808 (0,116)
10	0,866 (0,132)	0,820 (0,125)
20	0,834 (0,090)	0,950 (0,085)
30	1,229 (0,093) *†	0,970 (0,088)
40	1,264 (0,085) *†	0,976 (0,081)
50	1,275 (0,096) *†	0,980 (0,090)
60	1,239 (0,081) †	1,074 (0,077)
70	1,176 (0,128)	1,212 (0,121)
80	1,070 (0,126)	1,197 (0,119)
90	1,204 (0,144)	1,164 (0,136)

* Diferença entre grupos, † diferença em relação ao momento basal, dentro do mesmo grupo. Grupo A: clampe arterial; Grupo AV: clampe arterial e venoso.

Tabela 4. Resultados das comparações múltiplas para índice de pulsatilidade no rim não isquêmico, de acordo com o tipo de clampeamento

Momento (minutos)	Comparação entre grupos	Comparação com momento basal no Grupo A	Comparação com momento basal no Grupo AV
	Valor-p	Valor-p	Valor-p
Basal	0,843	--	--
10	0,799	>0,99	0,934
20	0,347	>0,99	0,710
30	0,044	0,015	0,710
40	0,015	0,005	0,710
50	0,026	0,007	0,710
60	0,142	0,007	0,122
70	0,839	0,156	0,054
80	0,465	0,402	0,059
90	0,843	0,156	0,152

Grupo A: clampe arterial; Grupo AV: clampe arterial e venoso.

Comparando a avaliação basal aos demais momentos no Grupo A em relação ao IP, foram encontradas evidências de diferenças entre 30, 40, 50 e 60 minutos. No Grupo AV não observamos evidências de diferenças significativas entre os momentos, apesar de termos observado um acréscimo nos valores, sendo a média estimada no momento basal de 0,808 e aos 90 minutos de 1,164. A comparação entre os grupos nos diferentes momentos mostra evidências de diferenças entre 30, 40 e 50 minutos de isquemia (Figura 10).

Figura 10. Valores médios ajustados e intervalos de confiança para o índice de pulsatilidade nos Grupos A e AV

Quando avaliados quanto à ocorrência de trombose arterial contralateral, não há evidências de diferenças entre os tipos de clampeamento ($p=0,082$). No Grupo A, três (37,5%) dos oito animais apresentaram trombose da artéria renal e no Grupo AV não houve trombose em nenhum dos suínos. Não foi observada trombose ipsilateral ao clampe em nenhum dos animais do estudo.

Quanto ao seguimento dos animais após liberação do clampe, no Grupo A ocorreram dois (25,0%) óbitos após 10 minutos de reperfusão, foram realizadas duas (25,0%) eutanásias após 30 minutos, observamos um (12,5%) óbito após 40 minutos e foi realizada eutanásia nos demais três animais (37,5%) após 60 minutos de reperfusão.

No Grupo AV foi realizada eutanásia em dois (22,2%) animais antes

do início da reperfusão e ocorreu um (11,1%) óbito após 30 minutos de reperfusão. Foi realizada eutanásia em quatro animais (44,4%) aos 30 minutos de reperfusão e aos 60 minutos nos dois (22,2%) animais restantes.

No apêndice B foram apresentados os dados dos IR e de pulsatilidade nos momentos de avaliação durante a reperfusão segundo o grupo de clampeamento. Devido ao pequeno número de animais avaliados aos 60 minutos de reperfusão não foi possível aplicar testes estatísticos.

4.2 Resultado da análise histológica

Foram analisados 16 animais, oito do Grupo A e oito do Grupo AV. O animal número 2 precisou ser excluído da análise histológica porque houve dano ao material durante armazenagem, o que impossibilitou a análise segura da lâmina. Importante salientar que o fato de um animal apresentar uma característica em um determinado momento não implica que apresente a característica em todos os momentos posteriores, já que o local da biópsia não é exatamente o mesmo.

4.2.1 Análise da presença de lesões por tipo

Nas tabelas 5 a 9 e figuras 11 a 15 foram apresentadas as distribuições da presença de determinada lesão nas biópsias realizadas nos diferentes momentos para rins isquêmicos e não isquêmicos (controles), por tipo de clampeamento.

Tabela 5. Presença de congestão vascular e edema nas biópsias realizadas nos rins isquêmicos e não isquêmicos, de acordo com o tipo de clampeamento

Momento (minutos)	Tipo de clampeamento			
	Grupo A (n=8)		Grupo AV (n=8)	
	Rim esquerdo (Isquêmico) n(%)	Rim direito (Não isquêmico) n(%)	Rim esquerdo (Isquêmico) n(%)	Rim direito (Não isquêmico) n(%)
0	5(62,5)	2(25,0)	2(25,0)	2(25,0)
10	8(100,0)	6(75,0)	2(25,0)	2(25,0)
20	8(100,0)	7(87,5)	4(50,0)	5(62,5)
30	8(100,0)	7(87,5)	4(50,0)	3(37,5)
40	8(100,0)	8(100,0)	5(62,5)	3(37,5)
50	8(100,0)	8(100,0)	7(87,5)	6(75,0)
60	8(100,0)	8(100,0)	6(75,0)	5(62,5)
70	8(100,0)	7(87,5)	7(87,5)	5(62,5)
80	8(100,0)	8(100,0)	7(87,5)	6(75,0)
90	7(87,5)	7(87,5)	7(87,5)	5(62,5)

Dados descritos por números de biópsias e porcentagem sobre o total de biópsias. Grupo A: clampe arterial; Grupo AV: clampe arterial e venoso.

Figura 11. Número de biópsias com presença de congestão vascular e edema

Tabela 6. Distribuição da presença de infiltrado inflamatório intersticial nas biópsias realizadas nos rins isquêmicos e não isquêmicos, de acordo com o tipo de clampeamento

Momento (minutos)	Tipo de clampeamento			
	Grupo A (n=8)		Grupo AV (n=8)	
	Rim esquerdo (Isquêmico) n(%)	Rim direito (Não isquêmico) n(%)	Rim esquerdo (Isquêmico) n(%)	Rim direito (Não isquêmico) n(%)
0	1(12,5)	0(0,0)	0(0,0)	1(12,5)
10	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
20	2(25,0)	0(0,0)	1(12,5)	0(0,0)
30	2(25,0)	4(50,0)	2(25,0)	1(12,5)
40	4(50,0)	1(12,5)	1(12,5)	1(12,5)
50	4(50,0)	2(25,0)	1(12,5)	0(0,0)
60	2(25,0)	1(12,5)	1(12,5)	0(0,0)
70	2(25,0)	2(25,0)	2(25,0)	0(0,0)
80	2(25,0)	2(25,0)	2(25,0)	0(0,0)
90	1(12,5)	1(12,5)	2(25,0)	1(12,5)

Dados descritos por números de biópsias e porcentagem sobre o total de biópsias. Grupo A: clampe arterial; Grupo AV: clampe arterial e venoso.

Figura 12. Número de biópsias com presença de infiltrado inflamatório intersticial

Tabela 7. Presença de alterações degenerativas de células tubulares nas biópsias realizadas nos rins isquêmicos e não isquêmicos, de acordo com o tipo de clampeamento

Momento (minuto)	Tipo de clampeamento			
	Grupo A (n=8)		Grupo AV (n=8)	
	Rim esquerdo (Isquêmico) n(%)	Rim direito (Não isquêmico) n(%)	Rim esquerdo (Isquêmico) n(%)	Rim direito (Não isquêmico) n(%)
0	1(12,5)	1(12,5)	0(0,0)	1(12,5)
10	2(25,0)	2(25,0)	2(25,0)	0(0,0)
20	4(50,0)	3(37,5)	3(37,5)	2(25,0)
30	5(62,5)	5(62,5)	5(62,5)	4(50,0)
40	5(62,5)	5(62,5)	6(75,0)	4(50,0)
50	8(100,0)	5(62,5)	5(62,5)	4(50,0)
60	7(87,5)	6(75,0)	5(62,5)	5(62,5)
70	7(87,5)	7(87,5)	6(75,0)	5(62,5)
80	8(100,0)	6(75,0)	5(62,5)	6(75,0)
90	7(87,5)	6(75,0)	5(62,5)	4(50,0)

Dados descritos por números de biópsias e porcentagem sobre o total de biópsias.
Grupo A: clampe arterial; Grupo AV: clampe arterial e venoso.

