

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS BOTUCATU

EDUARDO PIOTTO LEONARDI

AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES FUNCIONAIS E HISTOLÓGICAS NA
ISQUEMIA RENAL, COMPARANDO-SE DUAS TÉCNICAS DE HIPOTERMIA.
ESTUDO EXPERIMENTAL EM SUÍNOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia, da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia

Orientador: Prof. Dr. João Luiz Amaro

Co-orientador: Prof. Dr. Oscar Eduardo H. Fugita

Botucatu
2007

“Tudo evolui; não há fatos eternos, como não há verdades absolutas”

Friedrich Nietzsche (1844-1900)

DEDICATÓRIA

AOS MEUS PAIS

Das conquistas que obtive, todas elas só foram possíveis porque aprendi com meus pais que nossos sonhos são atingidos se trilhados sobre os caminhos da honestidade, dedicação, perseverança e respeito

À LUCIANA, EDUARDO E PEDRO

Pela participação, atenção, compreensão, apoio e paciência em meus objetivos pessoais

Pelo constante companheirismo

AO MEU IRMÃO DANILO

Dedico este trabalho a quem me ensinou a valorizar a vida e suas pequenas coisas

Dedico ao sucesso de sua recuperação, à sua luta, dedicação e paciência.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa não seria possível apenas com a ajuda de algumas pessoas. Agradeço a todos que direta ou indiretamente estiveram envolvidos nesta pesquisa

Aos caros colegas Paulo Roberto Kawano, Juliany Quitzan e Rodrigo Artur Otsuka pela inestimável ajuda durante o desenvolvimento e execução da pesquisa, sem a qual seria impossível iniciar e terminar este trabalho, além da amizade, atenção, paciência e apoio durante o curso de pós-graduação

Aos colegas Marcelo Travassos e Leonardo Abreu pelo apoio e compreensão na resolução de questões que não pude resolver pessoalmente

Ao Prof. Dr. José Goldberg, Prof. Dr. Hamilto Akihissa Yamamoto e ao Prof. Dr. Carlos Márcio Nóbrega de Jesus, pela gentileza e atenção durante a fase de elaboração do projeto de pesquisa

Ao Dr. Luiz Carlos Correa, chefe do Laboratório de Cirurgia Experimental da Urologia, pela permissão e apoio durante a execução da pesquisa

Ao Prof. Dr. Makoto Sakate, radiologista, e ao seu Residente Eduardo, que contribuíram brilhantemente com a realização de ultra-sonografia renal em todos os animais do experimento

Aos colegas Lucas e Lindalva, funcionários do Laboratório de Cirurgia Experimental da Urologia e que participaram diretamente da execução da pesquisa, pelo apoio e paciência

A todos os colegas e profissionais do Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela gentileza, atenção e respeito com que me receberam durante minha passagem no Estágio de Videolaparoscopia Urológica e no curso de pós-graduação

Às Profa. Dra. Renée Laufer Amorim e a Dra. Marcela Marcondes Pinto Rodrigues, médicas patologistas veterinárias do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica de Botucatu, pela excelente e criteriosa análise histopatológica realizada durante a pesquisa

Em nome da Dra. Regina K. Takahira, agradeço a todos os colegas do Laboratório Clínico Veterinário, pelas análises bioquímicas das amostras de sangue e urina dos animais incluídos na pesquisa

Ao Prof. Dr. Dirlei Antonio Berto, docente do Departamento de Produção e Exploração Animal, pelo gentil empréstimo das gaiolas metabólicas que foram utilizadas para o condicionamento dos animais durante a pesquisa

Aos professores Adriano Dias e José Eduardo Corrente, e a todos os integrantes do Grupo de Apoio à Pesquisa (GAP), pela sincera crítica na análise e interpretação dos dados

A todos os colegas do laboratório de análises clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela análise das culturas de urina de todos os animais

A Equipe da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina pela disposição ao trabalho, pela gentileza e atenção com os pós-graduandos, em especial a LÍlian Cristina Nadal Bianchi Nunes, Regina Célia Spadin e Nathanael Pinheiro Salles

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

AO PROF. Dr. JOÃO LUIZ AMARO

*Por mais do que este trabalho, agradeço principalmente pela generosidade,
atenção e carinho com minha família no momento mais difícil de nossas vidas*

*Por permitir a criação do Grupo de Cirurgia Videolaparoscópica do
Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina de Botucatu*

AO PROF. Dr. OSCAR EDUARDO HIDEOTOSHI FUGITA

Pela honestidade, ética, caráter, inteligência e respeito por seus colegas

Pela paciência, atenção, estímulo e sinceridade

Pelo inestimável apoio e ensinamentos em Videolaparoscopia Urológica

Trabalho realizado no Laboratório de Cirurgia
Experimental, Departamento de Urologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP,
Botucatu, São Paulo

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	1
Lista de tabelas.....	2
Lista de Abreviaturas	3
Resumo.....	5
I. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
1. Introdução.....	7
2. Carcinoma de células renais – tratamento.....	7
2.1. Nefrectomia Radical.....	7
2.2. Nefrectomia Parcial.....	8
2.2.1. Indicações imperativas.....	8
2.2.2. Indicações eletivas.....	9
2.2.3. Complicações.....	11
2.3. Nefrectomia Parcial Videolaparoscópica (NPL).....	11
2.3.1 Limitações da NPL.....	11
2.3.2 Complicações.....	13
3. Isquemia renal.....	13
3.1. Fisiopatologia da lesão de isquemia e reperfusão.....	13
3.2. Tempo de isquemia quente (IQ).....	16
3.3. Medidas de proteção da função renal durante IQ.....	17
4. Hipotermia.....	18
4.1. Temperatura ideal e tempo de proteção.....	19
4.2. Técnicas de hipotermia.....	19

4.2.1 – Intravascular.....	19
4.2.2 – Perfusão retrógrada de solução salina fria transureteral.....	20
4.2.3 – Gelo Moído (ice slush).....	20
4.3 – Hipotermia na NPL (técnicas).....	20
4.3.1 – Intravascular.....	21
4.3.2 – Perfusão retrógrada de solução salina fria transureteral.....	21
4.3.3 – Gelo moído (ice slush).....	21
5. Referências Bibliográficas.....	24
II. MANUSCRITO 1 - “Avaliação das alterações funcionais e histológicas na isquemia renal, comparando-se duas técnicas de hipotermia. Estudo experimental em suínos”	45
III. MANUSCRITO 1 “Evaluation of the functional and histological alterations in the renal ischemia by the comparison of two hypothermal techniques. Experimental study in pigs ”	71
IV. ANEXOS	96
1. Aprovação do Comitê de Ética de Animais	96
2. Instruções para autores do International Brazilian Journal of Urology.....	97

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Incisão tipo Gibson	57
FIGURA 2.	Instrumentos. (A) ultra-som portátil; (B) termômetro eletrônico.....	58
FIGURA 3.	Agulhas do termômetro nas camadas cortical e medular orientado por ultra-som. (A) colocação das agulhas; (B) controle da posição com ultra- som.....	59
FIGURA 4.	Grupo 1. (A) cateter ureteral duplo lúmen; (B) disposição dos instrumentos na sala de cirurgia.....	60
FIGURA 5.	Experimento do Grupo 2.....	61
FIGURA 6.	Grupo 3 (com isquemia quente) e 4 (sem isquemia e sem hipotermia) .	62
FIGURA 7.	Comportamento da temperatura (em média) nas camadas cortical medular nos 4 grupos do estudo.....	63
FIGURA 8.	Comportamento da diurese durante o experimento.....	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Média dos valores de creatinina e uréia entre os grupos	65
TABELA 2.	Alterações celulares na microscopia óptica (média de pontos para cada variável entre os grupos).....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP:	adenosina difosfato
AMP:	adenosina monofosfato
ATP:	adenosina trifosfato
°C:	grau centígrado (Celsius)
Ca ²⁺ :	Cálcio
CO ₂ :	dióxido de carbono
°C/min:	grau centígrado por minuto
CCR:	carcinoma de células renais
CON:	congestão celular
Cr:	creatinina
DET:	degeneração do epitélio tubular
DT:	dilatação tubular
FR:	French
H ₂ O:	água
HT:	hiperplasia tubular
IF:	Isquemia Fria
IMN:	infiltrado mononuclear
IQ:	isquemia quente
IRA:	insuficiência renal aguda
K ⁺ :	potássio
Kg:	kilograma
LTB ₄ :	leucotrieno B ₄
LTC ₄ :	leucotrieno C ₄
LTD ₄ :	leucotrieno D ₄
LTE ₄ :	leucotrieno E ₄
mg/dl:	miligrama por decilitro
MHz:	megahertz
ml/min:	mililitros por minuto
Na ⁺ :	sódio
Na-K-ATPase:	sódio-potássio ATPase
N ₂ O ₃ :	óxido nitroso
NO ₃ ⁻ :	nitrato
NP:	nefrectomia parcial
NPA:	nefrectomia parcial aberta
NPL:	nefrectomia parcial laparoscópica
NR:	nefrectomia radical
NT:	necrose tubular
O ₂ :	oxigênio
ONOO ⁻ :	peróxinitrito
p:	nível de significância
PGE ₁ :	prostaglandina 1
PGE ₂ :	prostaglandina 2
PI:	pólo inferior