Figura 13. Número de biópsias com presença de alterações degenerativas de células tubulares

Tabela 8. Presença de cilindros pigmentados nas biópsias realizadas nos rins isquêmicos e não isquêmicos, de acordo com o tipo de clampeamento

Momento (minutos)	Tipo de clampeamento			
	Grupo A (n=8)		Grupo AV (n=8)	
	Rim esquerdo (Isquêmico) n(%)	Rim direito (Não isquêmico) n(%)	Rim esquerdo (Isquêmico) n(%)	Rim direito (Não isquêmico) n(%)
0	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
10	0(0,0)	0(0,0)	1(12,5)	1(12,5)
20	1(12,5)	0(0,0)	1(12,5)	0(0,0)
30	1(12,5)	0(0,0)	2(25,0)	3(37,5)
40	1(12,5)	0(0,0)	2(25,0)	1(12,5)
50	1(12,5)	0(0,0)	1(12,5)	1(12,5)
60	0(0,0)	0(0,0)	4(50,0)	2(25,0)
70	0(0,0)	0(0,0)	4(50,0)	2(25,0)
80	0(0,0)	0(0,0)	4(50,0)	1(12,5)
90	1(12,5)	0(0,0)	5(62,5)	1(12,5)

Dados descritos por números de biópsias e porcentagem sobre o total de biópsias. Grupo A: clampe arterial; Grupo AV: clampe arterial e venoso.

Figura 14. Número de biópsias com presença de cilindros pigmentados

Tabela 9. Número de biópsias com hemorragia intersticial nos rins isquêmicos e não isquêmicos, de acordo com o tipo de clampeamento

Momento (minutos)	Tipo de clampeamento			
	Grupo A (n=8)		Grupo AV (n=8)	
	Rim esquerdo (Isquêmico) n(%)	Rim direito (Não isquêmico) n(%)	Rim esquerdo (Isquêmico) n(%)	Rim direito (Não isquêmico) n(%)
0	0(0,0)	1(12,5)	1(12,5)	0(0,0)
10	3(37,5)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
20	2(25,0)	2(25,0)	1(12,5)	1(12,5)
30	2(25,0)	1(12,5)	0(0,0)	0(0,0)
40	1(12,5)	2(25,0)	1(12,5)	2(25,0)
50	1(12,5)	3(37,5)	1(12,5)	1(12,5)
60	3(37,5)	3(37,5)	0(0,0)	3(37,5)
70	3(37,5)	4(50,0)	0(0,0)	2(25,0)
80	5(62,5)	5(62,5)	0(0,0)	2(25,0)
90	5(62,5)	4(50,0)	0(0,0)	1(12,5)

Dados descritos por números de biópsias e porcentagem sobre o total de biópsias; Grupo A: clampe arterial; Grupo AV: clampe arterial e venoso.

Figura 15. Número de biópsias com hemorragia intersticial

4.2.1.1 Análise descritiva dos rins isquêmicos

A Congestão vascular e o edema foram detectados nos dois grupos após 10 minutos de isquemia, mas foram mais prevalentes em animais do Grupo A. A infiltração intersticial neutrofílica foi observada em quatro das oito biópsias do Grupo A e duas das oito biópsias do Grupo AV. As alterações degenerativas foram mais frequentes após 40 minutos de isquemia e mais prevalentes no Grupo A. A hemorragia intersticial também foi mais frequente no Grupo A. Embora raros, os cilindros pigmentados, que são proteínas liberadas por células renais tubulares durante a NTA, foram a única alteração histopatológica mais prevalente no Grupo AV.

4.2.1.2 Análise descritiva dos rins não isquêmicos

A congestão vascular e o edema foram detectados no Grupo A e Grupo AV após 10 minutos. A infiltração intersticial de neutrófilos foi observada após 30 minutos nos dois Grupos: A e AV. As alterações degenerativas foram mais frequentes após 40 minutos de isquemia e mais prevalentes no Grupo A. A hemorragia intersticial também foi mais frequente no Grupo A e esteve presente em metade de suas biópsias, após 70 minutos. Os cilindros pigmentados não foram detectados no Grupo A e foram, da mesma forma que nos rins isquêmicos, a única alteração histopatológica mais prevalente no Grupo AV.

4.2.2 Avaliação da presença de lesões nas biópsias

Para cada biópsia realizada em cada rim foi investigada a presença de cinco tipos de lesão. Dessa forma, no grupo de oito animais de cada combinação de lado e tipo de clampeamento seria possível encontrar entre nenhuma e até 40 lesões. No apêndice C, é possível identificar a tabela com a descrição do número de biópsias com lesões. Observamos um aumento na proporção de lesões ao longo do tempo (Figura 16).

Figura 16. Proporção de biópsias com presença de lesão

A avaliação das alterações ao longo do tempo quanto à proporção de lesões nos diferentes grupos mostra evidências de interação entre o grupo de estudo e o momento de avaliação ($p < 0,001$), ou seja, há evidências de que a variação na proporção de lesões dependa do grupo de estudo. Devido a essa interação, foram realizadas comparações entre os momentos dentro de cada grupo e comparações entre grupos nos diferentes momentos. As proporções de lesão estimadas pelo modelo são apresentadas na tabela 10 e na figura 17.

Tabela 10. Presença de qualquer lesão nas biópsias realizadas nos rins isquêmicos e não isquêmicos, de acordo com o tipo de clampeamento

Momento (minutos)	Tipo de clampeamento			
	Grupo A		Grupo AV	
	Rim não isquêmico	Rim isquêmico	Rim não isquêmico	Rim isquêmico
Basal	10,0% (7,1%)	17,5% (6,6%)	10,0% (3,5%)	7,5% (4,9%)
10	20,0% (3,5%) *	32,5% (4,9%) *	7,5% (3,4%)	12,5% (4,9%)
20	30,0% (6,1%) *	42,5% (6,6%) *	20,0% (5,0%)	25,0% (5,9%) *
30	42,5% (7,4%) *	45,0% (5,9%) *	27,5% (7,0%)	32,5% (4,9%) *
40	40,0% (5,0%) *	47,5% (7,0%) *	27,5% (6,1%)	37,5% (5,5%) *
50	45,0% (6,8%) *	55,0% (5,9%) *	30,0% (5,0%) *	37,5% (6,6%) *
60	45,0% (6,8%) *	50,0% (7,1%) *	37,5% (8,2%) *	40,0% (7,1%) *
70	50,0% (8,7%) *	50,0% (5,0%) *	35,0% (8,5%) *	47,5% (7,0%) *
80	52,5% (7,9%) *	57,5% (4,2%) *	37,5% (5,5%) *	45,0% (7,7%) *
90	45,0% (8,5%) *	52,5% (8,6%) *	30,0% (9,4%)	47,5% (7,0%) *

* Diferença significativa em relação ao basal. Dados representam proporções estimadas e erros padrão obtidos com modelo de equações de estimação generalizadas. Grupo A: clampe arterial; Grupo AV: clampe arterial e venoso.

Figura 17. Proporções estimadas de lesão e intervalos de confiança de 95%

4.2.2.1 Rins isquêmicos de acordo com o clampeamento

No Grupo AV, a percentagem de lesões renais aumentou significativamente, em relação aos valores basais, após 20 minutos (25%). No Grupo

A, a percentagem de lesões aumentou significativamente após 10 minutos nos rins isquêmicos (32,5%).

4.2.2.2 Rins não isquêmicos de acordo com o clampeamento

Observou-se também um aumento significativo na percentagem de lesões: no Grupo AV, a percentagem de lesões renais aumentou significativamente em relação aos valores basais apenas entre 50 e 80 minutos (30%). No Grupo A, a percentagem de lesões aumentou significativamente após 10 minutos nos rins não isquêmicos (20%) (Tabela 11).

A percentagem de lesões nas biópsias renais de rins isquêmicos e não isquêmicos aumentou significativamente após 10 e 20 minutos, respectivamente, independentemente do protocolo de clampeamento.

Tabela 11. Comparações múltiplas entre momentos quanto à presença de lesões nos rins isquêmicos e não isquêmicos, de acordo com o tipo de clampeamento

Comparação	Tipo de clampeamento			
	Grupo A		Grupo AV	
	Rim não isquêmico	Rim isquêmico	Rim não isquêmico	Rim isquêmico
10min <i>versus</i> basal	0,046	0,028	0,555	0,102
20min <i>versus</i> basal	0,003	<0,001	0,137	0,038
30min <i>versus</i> basal	0,001	<0,001	0,135	0,004
40min <i>versus</i> basal	0,003	<0,001	0,094	<0,001
50min <i>versus</i> basal	<0,001	<0,001	0,008	<0,001
60min <i>versus</i> basal	0,003	<0,001	0,001	0,001
70min <i>versus</i> basal	<0,001	<0,001	0,019	<0,001
80min <i>versus</i> basal	<0,001	<0,001	0,001	0,002
90min <i>versus</i> basal	0,025	0,002	0,137	<0,001

Valores-p corrigidos pelo método de Bonferroni sequencial. Grupo AV: clampe arterial e venoso; Grupo A: clampe arterial.

Na comparação entre rins não isquêmicos e isquêmicos (tratados) separadamente, por tipo de clampeamento, temos evidência de diferenças aos 10 e 20 minutos para clampeamento de artéria. Na comparação entre tipos de clampeamento observamos diferenças entre os rins isquêmicos aos 10, 20 e 50 minutos. Para os rins não isquêmicos há evidências de diferença aos 10 minutos (Tabela 12).

Tabela 12. Comparações múltiplas entre grupos quanto à presença de lesões nos rins isquêmicos e não isquêmicos, de acordo com o tipo de clampeamento

Momento (minutos)	Comparações Controle <i>versus</i> Isquêmico		Comparações entre Momentos de clampeamento	
	Grupo A	Grupo AV	Rim isquêmico	Rim não isquêmico
Basal	0,421	0,737	0,222	>0,99
10	<0,001	0,102	0,004	0,011
20	0,039	0,611	0,047	0,206
30	0,780	0,586	0,102	0,143
40	0,216	0,206	0,263	0,112
50	0,206	0,216	0,047	0,077
60	0,285	0,703	0,317	0,484
70	>0,99	0,179	0,772	0,216
80	0,555	0,451	0,155	0,118
90	0,216	0,143	0,653	0,235

Grupo A: clampe arterial; Grupo AV: clampe arterial e venoso.

5 DISCUSSÃO

Foi delineado um modelo experimental controlado com suínos pois estes são excelentes modelos biomédicos, dadas as semelhanças anatômicas, fisiológicas e imunológicas ao ser humano.⁽⁵⁸⁾

Nossa análise demonstrou uma tendência no aumento do IR e IP durante avaliação ecográfica do rim não isquêmico, durante o clampeamento do hilo contralateral. Ou seja, a alteração de perfusão demonstrada pelo rim isquêmico é refletida no rim contralateral, em ambos os grupos. Essa tendência no aumento do IR e IP foi significativa no Grupo A, a partir de 30 minutos de isquemia. Esse dado parece refletir o aumento significativo do número de lesões histológicas identificadas, nesse mesmo grupo, a partir de 10 minutos de isquemia. No rim isquêmico do Grupo A, quando comparamos o basal aos demais tempos de isquemia, em relação à proporção de lesões histológicas, houve diferenças significativas nas comparações entre o tempo zero e todas as demais avaliações a partir de 10 minutos ($p < 0,05$). Assim, acreditamos que medidas seriadas do IR e IP contralateral possam ter valor preditivo na identificação do momento aproximado da instalação da lesão renal por interferência. Além disso, o fato de 3 artérias renais contralaterais (rim não isquêmico) do Grupo A terem sofrido trombose hilar, durante a reperfusão, pode ser mais um indicador do fenômeno de comunicação entre órgãos à distância. Um maior número de animais talvez pudesse identificar diferença significativa no número de tromboses entre os grupos. Neste estudo, isso não foi possível provavelmente devido a um erro estatístico tipo 2.

A disfunção de órgãos distantes após IRA ocorre como consequência da liberação de mediadores humorais e celulares na circulação sanguínea.^(5,13,15) Citocinas liberadas durante a isquemia parecem exercer um importante papel na patogênese da lesão tissular. O fator de necrose tumoral (TNF - *Tumor Necrosis Factor*), que é produzido pelas células tubulares epiteliais e pelos leucócitos ativados, induz a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, permitindo o aumento da infiltração leucocitária. Além disso, há indução de outras citocinas inflamatórias e pró-inflamatórias, tais como a Interleucina 6 (IL-6), IL-8, IL-10, que podem afetar diferentes sistemas orgânicos.⁽⁵⁹⁾ Esse processo é conhecido como *organ crosstalk*, termo derivado da eletrônica, que denota qualquer sinal ou circuito que afeta outro, não intencionalmente. Na Biologia molecular, *crosstalk* é usado para

descrever quando um ou mais componentes de uma via tradutora de determinada proteína afetam uma via diferente, tanto em nível intracelular como transmembrana. Do ponto de vista clínico, Lane et al.⁽³⁴⁾ definem o *crosstalk* como os efeitos de um órgão mal funcionando na atividade de outro. Diversos estudos experimentais demonstraram como a IRA derivada do mecanismo de isquemia renal pode acometer órgãos em outros sistemas.⁽¹⁶⁾ Fadillioglu et al.⁽⁶⁰⁾ evidenciaram o aumento de transaminases hepáticas em ratos e Gurley et al.⁽⁶¹⁾ demonstraram como o mecanismo de isquemia renal reduziu o metabolismo oxidativo de fígados em cães, correlacionando-o com níveis elevados de TNF- α e IL-6. Golab et al.⁽⁵⁹⁾ constataram lesão hepática nas fases iniciais do mecanismo de IRA, a qual foi associada com níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e apoptose de hepatócitos. Além do fígado, outros órgãos e sistemas foram descritos como alvos dessa intensa resposta inflamatória. O pulmão, por exemplo, como demonstrado em estudo experimental em camundongos, apresentou lesões tissulares originadas da intensa infiltração neutrofílica, elevação da atividade da mieloperoxidase (MPO) e quimiocinas, e do aumento da permeabilidade capilar.^(33,62) O colapso cardiovascular também é uma causa comum de morte relacionada a IRA.^(63,64) Kelly et al.⁽¹⁶⁾ demonstraram, em estudo experimental em roedores, que um menor tempo de isquemia renal trouxe menos efeitos deletérios cardíacos. Kuhar et al.⁽⁶⁵⁾ identificaram que na presença de falência renal aguda, a fibrilação atrial (FA) sustentada depois da isquemia cardíaca é muito mais frequente e duradoura, em suínos. Alterações inflamatórias e funcionais precoces do cérebro após IRA isquêmica também foram descritas. Liu et al.⁽²⁹⁾ induziram isquemia renal bilateral em camundongos, durante 60 minutos, e coletaram amostras do tecido cerebral, 24 horas após a reperfusão. Os resultados demonstraram que os camundongos com IRA pós-isquemia tiveram maior taxa de gliose e aumento de citocinas inflamatórias no córtex e hipocampo, quando comparados ao grupo controle.

Gardner et al.⁽¹³⁾ encontraram resultados mais discretos ao realizar análise de amostras do fígado, pulmão, cérebro e do próprio rim de suínos por meio de cortes histológicos e imunofluorescência. O tempo de isquemia renal neste experimento foi pequeno (40 minutos), o que pode ter colaborado com resultados menos significativos, uma vez que suínos e cães toleram maiores períodos de isquemia renal. Em geral, são necessários intervalos de isquemia maiores que 75 minutos para deflagrar os mecanismos de IRA nesses animais.⁽³⁵⁾ Em nosso estudo, o tempo de isquemia renal foi de 90 minutos.