PLT:	proteína na luz tubular
PO:	pós-operatório
Pre-op:	pré-operatório
PS:	pólo superior
RTL:	recorrência tumoral local
SCE:	sobrevida câncer específica
SOD:	superóxido dismutase
T1:	estadio patológico 1 (TNM)
T2:	estadio patológico 2 (TNM)
TC:	tomografia computadorizada
US:	ultra-som
XO:	xantina oxidase
XD:	xantina desidrogenase
1°PO:	primeiro dia de pós-operatório
5°PO:	quinto dia de pós-operatório
3-D:	3 dimensões
%:	porcentagem

REVISÃO DE LITERATURA

RESUMO

INTRODUÇÃO E OBJETIVO

Cirurgias renais como nefrectomias parciais, transplante renal e cirurgia renovascular são situações clínicas que freqüentemente exigem a interrupção transitória do fluxo sanguíneo renal. A hipotermia renal é um dos métodos de preservação da função renal mais eficiente para se proteger as células renais das lesões de isquemia e reperfusão. O objetivo deste estudo foi comparar a técnica de hipotermia renal com gelo e a técnica de resfriamento renal retrógrado de solução salina à 4°C na via excretora.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 24 porcos machos entre 15 e 20 Kg, divididos em 4 grupos. Foram coletadas amostras de sangue e urina no dia anterior ao experimento e no 1° e 5° dia pós-operatório (PO), a fim de se medir creatinina e uréia, e se obter cultura de urina e débito urinário. Todos os animais foram submetidos à nefrectomia direita e, no rim esquerdo, foram aferidas as temperaturas do córtex e medula renal durante 60 minutos. Grupo 1(8): hipotermia retrógrada com solução salina à 4°C por meio de cateter ureteral duplo lúmen com obstrução do pedículo renal; grupo 2 (8): hipotermia com gelo e isquemia renal; grupo 3 (4): apenas isquemia quente e grupo 4 (8): controle. Os animais foram sacrificados no 5° dia e os espécimes cirúrgicos submetidos à análise histológica de microscopia óptica (MO).

RESULTADOS

Todas as culturas de urina foram negativas. No grupo 1, em média, as temperaturas mínimas das camadas medular e cortical foram respectivamente 24,9 e 25,4°C e no grupo 2, foram 6,38 e 5°C. Para as variáveis uréia e creatinina, foi aplicada análise de variância e para a histologia, o teste exato de Fisher. Tanto na comparação entre os grupos 1 e 2, quanto na comparação isolada de cada um deles com o grupo controle, não se encontraram diferenças funcionais e histológicas estatisticamente significativas. Os animais do grupo 3, submetidos a 60 minutos de isquemia quente (IQ), não apresentaram alterações funcionais ou histológicas acentuadas. As alterações produzidas neste grupo foram estatisticamente semelhantes às encontradas nos outros grupos.

CONCLUSÃO

Apesar deste trabalho não ter mostrado diferença significativa entre os métodos de hipotermia, teoricamente a técnica de hipotermia renal de contato com gelo moído é melhor do que a de resfriamento retrógrado por infusão de solução salina à 4°C na via excretora, pois permite obter temperaturas abaixo de 15-20°C na córtex renal. A ausência de diferença estatística significativa nos parâmetros clínicos entre os grupos pode ser atribuída ao tempo de IQ realizado e/ou ao modelo animal utilizado. Tempos de IQ superiores a 90 minutos no modelo suíno podem ser necessários para causar as alterações celulares funcionais causadas pela IQ.

1 – INTRODUÇÃO

O carcinoma de células renais (CCR) é responsável por 3% dos tumores malignos do adulto e é o mais letal dos cânceres urológicos, com taxa de mortalidade de 40%. A distribuição entre os sexos é de três homens para cada duas mulheres, incidindo na sexta e sétima décadas da vida. Um aumento na incidência desta neoplasia vem ocorrendo desde a década de 1970, numa média de 3% ao ano para brancos e 4% ao ano para negros americanos, resultando em mais de 35000 novos casos e mais de 12000 mortes nos EUA. Atualmente, mais que 60% dos tumores renais são detectados incidentalmente.¹ Isto se deve ao maior uso dos métodos de diagnóstico por imagem como ultra-sonografia (US) e tomografia computadorizada (TC), realizados para a avaliação de diversas queixas gastrointestinais.^{2,3}

2 – CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS – TRATAMENTO

2.1 – *Nephrectomia Radical (NR)*

O tratamento tradicional para massas renais é a nefrectomia radical (NR), que foi descrita por Robson em 1969 e consiste na ligadura precoce da artéria e da veia renal, ressecção em bloco de todo o rim envolvido pela Fáscia de Gerota juntamente com a glândula supra-renal ipsilateral e completa linfadenectomia regional, da crura do diafragma até a bifurcação da aorta.⁴ Entretanto, há controvérsias à respeito desta prática para todos os pacientes. A remoção da glândula adrenal não é rotineiramente necessária em pacientes que apresentam ausência radiográfica de seu comprometimento, sendo necessária apenas nos pacientes que apresentam tumor com envolvimento renal extenso

ou localizado no pólo superior do rim.^{5,6,7} A necessidade de linfadenectomia completa em todos os pacientes ainda está indeterminada, mesmo que alguns estudos sugiram que pacientes com envolvimento linfonodal com micrometástases se beneficiem.^{8,9} Robson apresentou taxa de sobrevida global após NR de 66% e 64% para estadio I e II, respectivamente.⁴ Publicações mais recentes indicam taxas de sobrevida em 5 anos maiores que 75% para estadio I (T1-T2).^{8,10,11}

2.2 – Nefrectomia Parcial (NP)

A técnica da NP consiste na mobilização de todo o rim e dissecação do pedículo renal e clampeamento da artéria renal para melhor controle da hemostasia durante a remoção do tumor. Nos casos de ressecção de tumores complexos, é prudente a aplicação de hipotermia renal utilizando-se gelo moído (ice slush) imediatamente após a oclusão do fluxo sanguíneo renal, de maneira que o gelo envolva todo o rim por 10 a 15 minutos antes do início da ressecção, promovendo proteção renal por até 3 horas de isquemia.^{12,13}

2.2.1 – NP: Indicações Imperativas

Atualmente, a NR vem sendo substituída por alternativas menos radicais e menos invasivas em pacientes selecionados.¹² A nefrectomia parcial (NP) é uma opção em casos de CCR bilateral ou em rim único, e nos casos de CCR unilateral com o rim oposto afetado por uma condição que possa comprometer sua função no futuro, como diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica, litíase renal, estenose de junção uretero-piéllica (JUP), cistos renais múltiplos ou estenose de artéria renal.¹³

Os resultados são similares aos da NR, particularmente para CCR de baixo estadio.¹⁴⁻¹⁶ As taxas de sobrevida câncer específica (SCE) variam de 78% a 100%.¹⁷⁻³⁵ A principal desvantagem da NP é o risco de recorrência tumoral local (RTL). Hafez *et al*

analisaram o padrão de recorrência do tumor após NP em 327 pacientes com CCR esporádico. Recorrência ocorreu em 38 pacientes (11,6%), incluindo 13 pacientes (4%) que desenvolveram RTL e 25 pacientes (7,6%) que desenvolveram doença metastática. A incidência de RTL e doença metastática de acordo com o estadiamento patológico inicial foram: 0% e 4,4% para tumores T1N0M0, 2% e 5,3% para T2N0M0, 8,2% e 11,5% para T3aN0M0, e 10,6% e 14,9% para tumores T3bN0M0.³⁶