Nossa análise histológica demonstrou aumento significativo ($p < 0,05$) do número de lesões no rim controle a partir de 10-20 minutos de isquemia no Grupo A e somente com 50-60 minutos, no Grupo AV. Ao analisarmos os grupos separadamente, observamos que o Grupo A apresentou uma tendência a maior número de lesões nas biópsias, mantendo-se acima do Grupo AV em todos os momentos de 10 até 80 minutos, tanto no rim isquêmico quanto no rim não isquêmico. Tal achado demonstra como o tipo de clampeamento pode interferir no fenômeno de *crosstalk*. O impedimento do retorno venoso no Grupo AV, sem liberação de citocinas para a circulação sistêmica, parece ser um fator protetor. O pequeno período de reperfusão até coleta das biópsias pode ter prejudicado nossa análise, pois intervalos menores que 24 horas dificilmente apresentam alterações celulares e/ou humorais capazes de serem reconhecidas pelas técnicas histológicas utilizadas.⁽⁶⁶⁾ A identificação e quantificação de necrose e apoptose foi bastante difícil em nosso modelo, apesar desse tipo de lesão celular estar intimamente relacionada com o processo de isquemia.⁽⁶⁷⁾ Ocorre que a maior parte dos estudos que evidenciou necrose após isquemia renal teve as biópsias para análise histológica e/ou imunohistoquímica coletadas pelo menos 24 horas após o reestabelecimento do fluxo.^(10,67,68) Em nosso experimento, entretanto, o tempo máximo de reperfusão alcançado, em um número bastante restrito de animais, foi 60 minutos. Isso se deu pela dificuldade em manter os animais vivos e estáveis do ponto de vista hemodinâmico, sem o uso de drogas vasoativas. Após um tempo cirúrgico médio de 150 minutos, a maioria dos animais sofria de hipotensão não responsiva ao volume, em decorrência de desidratação, hipotermia e possível intolerância anestésica. Entretanto, o uso de drogas vasoativas foi proscrito, uma vez que poderia trazer interferências na análise dos dados ecográficos, que são diretamente influenciados pelo débito cardíaco e pressão arterial. Ainda, acreditamos que as amostras de tecido após fixação (formalina 10%), podem limitar a compreensão de como mecanismos dinâmicos de necrose e apoptose se desenrolam em tecidos vivos.⁽⁶⁹⁾ Uma análise com uso de técnicas mais refinadas, como a imunofluorescência ou aferição de marcadores inflamatórios, poderiam trazer resultados mais contundentes.

Analisando em separado os três rins controles que sofreram trombose (Figura 18), as alterações degenerativas encontradas simultaneamente nos 3 órgãos foram: degeneração de células tubulares, congestão vascular com edema e hemorragia intersticial. A presença de hemorragia intersticial pode estar relacionada à

instalação de necrose ou à manipulação cirúrgica prévia, enquanto às demais alterações são decorrentes de processo inflamatório.^(56,70) Bezerra et al. descreveram um modelo experimental de isquemia e reperfusão em capivaras (*Tayassu tajacu*), animal selvagem bastante similar ao suíno.⁽⁷¹⁾ O número de lesões histológicas dos rins isquêmicos foi significativamente maior do que do controle. Em nosso experimento também houve tendência a maior número de alterações histológicas no grupo dos rins isquêmicos, mas o grupo não isquêmico apresentou crescimento significativo no número de lesões ao longo do tempo, quando comparado com o seu basal. Quanto ao tipo de clampeamento, houve diferença significativa no número de lesões, que foram bem mais frequentes no Grupo A, tanto no rim não isquêmico como no rim isquêmico. Entretanto, as biópsias aleatórias, o pequeno número de animais da amostra e a análise exclusivamente qualitativa das lesões histológicas podem ter sido fatores de confusão.

Vaso com paredes lisas, sem trombo, em A; fluxo identificado somente no centro do trombo em formação, em B; ausência completa do fluxo com trombo mural e espasmo da artéria, em C e D.

Figura 18. Imagem ecográfica ao Modo B (A), Doppler colorido (B e C) e Doppler de potência (D), mostrando o exato momento da trombose renal do rim não isquêmico

O mecanismo e possíveis efeitos agudos do *crosstalk* foram investigados, até onde nós sabemos, de forma pioneira, com uso de análise Dopplerfluxométrica do rim contralateral ao clampeamento (não isquêmico). A monitorização do fluxo renal através da Ecografia com Doppler foi realizada durante todos os tempos de isquemia, bilateralmente. Sabemos que os sinais ecográficos durante o clampeamento de um dos rins estaria ausente nesta fase, mas o Doppler foi realizado mesmo assim, para garantir que nenhuma perfusão decorrente de vascularização anômala ocorresse (Figura 18). Durante a análise ecográfica do rim não isquêmico, procuramos identificar alterações locais que corroborassem com a teoria da interferência entre os rins.⁽⁹⁾ Ao analisarmos os valores do IR e IP ao longo do tempo de isquemia, observamos que há uma tendência na elevação aguda da resistência vascular do rim não isquêmico. Esse aumento transitório do IR e IP fez-nos aventar a hipótese de que há, de fato, alguma comunicação entre ambos os órgãos. E mesmo sem lesão direta, o rim contralateral à isquemia pode sofrer alterações locais que prejudiquem sua perfusão (Figura 19). Citocinas e marcadores inflamatórios parecem mediar essa alteração.

Figura 19. Doppler de potência, mais sensível que o Doppler em cores, para confirmação de ausência de fluxo após clampeamento do hilo esquerdo

Figura 20. Aumento do índice de resistência ($=0,89$) do rim direito, aos 40 minutos de isquemia do rim contralateral

Outrossim, a ocorrência de trombose arterial em 3 rins não isquêmicos, durante a reperusão, no Grupo A (Figura 20), corrobora com a hipótese de que uma lesão renal unilateral é capaz de influenciar o outro rim. A ausência de trombose arterial em rins controle do Grupo AV, no qual houve impedimento tanto do *inflow* (clampeamento arterial), quanto do *outflow* (clampeamento venoso), poderia estar relacionada com um maior represamento das citocinas inflamatórias. Como os mediadores de inflamação permaneceram localizados, sem ganhar a circulação sistêmica, o mecanismo do *organ crosstalk* ficou menos favorecido nesse grupo.

Ainda, o Grupo AV apresentou curva de crescimento do número de lesões ao longo do tempo menos acentuada do que o Grupo A, tanto para rim isquêmico quanto para o não isquêmico. Como a angiotensina II é liberada sistemicamente a partir do rim isquêmico através da veia renal, aumentando a produção de angiotensina II no rim não isquêmico, a oclusão da veia renal interrompe a via da angiotensina.^(39,72) Isto pode explicar por que o Grupo AV foi associado com menos lesões histológicas no rim contralateral não isquêmico. Então, apesar de alguns estudos defenderem o clampeamento exclusivo da artéria renal para minimizar os

efeitos da isquemia; nosso experimento mostra uma tendência de menos lesões no Grupo AV.^(39,72)

Figura 21. Clampeamento somente da artéria renal esquerda, no Grupo A

A escolha da ecografia vascular deu-se porque este é um recurso bem estabelecido para avaliação circulatória do território renal, de baixo custo, fácil acesso e pode ser repetido quantas vezes for necessário.^(19,21,22,50,73,74)

O Doppler renal pode evidenciar fatores preditivos de injúria renal aguda, mesmo antes da elevação das excretas nitrogenadas e/ou alteração do débito urinário, que podem se manter dentro do normal até alguns dias após a ocorrência da injúria renal.^(75,76) A artéria renal normal apresenta, ao Doppler, fluxo sistólico e diastólico positivos (acima da linha de base) devido a baixa resistência vascular distal. Assim, a onda (espectro) do segmento arterial renal é de baixa resistência, representando a alta perfusão do leito renal^(21,77) (Figura 20). Conforme descrito por Mei et al.,⁽⁷⁸⁾ as medidas seriadas do IP e IR, são calculadas, respectivamente, por meio das seguintes fórmulas:

$$\text{IP} = \text{VPS} - \text{VDF} / \text{Velocidade média}$$

$$\text{IR} = \text{VPS} - \text{VDF} / \text{VPS}$$

É importante salientar que o Doppler espectral pode evidenciar um IR elevado em casos de doenças parenquimatosas renais ou disfunção de enxertos (pós-transplante), pois o IR elevado resulta de diferentes causas de edema intersticial.⁽⁷⁹⁾ Em nosso estudo, as medidas seriadas do IR e do IP foram realizadas no sentido de estabelecer padrões de piora da perfusão do rim direito (não isquêmico) ao longo do tempo de isquemia contralateral.⁽⁸⁰⁾

No Grupo A, há evidências de aumento significativo (acima dos valores normais) do IR e IP no rim não isquêmico a partir de 30 minutos de isquemia contralateral. Esse talvez seja o ponto de corte para o início da lesão por *crosstalk*.