A vantagem da NP nestes casos é permitir a ressecção do tumor e ao mesmo tempo a preservação de parte do tecido renal, diminuindo o risco de diálise permanente. Pacientes com CCR em rim solitário que serão submetidos a NP devem ser alertados para a possibilidade de diálise temporária ou permanente no pós-operatório que pode ocorrer em 8% e 4% dos casos, respectivamente. Após a NP, uma função renal remanescente de pelo menos 20% de um rim normal é necessária para que não ocorra insuficiência renal terminal.³⁷

Em pacientes que permaneceram com uma pequena área de tecido renal tem o risco de desenvolver prejuízo da função renal à longo prazo devido à lesão renal de hiperfiltração. Pacientes que tiveram uma redução de mais que 50% da massa renal tem maior risco de desenvolver proteinúria, glomerulosclerose segmentar focal e insuficiência renal progressiva.³⁸

2.2.2 – Indicações Eletivas

Apesar de a NR ser bem indicada para pacientes com CCR unilateral e rim contra-lateral normal, estudos da última década tem mostrado resultados excelentes com a NP em casos selecionados.^{23-34,39,40,41} Licht *et al* em 1994, revisaram resultados da NP em 216 pacientes com CCR esporádico e encontraram que a SCE em 5 anos foi

significativamente maior nos casos de tumores menores que 4 cm. Neste estudo não houve recorrência tumoral e a sobrevida em 5 anos foi de 100%.⁴² Dois estudos comparando NR *versus* NP obtiveram resultados equivalentes em pacientes com CCR esporádico pequeno, único e unilateral. Butler *et al* observaram taxas de SCE em 5 anos para NR e NP de 97% e 100%, respectivamente.⁴³ Lerner *et al*, obtiveram taxas de SCE em 5 anos de 96% e 92%, respectivamente.⁴⁴ Hafez *et al* compararam tumores incidentais periféricos e centrais tratados com NR e NP, e não houve diferença na SCE em 5 anos entre tumores centrais e periféricos (100% versus 97%) e na taxa de recorrência (5,7% versus 4,5%).⁴⁵ Em metanálise com 611 pacientes, a SCE variou de 90 a 100% e a taxa de RTL variou de 0% a 7,3%.^{20-33,39,40}

Além dos resultados oncológicos equivalentes, a NP apresentou outras potenciais vantagens sobre a NR:

- existe uma diminuição na probabilidade de progressão para insuficiência renal se comparada à NR por poupar um maior número de néfrons;^{45,46}
- evitam-se nefrectomias desnecessárias, já que 10-15% das lesões renais sólidas encontradas em TC de abdômen são benignas, e este número aumenta para 20% nos casos de tumores menores que 4cm;^{47,48}
- existe o risco de aparecimento de tumor no rim contralateral. Kletscher *et al* mostraram que CCR pode ser multifocal em mais que 16% dos casos e que o tumor tem chance de 7% de recorrer no rim contra-lateral.⁴⁹ Dretch *et al* encontraram 4% de recorrência tumoral no rim contra-lateral após 12,3 anos de seguimento em 1213 pacientes submetidos a NR.⁵⁰

2.2.3 - Complicações

Campbell *et al* observaram taxa de complicação de 30,1%. As complicações mais comuns foram fistulas urinárias e insuficiência renal aguda (IRA). O fator predisponente mais significativo para formação de fístulas incluem tumor central e maior que 4 cm. Os fatores predisponentes mais importantes para IRA foram rim único, tumor maior de 7cm, excisão de mais do que 50 % do parênquima renal, tempo de isquemia maior do que sessenta minutos e cirurgia ex-vivo.³⁷

2.3 – Nefrectomia Parcial Videolaparoscópica (NPL)

Nos últimos anos, técnicas minimamente invasivas mais conservadoras têm surgido como a nefrectomia parcial laparoscópica (NPL), a crioablação e a radiofrequência.⁵¹⁻⁵³ A NP foi duplicada para via laparoscópica, baseando-se nos mesmos princípios da cirurgia aberta.⁵⁴ A NPL, inicialmente era indicada para tumores pequenos, exofíticos e de fácil acesso e ressecção. Com a experiência adquirida nestes casos iniciais, a indicação foi expandida para tumores maiores e de difícil localização.⁵⁵

O sucesso técnico da NPL depende de um campo operatório com pouco sangue. Para isto, é necessário conhecer bem a anatomia renal bem como a posição do tumor na avaliação pré-operatória. Novas modalidades de imagem como o ultra-som Doppler com contraste e a TC helicoidal com contraste em 3-D vem sendo utilizadas para se obter uma avaliação mais acurada da anatomia do parênquima, dos vasos renais e do tumor no pré-operatório.⁵⁶⁻⁵⁸

2.3.1 – Limitações da NPL

A NPL apresenta dificuldades relacionadas ao fechamento do sistema coletor e ao acesso à profundidade exata da ressecção do tumor.⁵⁵ Durante a ressecção do tumor pode

haver abertura da via excretora e conseqüente evolução com fístula urinária no pós-operatório, que ocorre principalmente nos casos de tumores centrais e maiores de 4 cm.⁶⁸ Após 771 NPL e 1028 nefrectomias parciais abertas (NPA), Gill *et al* encontraram fistulas urinárias como complicação pós-operatória em 3,1 e 2,3% dos casos, respectivamente.⁵⁹

Hemostasia eficaz e prevenção de fístulas urinárias podem ser obtidas por sutura intracorpórea com aproximação das bordas da ressecção e fechamento da via excretora. Isto requer habilidades laparoscópicas avançadas. A obtenção da hemostasia está diretamente relacionada ao tamanho e à localização do tumor.^{59,60} Para o tratamento de tumores menores que 2 cm, exofíticos e unifocais a NPL pode ser realizada sem clampeamento dos vasos renais. Entretanto, isto aumenta o risco de hemorragia intra-operatória e exige o uso prolongado de cautérios monopolar ou bipolar.^{61,62} Eventualmente, a superfície de corte com sangue pode dificultar a distinção entre o tumor e tecido renal normal, comprometendo sua completa ressecção. Em um estudo retrospectivo comparando NPL com e sem clampeamento vascular, Guillonneau *et al* mostraram que o uso do clampe vascular durante a ressecção do tumor e a sutura do parênquima renal foi associado com menor perda de sangue e menor tempo cirúrgico.⁶³

Vários métodos adjuvantes, como a cola biológica de fibrina, foram desenvolvidos para auxiliar na hemostasia após a ressecção do tumor, mas a sutura intracorpórea com aproximação do parênquima renal permanece a maneira mais eficiente de hemostasia durante a NPL.⁶⁴ Embora a NPL possa ser realizada sem o clampamento vascular, ele é necessário nos casos de tumores centrais e maiores que 4 cm.⁶³

2.3.2 – Complicações

Após 200 casos, Ramani *et al* mostraram que a incidência de complicações foi de 33%, sendo 5,5% intra-operatórias, 12% pós-operatórias precoces e 15,5% tardias após NPL, sendo que hemorragia foi a complicação intra-operatória mais comum.⁶⁰ Gill *et al* reuniram dados de 1800 pacientes de três grandes instituições americanas comparando a NPL e a NPA, e as taxas de complicações pós-operatórias foram de 24,9% para NPL e 19,2% para NPA. As taxas de hemorragia intra-operatória e pós-operatória para NPL e NPA foram de 3,4% e 5,8%, e 1,6% e 4,2%, respectivamente.⁵⁹

3 – ISQUEMIA RENAL

Tanto para hemostasia do parênquima renal quanto para o fechamento da via excretora, isquemia renal pode ser necessária e o tipo de oclusão vascular e o tempo de isquemia podem afetar o grau de lesão de isquemia e reperfusão. Sabe-se que a oclusão contínua da artéria renal lesa menos o rim do que a oclusão contínua do pedículo, mas o que mais prejudica a função renal é o clampeamento intermitente tanto da artéria quanto do pedículo renal.⁶⁵⁻⁶⁷