Apesar da elevação do IR não ser capaz de identificar qual a causa da disfunção renal, um IR normal é um elemento preditivo de função adequada.⁽⁸¹⁾ Da mesma forma, análises seriadas de IR e IP são promissoras em monitorizar a função renal e em prever a instalação da IRA.^(48,82) Diversos estudos utilizaram o Doppler como meio de avaliação da perfusão renal, entretanto, não encontramos nenhum modelo de estudo que tenha analisado o comportamento ecográfico agudo do rim contralateral, não isquêmico.^(23,25,71,83,84) O Grupo A apresentou curva de crescimento dos valores de IR e IP acima da curva do Grupo AV, o que sugere que o impedimento do retorno venoso possa ser um fator de proteção ao fenômeno de interferência entre rins (*kidney-kidney crosstalk*). Quando analisamos a perfusão renal, tanto do rim não isquêmico quanto do rim isquêmico, durante a reperusão, há uma tendência de melhora mais rápida do IR e IP no Grupo AV. Dessa forma, acreditamos que o Doppler intraoperatório com análise seriada do rim não isquêmico possa orientar os cirurgiões quanto ao tempo de isquemia contralateral tolerável e probabilidade de instalação de IRA. Entretanto, mais estudos clínicos e experimentais são necessários para o entendimento completo do fenômeno de isquemia e interferência entre rins.

A utilização do Doppler em modelo experimental, para análise da resistência vascular renal, foi descrita por Norris et al.,⁽⁸³⁾ em 1984. Os autores descreveram a eficácia do Doppler pulsado no diagnóstico da obstrução da artéria renal e aumento do IR em estudo com 10 cães. Em 2009, LugerHamer et al.⁽⁸⁴⁾ criaram um modelo que utilizava a combinação de técnicas fluorimétricas e Doppler para

análise do fluxo sanguíneo renal em ratos submetidos a isquemia e reperfusão. Com isso, o autor desenvolveu um sistema de avaliação da viabilidade renal em diferentes estados isquêmicos, mimetizando condições fisiopatológicas dos humanos. Tais estudos serviram como referência para a criação deste modelo experimental.

O aumento progressivo do IR no rim contralateral, não isquêmico, já foi relatado em outro estudo experimental. Entretanto, a análise ecográfica foi realizada tardiamente, durante o 5º e 20º dia após a reperfusão, e não permitiu identificar elementos ecográficos preditivos de lesão renal,⁽⁷¹⁾ conforme nosso modelo.

5.1 Limitações

A amostra do estudo foi pequena, o que pode ter interferido no poder da análise estatística. O modelo de estudo experimental é bem controlado, o que nos propiciou um manejo adequado de variáveis como raça, tamanho, peso, sexo, alimentação. No entanto, apesar das semelhanças anatômicas e imunológicas, o comportamento biológico do rim de suínos é diferente do rim humano.⁽⁵¹⁾ Suínos possuem uma maior tolerância ao tempo de isquemia e tendem a ter uma maior probabilidade de trombose do que humanos. Uma análise histológica mais complexa, com avaliação detalhada de apoptose poderia identificar alterações mais específicas. Além disso, a análise qualitativa (e não quantitativa) das lesões histológicas pode ter gerado um viés de interpretação, uma vez que diferentes graus (leve, moderado, intenso) de uma determinada lesão foram considerados da mesma forma.

Outra variável foi a duração do estudo, que por motivos de financiamento, contemplou a eutanásia dos animais no mesmo tempo cirúrgico. Assim, o tempo de reperfusão renal até a coleta das biópsias foi bastante curto. Isso impossibilitou uma análise segura dos efeitos da isquemia e reperfusão, os quais são melhores percebidos mais tardiamente.

6 CONCLUSÃO

O rim não isquêmico sofre de forma aguda em decorrência da isquemia contralateral, demonstrado pelo aumento progressivo do número de lesões histológicas ao longo do tempo. O tipo de clampeamento do hilo teve influência sobre o fenômeno de *crosstalk*, representado pela piora da perfusão, aumento do IR e IP, e tendência a trombose no Grupo A. Correlacionando-se os achados histológicos agudos e a variação nos parâmetros ecográficos ao Doppler, podemos considerar a avaliação do IR e IP do rim contralateral à isquemia como um elemento útil na previsão da instalação de lesões histológicas.

7 ANEXOS

São Paulo, 28 de Outubro de 2016

Ao

Dr. Oskar Grau Kaufmann

Certificamos que o projeto intitulado *“Alterações morfológicas e estruturais versus análise do fluxo renal ao doppler colorido, em diferentes tempos de isquemia e tipos de clampeamento: estudo em suínos”*, protocolo CEUA 2749/2016, sob a responsabilidade do pesquisador *Dr. Oskar Grau Kaufmann* - que envolve a produção, manutenção, e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Albert Einstein (CEUA/Einstein) em 09/09/2016.

Vigência do Projeto: Outubro/2016 a Junho/2017

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade/Peso	Total	Fornecedor
Porco	Large White	Ambos	4 meses / 40Kg	12	Granja RG

Aproveitamos a oportunidade para informar que:

- O (treinamento ou pesquisa) deve ser desenvolvido conforme delineado no processo aprovado.
- O CEUA/Einstein deve ser informado de todos os fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo ou treinamento. É papel do responsável, assegurar medidas imediatas adequadas frente a eventos não previstos.

ALBERT EINSTEIN
INSTITUTO ISRAELITA DE
ENSINO E PESQUISA

- Eventuais modificações ou emendas ao processo devem ser apresentadas ao CEUA/Einstein de forma clara e sucinta, identificando a parte a ser modificada e suas justificativas;
- O Relatório final deve ser apresentado ao CEUA/Einstein após o encerramento das atividades previstas.
- No caso de treinamento, esta aprovação tem validade de 12 meses a partir da data de aprovação pelo CEUA/Einstein e, para cada evento realizado nesse período, um relatório específico deverá ser encaminhado.

Atenciosamente,

Dr. Jullo Cesar Martins Monte
Vice-Coordenador do Comitê de Ética
no Uso de Animais de Experimentação – CEUA

8 REFERÊNCIAS

1. Abuelo JG. Normotensive ischemic acute renal failure. *N Engl J Med*. 2007;357(8):797-805.
2. Badr KF, Ichikawa I. Prerenal failure: a deleterious shift from renal compensation to decompensation. *N Engl J Med*. 1988;319(10):623-9.
3. Simmons MN, Schreiber MJ, Gill IS. Surgical renal ischemia: a contemporary overview. *J Urol*. 2008;180(1):19-30.
4. Himmelfarb J, Joannidis M, Molitoris B, Schietz M, Okusa MD, Warnock D, et al. Evaluation and initial management of acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(4):962-7.
5. Volpe A, Blute ML, Ficarra V, Gill IS, Kutikov A, Porpiglia F, et al. Renal ischemia and function after partial nephrectomy: a collaborative review of the literature. *Eur Urol*. 2015;68(1):61-74.
6. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(8):2199-210.
7. Secin FP. Importance and limits of ischemia in renal partial surgery: experimental and clinical research. *Adv Urol*. 2008:102461.
8. Goes N, Urmson J, Ramassar V, Halloran PF. Ischemic acute tubular necrosis induces an extensive local cytokine response. Evidence for induction of interferon-gamma, transforming growth factor-beta 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-2, and interleukin-10. *Transplantation*. 1995;59(4):565-72.
9. Jablonski P, Howden B, Rae D, Rigol G, Birrell C, Marshall V, et al. The influence of the contralateral kidney upon recovery from unilateral warm renal ischemia. *Pathology*. 1985;17(4):623-7.
10. Gueler F, Gwinner W, Schwarz A, Haller H. Long-term effects of acute ischemia and reperfusion injury. *Kidney Int*. 2004;66(2):523-7.
11. Crane NJ, Huffman SW, Alemozaffar M, Gage FA, Levin IW, Elster EA. Evidence of a heterogeneous tissue oxygenation: renal ischemia/reperfusion injury in a large animal model. *J Biomed Opt*. 2013;18(3):035001.
12. Kamińska D, Kościelska-Kasprzak K, Chudoba P, Hałoń A, Mazanowska O, Gomółkiewicz A, et al. The influence of warm ischemia elimination on kidney injury during transplantation - clinical and molecular study. *Sci Rep*. 2016;6:36118.
13. Gardner DS, De Brot S, Dunford LJ, Grau-Roma L, Welham SJ, Fallman R, et al. Remote effects of acute kidney injury in a porcine model. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;310(4):F259-71.
14. Li X, Hassoun HT, Santora R, Rabb H. Organ crosstalk: the role of the kidney. *Curr Opin Crit Care*. 2009;15(6):481-7.
15. Doi K, Rabb H. Impact of acute kidney injury on distant organ function: recent findings and potential therapeutic targets. *Kidney Int*. 2016;89(3):555-64.