3.1 – Fisiopatologia da lesão de isquemia e reperfusão

Para entender a lesão de isquemia e reperfusão é preciso conhecer a fisiologia renal na ausência de isquemia. Sob condições normais, a disponibilidade e o consumo de oxigênio (O₂) diminuem da camada cortical para a papila renal devido a fatores locais como pH, hematócrito, fluxo sanguíneo, difusão de O₂ e temperatura.⁶⁸ A lesão de isquemia e reperfusão ocorre por meio de três vias metabólicas: a via da xantina oxidase, a do ácido aracdônico e a do óxido nítrico. Parekh e Veith, em um estudo em ratos,

avaliaram o consumo de oxigênio e a hemodinâmica renal e verificaram, durante a fase de isquemia, que a queda do fluxo sanguíneo cortical provocou apenas uma redução parcial na taxa de filtração glomerular, concluindo que outros fatores como lesão e obstrução tubular contribuíram para a manifestação da IRA.⁶⁹ Miller *et al*, em um modelo canino, estudaram a distribuição do fluxo sanguíneo cortical em rins submetidos a um tempo de IQ antes da preservação renal em soluções frias, utilizando o método de microesferas radioativas, e verificaram que a maior alteração foi a redução do fluxo cortical.⁷⁰ Essas alterações na hemodinâmica e no metabolismo celular renal levam à lesão de reperfusão das células da borda em escova do túbulo contornado proximal, que são as primeiras a sofrerem com a ausência de O₂.^{71,72}

Xantina Oxidase: durante a fase de isquemia, a queda do oxigênio tecidual, leva à diminuição da produção e estoque de adenosina trifosfato (ATP), que continua sendo consumida e degradada à adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP) e, posteriormente, em adenosina, inosina e hipoxantina.⁷³ A falta de energia celular causa a falência da bomba de sódio-potássio (Na⁺/K⁺), levando acúmulo de Na⁺ intracelular e perda de K⁺ para fora da célula, com conseqüente edema celular e de suas organelas. Concomitantemente, ocorre influxo de Ca²⁺ e de cloreto para o intracelular, e esse acúmulo de Ca²⁺ provoca a ativação de proteases que convertem a enzima xantina desidrogenase (XD) em xantina oxidase (XO). Na fase de reperfusão, sob ação da XO, a hipoxantina é oxidada à xantina, que tem como subprodutos desta reação o ácido úrico e o ânion superóxido.⁷⁴ Este é instável, e transforma-se em peróxido de hidrogênio espontaneamente ou pela ação da superóxido dismutase (SOD), e o peróxido de hidrogênio, por sua vez, é transformado em água (H₂O) e oxigênio. O radical superóxido

promove a liberação do íon ferroso da ferritina, o qual reage com o peróxido de hidrogênio, formando o altamente tóxico radical hidroxila.⁷⁵ Os radicais livres tem sua mais alta produção nas células da borda em escova do túbulo contornado proximal, local onde também há a maior concentração de xantina oxidase. Esses radicais, e em particular, o radical hidroxila, iniciam a lipoperoxidação das membranas celulares ativando a via do ácido aracdônico.⁷³

Via do ácido aracdônico: o ácido aracdônico é metabolizado pela cicloxigenase em tromboxano, prostaglandinas PGE1 e PGE2, ou pela lipoxigenase, em leucotrienos LTB4, C4, D4 e E4.⁷³ Os radicais livres podem também atuar de forma indireta, atraindo e ativando neutrófilos que secretam enzimas proteolíticas (mieloperoxidases, elastases, proteases, etc.), sintetizam prostaglandinas e liberam mais radicais livres, além de ocluírem a micro-circulação na fase de reperfusão, dificultando o fluxo sangüíneo (*no-reflow phenomenon*).⁷⁶ A lesão endotelial faz com que as arteríolas de rins pós isquêmicos tenham um aumento do tônus vascular e da reatividade aos agentes vasoconstritores (angiotensina II, tromboxano A₂, leucotrienos, adenosina, endotelina-1), e uma diminuição da resposta aos agentes vasodilatadores.⁷⁷

Via do óxido nítrico: formado a partir da L-arginina pelo óxido nítrico sintetase, ao nível do endotélio microvascular, age como detoxificador do radical superóxido formando nitrato (NO₃⁻), a partir da decomposição de peroxinitrito (ONOO⁻), produto de formação transitória ou através da formação de óxido nitroso (N₂O₃), em presença de oxigênio e água. Porém, acredita-se que este mecanismo de proteção do óxido nítrico esteja prejudicado devido a uma possível inibição do óxido nítrico sintetase.⁷⁸

Todos os eventos citados levam a uma vasoconstrição persistente com conseqüente redução na taxa de filtração glomerular.⁷⁹

3.2 – Tempo de isquemia quente (IQ)

O tempo de IQ que um rim de mamífero suporta pode variar com a espécie. Ratos suportam até 2 horas de IQ e acima de 3 horas, 50% dos animais morrem.⁸⁰ Em coelhos, mais do que 2 horas de IQ é uniformemente fatal, e em ovelhas, IQ de até 90 minutos é bem tolerado.^{81,82} Estudos das décadas de 1960 e 1980 concluíram que 30 minutos é o tempo máximo de IQ para que não ocorra insuficiência renal irreversível em humanos, considerando estudos com vários modelos animais.^{83,84} Wickham *et al* em 1967, após uma revisão de literatura em que considerou estudos que avaliavam aspectos histológicos e fisiológicos da IQ, estimou que rins submetidos a até 30 minutos de isquemia quente eram capazes de recuperar sua função em 8 a 9 dias, mesmo apresentando uma queda de função de 60-70%. Após este período, alguns rins já apresentavam lesão irreversível e, após 3 horas de isquemia a queda de função era completa, não havendo a possibilidade de recuperação.⁸³ Por outro lado, estudos recentes realizados em suínos demonstraram que estes animais suportam um tempo de IQ superior a 90 minutos, tanto em cirurgias abertas quanto laparoscópicas.^{85,86} Apesar de o rim do suíno ter características anatômicas muito semelhantes ao rim humano, pode ser que não haja a mesma correspondência em relação à função renal.⁸⁷

Em cães, alguns estudos mostram mínima depressão da função renal após 2 horas de IQ, enquanto outros estudos observaram diminuição permanente da função renal após 2 horas e resultados fatais após 3 horas de IQ.⁸⁸⁻⁹¹

Thompson *et al*, em um estudo retrospectivo em humanos, avaliaram o impacto do tempo de isquemia em pacientes com rim único, submetidos à nefrectomia parcial aberta e concluíram que 20 e 35 minutos são os tempos máximos que rins solitários toleram de IQ e isquemia fria (IF), respectivamente.⁹² Entretanto, Semb ocluiu a artéria renal por 90 minutos sem evidência de lesão renal.⁹³ Ellis *et al* ressecaram aneurisma da aorta abdominal que envolveu a artéria renal direita em um tempo de 95 minutos, resultando em perda temporária da função renal, mas com recuperação total em 2 semanas.⁹⁴

3.3 – Medidas de proteção da função renal durante IQ

Nas cirurgias renais em que o tempo IQ é prolongado, substâncias que atuam em uma das vias metabólicas da lesão de isquemia e reperfusão ou técnicas de hipotermia renal que visam diminuir o metabolismo celular com ação tanto nas fases de isquemia quanto de reperfusão, são utilizadas para preservar a função renal.

Várias drogas podem ser utilizadas associadas a soluções de perfusão hipotérmicas em rins pré transplante. A quinacrina, um anti-malárico, é um inibidor específico da fosfolipase A₂ e apresenta benefícios se administrada desde a fase de isquemia e não apenas na fase de reperfusão.⁹⁵ A clorpromazina tem efeito protetor atuando como bloqueador do canal de cálcio, inibidor de fosfolipases e inibindo a Na-K-ATPase, principalmente se associada à hipotermia.⁹⁶ A glicina tem efeito protetor quando associada a solução de Collins também na fase de isquemia.⁹⁷ A trimetazidina é utilizada para prevenção de angina cardíaca, estimulando o metabolismo celular durante fases de isquemia. Associada às soluções de Wisconsin ou de Collins, promove significativa proteção contra lesão de reperfusão.⁹⁸ O bloqueador do receptor de endotelina atua

prevenindo sua ação vasoconstritora e melhorando a função renal em 2 semanas após o transplante.⁹⁹ Fernando *et al* mostraram que a administração intra-arterial de inosina na fase de isquemia melhora a preservação da função renal.¹⁰⁰ Marberger *et al*, mostraram que a inosina tem efeito protetor isolado apenas em situações que exigem curto período de IQ e, nos casos em que o tempo de IQ for mais prolongado, a hipotermia deve ser associada.¹⁰¹ Greenstein *et al* mostraram que a hipotermia regional é melhor que a inosina ou a combinação de inosina e hipotermia para preservar a função renal.¹⁰² O estudo de Marthur e Ramsey confirmam estes achados após compararem 3 métodos de preservação da função renal. Mostraram que a inosina teve um efeito protetor igual à hipotermia até 60 minutos, mas a proteção foi um pouco menor até 90 minutos.¹⁰³ A maioria destas drogas é utilizada associada a soluções de perfusão em transplantes renais de cadáver, em que o tempo de isquemia é prolongado. Em cirurgias renais ablativas como a NPA ou NPL, a hipotermia é superior a todos os outros métodos de preservação renal.¹⁰²⁻¹⁰³

4 - HIPOTERMIA

A hipotermia é um excelente método para diminuir o metabolismo renal e o consumo de oxigênio, protegendo os nefrões tanto nas fases de isquemia quanto de reperfusão, entretanto, o seu maior efeito protetor ocorre na fase de isquemia. Na fase de reperfusão a temperatura mais baixa também confere proteção, mas com menor efeito, e sua aplicação deve ser iniciada até 30 minutos do início da IQ.¹⁰⁴ A IF diminui o fluxo sanguíneo cortical, diferindo da IQ, em que existe aumento do fluxo sanguíneo cortical significativo.¹⁰⁵ A atividade metabólica é quase completamente suspensa com temperaturas entre 5 e 20°C.^{83,106} Uma redução na temperatura renal de 10 e 20°C

diminui o consumo de oxigênio para 75 e 85% do normal, enquanto que a 7°C, 93% da respiração celular é inibida.^{107,108}

4.1 – Temperatura ideal e tempo de proteção

O efeito máximo de preservação das células renais depende do grau da temperatura e da técnica de hipotermia aplicada. Stueber *et al* confirmaram o efeito protetor da hipotermia em temperaturas de 0 a 5°C.¹⁰⁹ Mitchell e Woodruff obtiveram proteção das células renais à temperaturas abaixo de 10°C.¹¹⁰ Luttrap *et al*, em um modelo suíno, apresentaram preservação da função glomerular e tubular com temperaturas entre 16 e 18°C com até 3 horas de IF.¹¹¹ Cocket *et al*, em um estudo em cães, obtiveram bons resultados até 2 horas de IF à 18°C.¹¹² Wickham *et al*, mostraram que entre 15° e 20°C, rins de coelhos não apresentam alterações funcionais, mesmo por períodos de até 3 horas de IQ.⁸³ Mas foi Ward, em um modelo canino, que sugeriu como 15°C a temperatura ideal para proteção renal.¹⁰⁶

4.2 – Técnicas de hipotermia

4.2.1 - Intravascular

Estudos clínicos e experimentais propuseram vários métodos para se obter hipotermia. A perfusão hipotérmica intravascular, com solução salina ou sangue autólogo frios, pode ser realizada por meio de cateter com balão via femoral ou por punção direta da artéria renal. As vantagens são a rápida, efetiva e uniforme obtenção da hipotermia, sem que o sangue ou gelo atrapalhem a visão da ressecção do tumor, como ocorre na técnica de resfriamento externo com gelo. As desvantagens são o potencial risco de lesão e trombose da artéria renal, seqüela no local de punção da artéria femoral, possibilidade de deslizamento do cateter, o aumento de custos por envolver radiologia intervencionista

e a presença de artérias renais múltiplas, de pequeno diâmetro, aberrantes ou com aterosclerose.¹¹³⁻¹¹⁵

4.2.2 – *Perfusão retrógrada de solução salina fria transureteral*

Perfusão transpélvica ou transureteral foram propostas para se atingir hipotermia renal, mas apresentam a desvantagem de resfriar inadequadamente o córtex renal.^{116,117}

4.2.3 – *Gelo moído (ice slush)*

A técnica de resfriamento externo do parênquima renal é atraente porque não apresenta risco de lesão vascular. Várias técnicas foram desenvolvidas tanto em estudos experimentais quanto clínicos, mas muitos deles utilizam aparelhos complexos que não estão disponíveis rotineiramente nas salas cirúrgicas.^{83,106,111,112,118-120} Tradicionalmente, a técnica de hipotermia com gelo moído (ice slush) é o método de escolha na NPA.⁸⁴ Ela é aplicada envolvendo-se o rim com um plástico, criando um reservatório para colocação do gelo moído em contato direto com o parênquima renal.^{119,120} As vantagens são o rápido resfriamento renal, fácil aplicação e o uso de materiais facilmente encontrados na sala de cirurgia. Metzner *et al*, em um estudo retrospectivo em humanos, observaram que temperaturas do córtex renal abaixo de 5°C são comuns com o uso desta técnica e que isto não compromete a função renal.¹¹⁹ Wickham *et al* demonstraram pouca variação da função renal em temperaturas entre 5 e 30°C com 45 minutos de IF.⁸³ Por outro lado, Ward mostrou que temperaturas abaixo de 15°C podem prejudicar a função renal.¹⁰⁶ Mitchell e Woodruff observaram infartos periféricos em rins de ovelhas em temperaturas abaixo de 10°C.¹¹⁰

4.3 – *Hipotermia na NPL (técnicas)*

Todas estas técnicas descritas anteriormente foram duplicadas para a NPL.

4.3.1 – Intravascular

Janetschek *et al*, duplicaram a técnica de perfusão arterial de solução salina fria atingindo preservação eficaz da função renal, mas apresentando os mesmos riscos de lesão vascular quando utilizada em cirurgias abertas.¹²¹

4.3.2 – Perfusão retrógrada de solução salina fria transureteral

Landman *et al* propuseram a técnica de hipotermia por perfusão transureteral de solução salina à 4°C que apresenta a vantagem de aplicação por via endoscópica de materiais rotineiramente disponíveis em salas cirúrgicas.¹²² Esta técnica resfriou mais a camada medular do que a cortical, o que leva à possibilidade de proteção inadequada das células da borda em escova dos túbulos proximais. As temperaturas medular e cortical mínima obtida foram 21,3 e 27,3°C. Além disso, durante a NPL para um tumor que infiltra o sistema coletor, pode ocorrer abertura da via excretora logo no início da ressecção, o que conduz a perda do líquido da perfusão transureteral, comprometendo o resfriamento renal no decorrer da cirurgia.

4.3.3 – Gelo moído (*ice slush*)

Gill *et al* duplicaram a técnica aberta de hipotermia com gelo moído (*ice slush*), para a NPL, em que uma bolsa plástica é introduzida por meio de um portal laparoscópico envolvendo o rim, o que cria um reservatório para a colocação do gelo.¹²³ Logo após esta etapa, um clampe vascular interrompe o fluxo sanguíneo renal, e depois de 10 minutos de hipotermia, o envoltório plástico é aberto e apenas o gelo ao redor do tumor é retirado, mantendo o restante do parênquima em contato com o gelo. A temperatura do parênquima renal diminuiu a um nadir de 5 a 19,1°C em cinco pacientes.

Em três destes pacientes, as temperaturas ao término da NPL, logo antes da liberação do clampe vascular, eram 19, 19,5 e 23,8°C após 43, 48 e 44 minutos de isquemia, respectivamente. Apesar de ser uma técnica segura e eficaz, merece algumas ressalvas técnicas:

- para colocação da bolsa plástica, o rim e todo o pedículo devem estar totalmente dissecados e mobilizados. Se isto não ocorrer, a bolsa pode deslizar e parte dela ficar presa entre o clampe vascular e o hilo renal, o que pode causar inadequada oclusão dos vasos renais.

- para exteriorização da bolsa, o portal para-retal deve ser alargado com cuidado para que sua abertura não seja excessiva, pois isto pode causar vazamento de CO₂ do pneumoperitônio.

- o clampe vascular deve ser fechado antes da exteriorização da bolsa porque a oclusão do hilo renal após a colocação do gelo é tecnicamente difícil e pouco confiável. A bolsa cheia de gelo impede quase que completamente a visibilidade dos vasos renais, o que pode exigir manobras laparoscópicas adicionais.