16. Kelly KJ. Distant effects of experimental renal ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(6):1549-58.
17. Orvieto MA, Zorn KC, Mendiola F, Lyon MB, Mikhail AA, Gofrit ON, et al. Recovery of renal function after complete renal hilar versus artery alone clamping during open and laparoscopic surgery. *J Urol*. 2007;177(6):2371-4.
18. Kerbl K, Chandhoke PS, Clayman RV, McDougall E, Stone AM, Figenshau RS. Ligation of the renal pedicle during laparoscopic nephrectomy: a comparison of staples, clips, and sutures. *J Laparoendosc Surg*. 1993;3(1):9-12.
19. Tranquart F, Lebranchu Y, Haillot O, Pourcelot D, Grezard O, Pourcelot L. The use of perioperative Doppler ultrasound as a screening test for acute tubular necrosis. *Transpl Int*. 1993;6(1):14-7.
20. Yoon DY, Kim SH, Kim HD, Na DG, Goo JM, Choi HJ, et al. Doppler sonography in experimentally induced acute renal failure in rabbits: resistive index versus serum creatinine levels. *Invest Radiol*. 1995;30(3):168-72.
21. Cano H, Castañeda DA, Patiño N, Pérez HC, Sánchez M, Lozano E, et al. Resistance index measured by Doppler ultrasound as a predictor of graft function after kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2014;46(9):2972-4.
22. Gao J, Ng A, Shih G, Goldstein M, Kapur S, Wang J, et al. Intrarenal color duplex ultrasonography: a window to vascular complications of renal transplants. *J Ultrasound Med*. 2007;26(10):1403-18.
23. Brabrand K, de Lange C, Emblem KE, Reinholt FP, Saugstad OD, Stokke ES, et al. Contrast-enhanced ultrasound identifies reduced overall and regional renal perfusion during global hypoxia in piglets. *Invest Radiol*. 2014;49(8):540-6.
24. Hoeffel C, Mulé S, Huwart L, Frouin F, Jais JP, Helenon O, et al. Renal blood flow quantification in pigs using contrast-enhanced ultrasound: an ex vivo study. *Ultraschall Med*. 2010;31(4):363-9.
25. Dong Y, Wang W, Cao J, Fan P, Lin X. Quantitative evaluation of contrast-enhanced ultrasonography in the diagnosis of chronic ischemic renal disease in a dog model. *PLoS One*. 2013;8(8):e70337.
26. Hao P. Monitoring of renal ischemia reperfusion injury in rabbits by ultrasonic contrast and its relationship with expression of VEGF in renal tissue. *Asian Pac J Trop Med*. 2016;9(2):188-92.
27. Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of acute kidney injury. *Compr Physiol*. 2012;2(2):1303-53.
28. Kinsey GR, Li L, Okusa MD. Inflammation in acute kidney injury. *Nephron Exp Nephrol*. 2008;109(4):e102-7.
29. Liu M, Liang Y, Chigurupati S, Lathia JD, Pletnikov M, Sun Z, et al. Acute kidney injury leads to inflammation and functional changes in the brain. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(7):1360-70.
30. Stahl GL, Xu Y, Hao L, Miller M, Buras JA, Fung M, et al. Role for the alternative complement pathway in ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol*. 2003;162(2):449-55.

31. Zhou W, Farrar CA, Abe K, Pratt JR, Marsh JE, Wang Y, et al. Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest.* 2000;105(10):1363-71.
32. Yoshida M, Honma S. Regeneration of injured renal tubules. *J Pharmacol Sci.* 2014;124(2):117-22.
33. Klein CL, Hoke TS, Fang WF, Altmann CJ, Douglas IS, Faubel S. Interleukin-6 mediates lung injury following ischemic acute kidney injury or bilateral nephrectomy. *Kidney Int.* 2008;74(7):901-9.
34. Lane K, Dixon JJ, MacPhee IA, Philips BJ. Renohepatic crosstalk: does acute kidney injury cause liver dysfunction? *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28(7):1634-47.
35. Humphreys MR, Castle EP, Lohse CM, Sebo TJ, Leslie KO, Andrews PE. Renal ischemia time in laparoscopic surgery: an experimental study in a porcine model. *Int J Urol.* 2009;16(1):105-9.
36. Mir MC, Pavan N, Parekh DJ. Current paradigm for ischemia in kidney surgery. *J Urol.* 2016;195(6):1655-63.
37. Jones WR, Politano VA. The effects of renal artery occlusion on renal function under normothermia and regional hypothermia. *J Urol.* 1963;89(4):535-40.
38. Orvieto MA, Tolhurst SR, Chuang MS, Lyon MB, Ritch CR, Rapp DE, et al. Defining maximal renal tolerance to warm ischemia in porcine laparoscopic and open surgery model. *Urology.* 2005;66(5):1111-5.
39. Tracy CR, Terrell JD, Francis RP, Wehner EF, Smith J, Litorja M, et al. Characterization of renal ischemia using DLP hyperspectral imaging: a pilot study comparing artery-only occlusion versus artery and vein occlusion. *J Endourol.* 2010;24(3):321-5.
40. Liu ZW, Faddegon S, Olweny EO, Best SL, Jackson N, Raj GV, et al. Renal oxygenation during partial nephrectomy: a comparison between artery-only occlusion versus artery and vein occlusion. *J Endourol.* 2013;27(4):470-4.
41. Bagetti-Filho HJ, Sampaio FJ, Marques RG, Pereira-Sampaio MA. Different from renal artery only clamping, artery and vein clamping causes a significant reduction in number of rat glomeruli during warm ischemia. *J Endourol.* 2012;26(10):1335-9.
42. Funahashi Y, Kato M, Yoshino Y, Fujita T, Sassa N, Gotoh M. Comparison of renal ischemic damage during laparoscopic partial nephrectomy with artery-vein and artery-only clamping. *J Endourol.* 2014;28(3):306-11.
43. Engelhorn CA, Engelhorn AL, Pullig R. Vascular color Doppler ultrasound for assessing renovascular hypertension: accuracy of the direct technique for assessing the renal arteries. *Arq Bras Cardiol.* 2004;82(5):477-80.
44. Chudek J, Kolonko A, Król R, Ziaja J, Cierpka L, Wiecek A. The intrarenal vascular resistance parameters measured by duplex Doppler ultrasound shortly after kidney transplantation in patients with immediate, slow, and delayed graft function. *Transplant Proc.* 2006;38(1):42-5.
45. Dion MS, McGregor TB, McAlister VC, Luke PP, Sener A. Hypothermic machine perfusion improves Doppler ultrasonography resistive indices and long-term allograft function after renal transplantation: a single-centre analysis. *BJU Int.* 2015;116(6):932-7.

46. Zwiebel WJ, Pellerito JS. Introduction to vascular ultrasonography. 5th ed. Philadelphia: Saunders; 2004.
47. Quaia E, Siracusano S, Palumbo A, Ciciliato S, Rossi S, Bruni S, et al. Detection of focal renal perfusion defects in rabbits after sulphur hexafluoride-filled microbubble injection at low transmission power ultrasound insonation. *Eur Radiol.* 2006;16(1):166-72.
48. Miyamoto T, Shirahama M, Kiryu C, Mwanza T, Okumura M, Hagio M, et al. Comparison of systemic and renal hemodynamics measured by Doppler ultrasonography in canine experimental hypovolemia. *J Vet Med Sci.* 1997;59(5):347-52.
49. Mostbeck GH, Kain R, Mallek R, Derfler K, Walter R, Havelec L, et al. Duplex Doppler sonography in renal parenchymal disease. Histopathologic correlation. *J Ultrasound Med.* 1991;10(4):189-94.
50. Oktar SO, Yücel C, Ozdemir H, Karaosmanoglu D. Doppler sonography of renal obstruction: value of venous impedance index measurements. *J Ultrasound Med.* 2004;23(7):929-36.
51. Giraud S, Favreau F, Chatauret N, Thuillier R, Maiga S, Hauet T. Contribution of large pig for renal ischemia-reperfusion and transplantation studies: the preclinical model. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:532127.
52. Sincos IR, Aun R, da Silva ES, Belczak S, de Lourdes Higuchi M, Gornati VC, et al. Impact of stent-graft oversizing on the thoracic aorta: experimental study in a porcine model. *J Endovasc Ther.* 2011;18(4):576-84.
53. Sincos IR, da Silva ES, Belczak SQ, Baptista Sincos AP, de Lourdes Higuchi M, Gornati V, et al. Histologic analysis of stent graft oversizing in the thoracic aorta. *J Vasc Surg.* 2013;58(6):1644-1651.e4.
54. Reis MM, Higuchi ML, Aiello VD, Benvenuti LA. [Growth factors in the myocardium of patients with chronic chagasic cardiomyopathy]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000;33(6):509-18. Portuguese.
55. Koike MK, de Carvalho Frimm C, de Lourdes Higuchi M. Bradykinin B2 receptor antagonism attenuates inflammation, mast cell infiltration and fibrosis in remote myocardium after infarction in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005;32(12):1131-6.
56. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Philadelphia: Elsevier; 2014.
57. Platt JF, Ellis JH, Rubin JM, Merion RM, Lucey MR. Renal duplex doppler ultrasonography: a noninvasive predictor of kidney dysfunction and hepatorenal failure in liver disease. *Hepatology.* 1994;20(2):362-9.
58. Prather RS, Lorson M, Ross JW, Whyte JJ, Walters E. Genetically engineered pig models for human diseases. *Annu Rev Anim Biosci.* 2013;1:203-19.
59. Golab F, Kadkhodae M, Zahmatkesh M, Hedayati M, Arab H, Schuster R, et al. Ischemic and non-ischemic acute kidney injury cause hepatic damage. *Kidney Int.* 2009;75(8):783-92.
60. Fadillioglu E, Kurcer Z, Parlakpinar H, Iraz M, Gursul C. Melatonin treatment against remote organ injury induced by renal ischemia reperfusion injury in diabetes mellitus. *Arch Pharm Res.* 2008;31(6):705-12.

61. Gurley BJ, Barone GW, Yamashita K, Polston S, Estes M, Harden A. Extrahepatic ischemia-reperfusion injury reduces hepatic oxidative drug metabolism as determined by serial antipyrine clearance. *Pharm Res.* 1997;14(1):67-72.
62. Johnson KJ, Fantone JC 3rd, Kaplan J, Ward PA. In vivo damage of rat lungs by oxygen metabolites. *J Clin Invest.* 1981;67(4):983-93.
63. Blake P, Hasegawa Y, Khosla MC, Fouad-Tarazi F, Sakura N, Paganini EP. Isolation of "myocardial depressant factor(s)" from the ultrafiltrate of heart failure patients with acute renal failure. *ASAIO J.* 1996;42(5):M911-5.
64. Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in Ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res.* 1996;79(5):949-56.
65. Grasic Kuhar C, Budihna MV, Pleskovič RZ. Mibefradil is more effective than verapamil for restoring post-ischemic function of isolated hearts of guinea pigs with acute renal failure. *Eur J Pharmacol.* 2004;488(1-3):137-46.
66. Schumer M, Colombel MC, Sawczuk IS, Gobé G, Connor J, O'Toole KM, et al. Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am J Pathol.* 1992;140(4):831-8.
67. Zhao Z, Guan R, Song S, Zhang M, Liu F, Guo M, et al. Sinomenine protects mice against ischemia reperfusion induced renal injury by attenuating inflammatory response and tubular cell apoptosis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(9):1702-12.
68. Jablonski P, Howden BO, Rae DA, Birrell CS, Marshall VC, Tange J. An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia. *Transplantation.* 1983;35(3):198-204.
69. Dagher PC, Herget-Rosenthal S, Ruehm SG, Jo SK, Star RA, Agarwal R, et al. Newly developed techniques to study and diagnose acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(8):2188-98.
70. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins: patologia estrutural e funcional. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
71. Bezerra DO, Feitosa ML, Almeida HM, Costa FA, Braga JF, Souza FA, et al. Collared pecary (*Tayassu tajacu*) as a new model of renal ischemic injury induced by clamping the renal artery. *Acta Cir Bras.* 2014;29(9):560-72.
72. Best SL, Thapa A, Holzer MJ, Jackson N, Mir SA, Cadeddu JA, et al. Minimal arterial in-flow protects renal oxygenation and function during porcine partial nephrectomy: confirmation by hyperspectral imaging. *Urology.* 2011;78(4):961-6.
73. Kuwa T, Cancio LC, Sondeen JL, Matylevich N, Jordan BS, McManus AT, et al. Evaluation of renal cortical perfusion by noninvasive power Doppler ultrasound during vascular occlusion and Reperfusion. *J Trauma.* 2004;56(3):618-24.
74. Platt JF, Rubin JM, Ellis JH. Acute renal obstruction: evaluation with intrarenal duplex Doppler and conventional US. *Radiology.* 1993;186(3):685-8.

75. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet*. 2005;365(9466):1231-8.
76. Askenazi DJ, Ambalavanan N, Goldstein SL. Acute kidney injury in critically ill newborns: what do we know? What do we need to learn? *Pediatr Nephrol*. 2009;24(2):265-74.
77. Le Dorze M, Bouglé A, Deruddre S, Duranteau J. Renal Doppler ultrasound: a new tool to assess renal perfusion in critical illness. *Shock*. 2012;37(4):360-5.
78. Mei X, Hang CC, Wang S, Li CS, Yu ZX. Renal Doppler and novel biomarkers to assess acute kidney injury in a swine model of ventricular fibrillation cardiac arrest. *Chin Med J (Engl)*. 2015;128(22):3069-75.
79. Gigante A, Barbano B, Di Mario F, Rosato E, Simonelli M, Rocca AR, et al. Renal parenchymal resistance in patients with biopsy proven glomerulonephritis: correlation with histological findings. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2016;29(3):469-74.
80. Baxter GM. Ultrasound of renal transplantation. *Clin Radiol*. 2001;56(10):802-18.
81. Miletic D, Fuckar Z, Sustic A, Mozetic V, Smokvina A, Stancic M. Resistance and pulsatility indices in acute renal obstruction. *J Clin Ultrasound*. 1998;26(2):79-84.
82. Lerolle N, Guérot E, Faisy C, Bornstain C, Diehl JL, Fagon JY. Renal failure in septic shock: predictive value of Doppler-based renal arterial resistive index. *Intensive Care Med*. 2006;32(10):1553-9.
83. Norris CS, Pfeiffer JS, Rittgers SE, Barnes RW. Noninvasive evaluation of renal artery stenosis and renovascular resistance. *J Vascular Surg*. 1984;1(1):192-201.
84. Luger-Hamer M, Barbiro-Michaely E, Sonn J, Mayevsky A. Renal viability evaluated by the multiprobe assembly: a unique tool for the assessment of renal ischemic injury. *Nephron Clin Pract*. 2009;111(1):c29-38.