Embora exista a limitação de seu uso em NPL retroperitonioscópicas devido ao espaço de trabalho reduzido, Wakabayashi *et al* relataram dois casos em que utilizaram o um aparelho cilíndrico de 3 cm de diâmetro para colocação de gelo moído diretamente no retroperitônio, por meio de um dos portais laparoscópicos.¹²⁴ Em um dos pacientes a temperatura mínima atingida foi de 18,4°C, mas no outro foi de 25,8°C. Isto ocorreu porque a gordura peri-renal no pólo superior estava aderida ao peritônio. Talvez, o espaço reduzido deste acesso limite o plano de dissecção adequado para mobilizar totalmente o rim, para que permita um resfriamento completo de todo o parênquima.

Além disso, a abertura inadvertida do peritônio pode permitir a entrada do gelo dentro da cavidade peritoneal, já que o método proposto não utiliza qualquer envoltório como reservatório para o gelo.

Ames *et al* desenvolveram um mecanismo para introdução do gelo moído (ice slush) por meio de um instrumento laparoscópico que manualmente controla a quantidade de gelo introduzida no campo operatório.¹²⁵ Este instrumento está conectado à uma máquina de gelo, semelhante ao que é utilizado para bebidas “frozen”, por meio de uma mangueira de vinil. Este mecanismo permite o controle da quantidade de gelo introduzida, sem a necessidade de alargar um dos portais laparoscópicos e mantém a consistência de “pasta dental” do gelo. Esta consistência é considerada ideal porque quando o gelo entra em contato com as alças intestinais é derretido imediatamente, eliminando a necessidade do uso de um envoltório plástico para armazenar o gelo ao redor do rim, sem o risco de causar lesão do intestino e órgãos adjacentes.

Em recente trabalho de Gill *et al*, em 771 casos de NPL e 1023 de NPA, o tempo médio de IQ foi de 30,7 e 20,1 minutos, respectivamente.⁵⁹ O tempo médio de cirurgia foi de 3,3 horas para NPL e 4,3 horas para NPA, e os casos da NPA foram mais complexos dos de NPL. IF foi utilizada em apenas 10 casos de NPL e 15 casos de NPA. Isto sugere que à medida que se vence a curva de aprendizado para a NPL diminui-se o tempo de cirurgia e de IQ e tumores incidentais e de localização favorável podem ser tratados com NPL sem a utilização de IF, já que é possível obter um tempo máximo de IQ de 30 minutos.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Janzen NK, Kim HL, Figlin RA and Belldgrun AS: Surveillance after radical or partial nephrectomy for localized renal cell carcinoma and management of recurrent disease. *Urol Clin North Am* 2003; 30(3): 843-53.
2. Chow WH, DeVessa SS, Warren JL and Fraumeni JL Jr: Rising incidence of renal cell cancer in the United States. *JAMA* 1999; 281(17):1628-31.
3. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A et al: Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(1): 10-30
4. Robson CJ, Churchill BM and Anderson W: The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol* 1969; 101(3): 297-301.
5. Sagalowsky AI, Kadesky KT, Ewalt DM and Kennedy TJ: Factors influencing adrenal metastasis in renal cell carcinoma. *J Urol* 1994; 151(5): 1181-84.
6. Sandock DS, Seftel AD and Resnick MI: Adrenal metastases from renal cell carcinoma: Role of ipsilateral adrenalectomy and definition of stage. *Urology* 1997; 49(1): 28-31.

7. Tsui KH, Schvarts O, Barbaric Z, Fligin R, de Kernion JB and Belldegrun A: Is adrenalectomy a necessary component of radical nephrectomy? UCLA experience with 511nephrectomies. J Urol 2000; 163(2): 437-411.
8. Golimbu M, Joshi P, Sperber A, Tessler A, Al-Askari S and Morales P. Renal cell carcinoma: survival and prognostic factors. Urology 1986; 27(4): 291-301.
9. Herrlinger A, Schrott KM, Schott G and Sigel A: What are the benefits of extended dissection of the regional renal lymph nodes in the therapy of renal cell carcinoma. J Urol 1991; 146(5): 1224-7.
10. Guinan P, Saffrin R, Stuhldreher D, Frank W and Rubenstein M: Renal cell carcinoma: comparison of the TNM and Robson stage groupings. J Surg Oncol 1995; 59(3): 186-9.
11. Thrasher JB and Paulson DF: Prognostic factor and renal cancer. Urol Clin North Am 1993; 20(2): 247-62.
12. Lane BR and Novick AC: Nephron-sparing surgery. BJU Int 2007; 99(5b): 1245-50.

13. Licht MR and Novick AC: Nephron sparing surgery for renal cell carcinoma. J Urol 1993; 149(1): 1-7.
14. Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H.: Nephron sparing surgery for appropriately selected renal cell carcinoma between 4 and 7 results in outcome similar to radical nephrectomy. J Urol 2004; 171(3): 1066-70.
15. Zigeuner R, Quehenberger F, Pummer K, Petritsh P And Hubmer G: Long-term results of nephron-sparing surgery for renal cell carcinoma in 114 patients: risk factors for progressive disease. BJU Int. 2003; 92 (6): 567-71.
16. Fergany AF, Hafez KS and Novick AC: Long-term results of nephron sparing surgery for localized renal cell carcinoma: 10-year follow-up. J Urol 2000; 163(2):442-45.
17. Jacobs SC, Berg SI and Lawson RK: Synchronous bilateral renal cell carcinoma: total surgical excision. Cancer 1980; 46(11): 2341-5.

18. Marberger M, Pugh RC, Auvert J, Bertermann H, Constantini A, Gammelgaard PA et al: Conservation surgery of renal carcinoma: the EIRSS experience. *Br J Urol* 1981; 53(6): 528-32.
19. Marshall FF and Walsh PC: In situ management of renal tumors: renal cell carcinoma and transicional cell carcinoma. *J Urol* 1984; 131(6): 1045-9.
20. Bazeed MA, Schärfe T, Becht E, Jurincic C, Alken P and Thüroff JW: Conservative surgery of renal cell carcinoma. *Eur Urol* 12(4): 238-43.
21. Carini M, Selli C, Barbanti G, Lapini A, Turini D and Constantini A: Conservative surgical treatment of renal cell carcinoma: clinical experience and reappraisal of indications. *J Urol* 1988; 140(4): 725-31.
22. Morgan WR and Zincke H: Progression and survival after renal-conserving surgery for renal cell carcinoma: experience in 104 patients and extended follow-up. *J Urol* 1990; 144(4): 852-7.
23. Selli C, Lapini A and Carini M: Conservative surgery of kidney tumors. *Prog Clin Biol Res* 1991; 370: 9-17.

24. Steinbach F, Stöckle M, Müller SC, Thüroff JW, Melchior SW, Stein R et al:
Conservative surgery of renal cell tumors in 140 patients: 21 years of
experience. J Urol 1992; 148(1): 24-9.
25. Moll V, Becht E, Ziegler M: Kidney preserving surgery in renal cell tumors:
indications, techniques and results in 152 patients. J Urol 1993; 150(2 Pt 1):
319-23.
26. Thrasher JB, Robertson JE, Paulson DF: Expanding indications for conservative
renal surgery in renal cell carcinoma. Urol 1994; 43(2): 160-8.
27. Lerner SE, Hawkins CA, Blute ML, Grabner A, Wollan PC, Eickholt JT et al:
Disease outcome in patients with low stage renal cell carcinoma treated with
nephron sparing or radical surgery. J Urol 1996; 155(6):1868-73.
28. D'Armiento M, Damiano R, Feleppa B, Perdonà S, Oriani G, De Sio M:
Elective conservative surgery for renal carcinoma versus radical nephrectomy: a
prospective study. Br J Urol 1997; 79(1): 15-9.
29. Van Poppel H, Bamelis B, Oyen R, Baert L: Partial nephrectomy for renal cell
carcinoma can achieve long-term tumor control. J Urol 1998;160(3 Pt 1): 674-8.

30. Hafez KS, Fergany AF and Novick AC: Nephron sparing surgery for localized renal cell carcinoma: impact of tumor size on patient survival tumor recurrence and TNM staging. J Urol 1999; 162(11):1930-33.
31. Barbalias GA, Liatsikos EN, Tsintavis A, Nikiforidis G: Adenocarcinoma of the kidney: nephron-sparing surgical approach vs. radical nephrectomy. J Surg Oncol 1999; 72(3): 156-61.
32. Belldegrun A, Tsui KH, deKernion JB, Smith RB: Efficacy of nephron-sparing surgery for renal cell carcinoma: analysis based on the new 1997 tumor-node-metastasis staging system. J Clin Oncol 1999;17(9):2868-75.
33. Lee CT, Katz J, Shi W et al: Surgical management of renal tumors 4cm or less in a contemporary cohort. J Urol 2000; 163(3): 730-6.
34. Indudhara R, Bueschen AJ, Urban DA, Burns JR, Lloyd LK: Nephron-sparing surgery compared with radical nephrectomy for renal tumors: current indications and results. South Med J 1997; 90(10): 982-5.
35. Gohji K, Kamidono R and Yamanaka N: Renal carcinoma in a solitary kidney. Br J Urol 1990; 66(3): 248-53.

36. Hafez KS, Novick AC and Campbell SC: Patterns of tumor recurrence and guidelines for followup after nephron sparing surgery for sporadic renal cell carcinoma. J Urol 1997; 157(6):2067-70.
37. Campbell SC, Novick AC, Streem SB, Klein E and Licht M: Complications of nephron sparing surgery for renal cell tumors. J Urol 1994; 151(5):1177-80.
38. Novick AC, Kaye MC, Cosgrove DM, Angermeier K, Pontes JE, Montie JE et al: Experience with cardiopulmonary bypass and deep hypothermic circulatory arrest in the management of retroperitoneal tumors with large vena caval thrombi. Annals of Surgery 1990; 212(4): 472-6.
39. Herr WH: Partial nephrectomy for unilateral renal carcinoma and a normal contralateral kidney: 10-year follow-up. J Urol 1999; 161(1): 33-5.
40. Provet J, Tessler A, Brown J, Golimbu M, Bosniak M, Morales P: Partial nephrectomy for renal cell carcinoma: indications, results and implications. J Urol 1991; 145: 472-6.

41. Kural AR, Dermirkessen O, Onal B, Öbek C, Tunc B, Onder AU et al:
Outcome of nephron-sparing surgery: elective versus imperative indications.
Urol Int 2003; 71(2): 190-95.
42. Licht MR, Novick AC and Goormastic M: Nephron sparing surgery in
incidental versus suspected renal cell carcinoma. J Urol 1994; 152(1):39-42.
43. Butler BP, Novick AC, Miller DP, Campbell SA, Licht MR: Management of
small unilateral renal cell carcinomas: radical versus nephron-sparing surgery.
Urol 1995; 45(1): 34-40.
44. Hafez KS, Novick AC and Buttler BP: Management of small solitary unilateral
renal cell carcinomas: Impact of central versus peripheral tumor location. J Urol
1998; 159(4): 1156-60.
45. Lau WK; Blute ML, Weaver AL et al. Matched comparison of radical
nephrectomy vs nephron sparing surgery in patients with unilateral renal cell
carcinoma and normal contralateral kidney. Mayo Clin Proc 2000; 75(12):
1236-42.
46. McKiernan J. Simmons R, Kalz J and Russo P: Natural history of chronic renal
insufficiency after partial and radical nephrectomy. Urology 2002;59(6):816-20.

47. Zincke H, Ghavamian R: Partial nephrectomy for renal cell cancer is here to stay: more data on this issue (Editorial). *J Urol* 1998; 159(4): 1161-2.
48. Bosniak MA: Problems in the radiologic diagnosis of renal parenchymal sparing surgery. *Urol Clin N Am* 1993; 20(2): 217-30.
49. Kletscher BA, Quian J, Bostwick DG, Andrews PA and Zincke H: Prospective analysis of multifocality in renal cell carcinoma: influence of histologic pattern, grade, number, size, volume and DNA ploidy. *J Urol* 1995; 153(3 Pt 2): 904-6.
50. Dechet CB, Blute ML and Zincke H: Nephron-preserving surgery for unilateral renal cell carcinoma: which pathologic variables contribute to contralateral renal tumor recurrence? *J Urol* 1998 part 2, 159: 169, abstract 648, 1998.
51. Gill IS: Five year outcomes of laparoscopic cryosurgical ablation of renal tumors. Unpublished data.
52. McDougal WS, Gervais DA, McGovern FJ and Mueller PR: Long-term followup of patients with renal cell carcinoma treated with radio frequency ablation with curative intent. *J Urol* 2005; 174: 61.

53. Lane BR and Gill IS: 5-Year outcomes of laparoscopic partial nephrectomy. J Urol 2007; 177(1): 70-4.
54. Gill IS, Desai MM, Kaouk JH, Meraney AM, Murphy DP, Sung GT et al: Laparoscopic partial nephrectomy for renal tumor: duplicating open surgical techniques. J Urol 2002; 167 (2): 469-476.
55. Touijer K and Guillonneau B: Advances in laparoscopic partial nephrectomy. Curr Opin Urol 2004; 14(4):235-37.
56. Frauscher F, Janetschek G, Klauser A, Peschel R, Halpern EJ, Helweg G, et al: Laparoscopic pyeloplasty for UJP obstruction with crossing vessels: contrast-enhanced color Doppler findings and long-term outcome. Urology 2002; 59(4):500-5.
57. Khaira HS, Paltt JF, Cohan RH, Wolf JS and Faerber GJ: Helical computed tomography for identification of crossing vessels in ureteropelvic junction obstruction – comparison with operative findings. Urology 2003; 62(1): 35-9.
58. Coll DM, Uzzo RG, Herts BR, Davros WJ, Wirth SL and Novick AC: 3-Dimensional Volume rendered computerized tomography for preoperative evaluation and intraoperative treatment of patients undergoing nephron sparing surgery. J Urol 1999; 161(4):1097-1102.

59. Gill IS, Kavoussi LR, Lane BR, Blute ML, Babineau D, Colombo JR et al: Comparison of 1800 laparoscopic and open partial nephrectomies for single renal tumors. J Urol 2007; 178(1): 41-46.
60. Ramani AP, Desai MM, Steinberg AP, NG CS, Abreu SC, Kauok JH et al: Complications of laparoscopic partial nephrectomy in 200 cases. J Urol 2005; 173(1): 42-7.
61. Janetschek G, Daffner P, Peschel P and Bartsch G: Laparoscopic nephron sparing surgery for small renal cell carcinoma. J Urol 1998; 159(4): 1152-5.
62. Jeschke K, Peschel P, Wakoning J, Schellander L, Bartsch G and Henning K: Laparoscopic nephron sparing surgery for renal tumors. Urology 2001; 58(5): 688-92.
63. Guillonneau B, Bermudez H, Gholami S, El Fettouh H, Gupta R, Adorno Rosa J et al: Laparoscopic partial nephrectomy for renal tumor: single center experience comparing clamping and no clamping techniques of the renal vasculature. J Urol 2003; 169(2): 483-6.
64. Bishoff JT, Cornum RL, Perahia B et al: Laparoscopic heminephrectomy using a new fibrin sealant powder. Urology 2003; 62(6): 1139-43.

65. McLoughlin GA, Heal MR and Tyrell IM: An evaluation of techniques for the production of temporary renal ischaemia. *Br J Urol* 1978; 50(6): 371-5.
66. Leary FJ, Utz DC and Wakim KG: Effects of continuous and intermittent renal ischemia on renal function. *Surg Gynec Obst* 1963; 116: 311-7.
67. Nelly WA and Turner MD: The effect of arterial, venous, and arteriovenous occlusion on renal blood flow. *Surg Gynec Obst* 1959; 108(6): 669-72.
68. Strauss J, Beran AV, Brown CT and Katurich N: Renal oxygenation under normal conditions. *Am J Physiol* 1968; 215(6): 1482-7.
69. Parekh N and Veith U: Renal hemodynamics and oxygen consumption during postischemic acute renal failure in the rat. *K Int* 1981; 19(2): 306-16.
70. Miller HC, Alexander JW and Nathan P: effect of warm ischemic damage on intrarenal distribution of flow in preserved kidneys. *Surg* 1972; 72(2): 193-202.
71. Oliver J, MacDowell M and Tracy A: The pathogenesis of acute renal failure associated with traumatic and toxic injury. Renal ischemia, nephrotoxic damage and the ischemic episode. *J Clin Invest* 1951; 30(12:1): 1307-1439.