Abstract

Introduction: Ischemic acute renal failure is correlated with the time of surgical intervention and complexity of the procedure. Experimental studies have shown that may be associated with mild to moderate lesions in distant organs, in a mechanism known as organ crosstalk. We studied the relationship between renal morphological and structural alterations in different times of unilateral ischemia. **Purpose:** The purpose of this study is to identify Doppler parameters capable of predicting renal injury and to analyze the possible effects of ischemia in the contralateral kidney, in two different types of clamping: artery only versus artery and venous clamping. **Methods:** We operated 17 pigs randomly divided into two work groups: Group A, with unilateral artery clamping of left kidney. Contralateral kidney was kept non-ischemic. Group AV, with left unilateral artery and vein clamping and contralateral kidney also kept non-ischemic (sham). Animals underwent biopsies and duplex scan at intervals of 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 and 90 minutes of ischemia, and 30, 60min of reperfusion. Histopathological analysis and data found were compared to the intraoperative vascular Doppler parameters: resistance Index and pulsatility index. **Results:** Dopplerfluxometry analysis of the contralateral kidney showed increased renal resistance index and pulsatility index in Group A. Artery and vein simultaneously clamped were related to a lower number of histological changes and absence of thrombosis. And the proportion of lesions over time increased significantly in both ischemic and non-ischemic kidney in both groups, regardless of the type of clamping. **Conclusion:** Contralateral kidney resistance index and pulsatility index evaluation is a useful element in predicting the installation of renal damage. Non-ischemic kidney suffers acutely due to contralateral ischemia and the type of clamping seems to have an influence on the crosstalk phenomenon, represented by worsening of perfusion and tendency to thrombosis.

Apêndices

Apêndice A. Descrição dos índices de resistência e pulsatilidade ao longo do tempo.

Descrição do índice de resistência nos momentos de avaliação basal e após o clampeamento, segundo o grupo de estudo

Momentos de avaliação basal e após o clampeamento (minutos)	Grupo			
	A (n=8)		AV (n=9)	
	Média (DP)	Mínimo – Máximo	Média (DP)	Mínimo – Máximo
0	0,49 (0,08)	0,39 – 0,59	0,57 (0,07)	0,38 – 0,63
10	0,53 (0,11)	0,34 – 0,68	0,59 (0,12)	0,34 – 0,69
20	0,56 (0,12)	0,40 – 0,70	0,61 (0,07)	0,48 – 0,68
30	0,70 (0,08)	0,55 – 0,81	0,61 (0,08)	0,49 – 0,69
40	0,71 (0,05)	0,65 – 0,82	0,62 (0,09)	0,48 – 0,69
50	0,74 (0,04)	0,69 – 0,81	0,63 (0,11)	0,37 – 0,73
60	0,73 (0,10)	0,61 – 0,97	0,64 (0,14)	0,38 – 0,77
70	0,69 (0,08)	0,59 – 0,81	0,68 (0,18)	0,37 – 0,82
80	0,69 (0,16)	0,52 – 1,00	0,66 (0,14)	0,38 – 0,78
90	0,72 (0,17)	0,52 – 1,00	0,65 (0,10)	0,48 – 0,75

Grupo A: clampe arterial; Grupo AV: clampe arterial e venoso; DP: desvio padrão.

Boxplot do índice de resistência nos momentos de avaliação após o clampeamento, segundo o grupo de estudo.

Descrição do índice de pulsatilidade nos momentos de avaliação basal e após o clampeamento, segundo o grupo de estudo

Momentos de Avaliação basal e após o clampeamento (minutos)	Grupo			
	Clampeamento de Artéria renal (n=8)		Clampeamento de Artéria e Veia renal (n=9)	
	Média (DP)	Mínimo – Máximo	Média (DP)	Mínimo – Máximo
0	0,84 (0,41)	0,40 – 1,70	0,81 (0,16)	0,47 – 1,00
10	0,87 (0,45)	0,40 – 1,80	0,82 (0,18)	0,47 – 1,00
20	0,83 (0,31)	0,40 – 1,20	0,95 (0,13)	0,74 – 1,20
30	1,23 (0,28)	0,90 – 1,50	0,97 (0,22)	0,75 – 1,50
40	1,26 (0,28)	1,00 – 1,90	0,98 (0,20)	0,70 – 1,30
50	1,27 (0,36)	0,69 – 2,00	0,98 (0,21)	0,49 – 1,20
60	1,24 (0,19)	0,97 – 1,53	1,08 (0,30)	0,52 – 1,42
70	1,18 (0,09)	1,10 – 1,30	1,21 (0,49)	0,48 – 1,68
80	1,07 (0,24)	0,85 – 1,50	1,20 (0,37)	0,61 – 1,56
90	1,20 (0,31)	0,82 – 1,50	1,17 (0,45)	0,65 – 2,00

Grupo A: clampe arterial; Grupo AV: clampe arterial e venoso; DP: desvio padrão.

Boxplot do índice de pulsatilidade nos momentos de avaliação após o clampeamento, segundo o grupo de estudo.

Apêndice B. Descrição dos índices de resistência e pulsatilidade na reperfusão

Descrição dos índices de resistência e de pulsatilidade durante a reperfusão

	Tipo de clampeamento			
	Grupo A		Grupo AV	
	Média (DP)	Mínimo– Máximo (n)	Média (DP)	Mínimo – Máximo (n)
Índice de resistência				
Rim direito (controle)				
30 minutos	0,82 (0,17)	0,59 – 1,00 (n=6)	0,60(0,07)	0,50 – 0,68 (n=7)
60 minutos	0,73 (0,04)	0,70 – 0,77 (n=3)	0,54 (..)	0,50 – 0,57 (n=2)
Rim esquerdo (isquêmico)				
30 minutos	0,91 (0,12)	0,72 – 1,00 (n=7 [‡])	0,66 (0,13)	0,48 – 0,83 (n=7)
60 minutos	0,58 (0,06)	0,52 – 0,64 (n=3)	0,68 (..)	(n=1)
Índice de pulsatilidade				
Rim direito (controle)				
30 minutos	1,93 (0,95)	1,00 – 3,70 (n=6)	1,04 (0,19)	0,70 – 1,30 (n=7)
60 minutos	1,53 (0,51)	1,10 – 2,10 (n=3)	0,82 (..)	0,69 – 0,94 (n=2)
Rim esquerdo (isquêmico)				
30 minutos	2,01 (0,65)	1,36 – 3,22 (n=6)	1,13 (0,27)	0,73 – 1,50 (n=7)
60 minutos	0,97 (0,31)	0,70 – 1,30 (n=3)	1,27 (..)	(n=1)

Grupo A: clampe arterial; Grupo AV: clampe arterial e venoso; DP: desvio padrão; (...): não se aplica desvio padrão pelo número de observações; ‡: um animal avaliado aos 10 minutos de reperfusão.

Apêndice C. Descrição do número de biópsias com lesões

Descrição do número de biópsias com presença de lesões

Momento	Grupo			
	A (Isquêmico)	A (Não isquêmico)	AV (Isquêmico)	AV (Não isquêmico)
Basal	7 (17,5%)	4 (10,0%)	3 (7,5%)	4 (10,0%)
10 minutos	13 (32,5%)	8 (20,0%)	5 (12,5%)	3 (7,5%)
20 minutos	17 (42,5%)	12 (30,0%)	10 (25,0%)	8 (20,0%)
30 minutos	18 (45,0%)	17 (42,5%)	13 (32,5%)	11 (27,5%)
40 minutos	19 (47,5%)	16 (40,0%)	15 (37,5%)	11 (27,5%)
50 minutos	22 (55,0%)	18 (45,0%)	15 (37,5%)	12 (30,0%)
60 minutos	20 (50,0%)	18 (45,0%)	16 (40,0%)	15 (37,5%)
70 minutos	20 (50,0%)	20 (50,0%)	19 (47,5%)	14 (35,0%)
80 minutos	23 (57,5%)	21 (52,5%)	18 (45,0%)	15 (37,5%)
90 minutos	21 (52,5%)	18 (45,0%)	19 (47,5%)	12 (30,0%)

Grupo A: clampe arterial; Grupo AV: clampe arterial e venoso.