72. Rama Raju BV, Prakash A, Kapur M and Gulati SM: Acute renal ischemia and the effect of local hypothermia on the histological changes. An experiment study. *Indian J Med Res* 1969; 57(5): 925-31.
73. Yoshida WB: Fisiopatologia da isquemia e reperfusão. In Maffei FHA. *Doenças vasculares periféricas*. Rio de Janeiro: MEDSI; 2002. p.253-8.
74. Parks DA, Granger DN: Xantina oxidase biochemistry distribution and physiology. *Acta Physiol Scand Supp* 1986; 548(Suppl): 87-99.
75. Grace PA: Ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994; 81(5): 637-47.
76. Newaz AM and Oyekan AO: Vascular responses to endothelin-1, angiotensin-II and U46619 in glycerol-induced acute renal failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38(4): 569-77.
77. Kwon O, Elson WJ, Sibley R, Huie P, Scandling Jd, Dafoe D et al: Backleak, tight junctions and cell-cell adhesion in post-ischemic injury to the renal allograft. *J Clin Invest* 1998; 101(10): 2054-64.

78. Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D and Hechtman HB: Pathophysiology of ischemia-reperfusion on injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg* 1991; 78(6): 651-5.
79. Grisham MB: Interaction between nitric oxide and superoxide: Role in modulating leukocyte adhesion in the postischemic microvasculature. *Transplant Proc* 1995; 27(5): 2842-3.
80. Koletsky S: Effects of temporary interruption of the renal circulation in rats. *AMA Arch Path* 1954; 58(6): 592-603.
81. Badenoch AW and Damady EM: The effect of temporary occlusion of the renal artery in rabbits and relationship to traumatic uremia. *J Path & Bact* 1947; 59 (1-2): 79-94.
82. Mitchel RM: Studies on renal transplantation in sheep. *Australian and New Zeland J Surg* 1959; 28(4): 263-73.
83. Wickham JE, Hanley MG and Joekes AM: Regional renal hypothermia. *Br J Urol* 1967; 39(6): 727-43.

84. Novick AC: Renal hypothermia in vivo and ex vivo. *Urol Clin North Am* 1983; 10(4): 637-44.
85. Laven BA, Orvieto MA, Chuang MS, Ritch CR, Murray P and Harland RC: Renal tolerance to prolonged warm ischemia time in a laparoscopic versus open surgery porcine model. *J Urol* 2004; 172(6 Pt 1): 2471-74.
86. Baldwin DD, Maynes LJ, Berger KA, Desai PJ, Zuppan CW, Zimmerman GJ et al: Laparoscopic warm renal ischemia in the solitary porcine kidney model. *Urology* 2004; 64(3): 592-7.
87. Thomsen HS, Larsen S, Talner LB: Papillary morphology in adult human kidneys and in baby and adult pig kidneys: *Eur Urol* 1983; 9(3):170-80.
88. Friedman SM, Johnson RL and Friedman CL: The pattern of recovery of renal function following renal artery occlusion in the dog. *Circulation Res* 1954; 2(3): 231-5.
89. Hamilton PB, Phillips RA and Hiller A: Duration of renal ischemia required to produce uremia. *Am J Physiol* 1948; 152(3): 517-22.

90. Roof BS, Lauson HD, Bella ST and Eder HA: Recovery of glomerular and tubular function, including p-aminohippurate extraction, following to hours of renal artery occlusion in the dog. *Am J Physiol* 1951; 166(3): 666-78.
91. Birkeland S, Vogt A, Krog J and Semb C: Renal circulatory occlusion and local cooling. *J Appl physiol* 1959; 14(2): 227-32.
92. Thompson RH, Frank I, Lohse CM, Saad IR, Fergany A and Novick AC: The impact of ischemia time during open nephron sparing surgery on solitary kidneys: a multi-intititutional study. *J Urol* 2007; 177(2): 471-6.
93. Semb C: Partial resection of the kidney: anatomical, physiological and clinical aspects. *Ann Roy Coll Surg* 1956; 19(3): 137-55.
94. Ellis FH, Helden RA and Hines EA Jr: Aneurysm of the abdominal aorta involving the right renal artery. *Ann Surg* 1955. 142(6): 992-6.
95. McAnulty JF and Huang XQ: the effects of administering quinacrine during ultraprofound hypothermia on harm ischemic kidney cortex tissue. *J Pharm Exp Ther* 1996; 277(2): 691-99.

96. Jayachandran S, Mooppan MM, Chou SY and Kim H: Effects of chlorpromazine on ischemic rat kidney: a functional and ultrastructural study. *Urology* 1985; 25(4): 386-90.
97. Mangino MJ, Murphy MK, Grabau GG and Anderson CB: Protective effects of glycine during hypothermic renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 1991; 261(5): 842-8.
98. Hauet T, Mothes D, Goujon JM, Caritez JC, Carretier M, le Moyec L et al: Trimetazidine prevents renal injury in the isolated perfused pigs kidney exposed to prolonged cold ischemia. *Trasnplantation* 1997; 64(7): 1082-86.
99. Inman SR, Burns TE, Plott WK, Pomilee RA, Antonelli JA and Lewis RM: Endothelin receptor blockage during hypothermic perfusion preservation mitigates the adverse effect of preretrieval warm ischemic injury on posttransplant glomerular filtration rate. *Transplantation* 2002; 74(2): 164-8.
100. Fernando AR, Armstrong DMG, Griffiths JR, Gunter P, Hendry WF, Smith AF et al: Prevention of renal warm ischemic injury and long-term preservation of kidneys with inosine: function, ultrastructure and clinical use. *Transp Proc* 1979; 11(2): 1477.

101. Marberger M, Günther R, Alken P, Rumpf W and Ranc M: Inosine: Alternative or adjunct to regional hypothermia in the prevention of post-ischemic renal failure? *Eur Urol* 1980; 6(2): 95-102.
102. Greenstein F, Kim H, Kanarek L and Wax S: A comparison of regional hypothermia and inosine in renal preservation. *J Urol* 1982; 128(3):621-3.
103. Marthur VK and Ramsey EW: Comparison of methods for preservation of renal function during ischemic renal surgery. *J Urol* 1983; 129(1): 163-65.
104. Zager RA, Gmur DJ, Bredl CR and Eng MJ: Degree and time sequence of hypothermic protection against experimental ischemic acute renal failure. *Circulation Res* 1989; 65(5): 1263-9.
105. Zechner O, Pflüger H, Maier M and Binder BR: Effects of external renal hypothermia on postischemic hemodynamics. *Urol Int* 1983; 38(4): 209-212.
106. Ward JP: Determination of the optimum temperature for regional renal hypothermia during temporary renal ischaemia. *Br J Urol* 1975; 47(1): 17-24.
107. Levy MN: Oxygen consumption and blood flow in the hypothermic perfused kidney. *Am J Physiol* 1959; 197(5): 1111-14.

108. Walton KN and Bryant LR: Renal oxygen consumption: effect of hypothermia and ethacrinic acid. Surg Forum 1967; 18: 529-30.
109. Stueber PJ, Kovacs S, Koletsky S and Persky L: Regional hypothermia in acute renal ischemia. Surgery 1958; 44(1): 77-83.
110. Mitchell RM and Woodruff MFA: The effects of local hypothermia in increasing tolerance of the kidney to ischemia. Transplant Bull 1957; 4(1): 15-7.
111. Lutropp W, Nelson CE, Nilsson T and Olin T: Study of glomerular and tubular function after in situ cooling of the kidney. J Urol 1976; 115(2):133-35.
112. Cockett ATK: The kidney and regional hypothermia. Surgery 1960;50(6):905-10.
113. Grana L, Donnellan WL and Swenson O: Low flow hypothermic renal perfusion. Surg Gynec Obst 1971; 133(3): 401-13.
114. Marberger M, Georgi M, Guenther R and Hohenfellner R: Simultaneous balloon occlusion of the renal artery and hypothermic perfusion in situ surgery of the kidney. J Urol 1978; 119(4): 463-7.

115. Wagenknecht LV, Hupe W, Bucheler E and Klosterhalfen H: Selective hypothermic of the kidney for intrarenal surgery. *Eur Urol* 1977; 3(2): 62-8.
116. Marshall V and Blandy J: Simple renal hypothermia. *Br J Urol* 1974; 46(3):253-6.
117. Mitchell RM: Renal cooling and ischemia. *Br J Surg* 1959; 46: 593-7.
118. Petersen HK, Moller BB and Iversen HG: Regional hypothermia in renal surgery for severe lithiasis. *Scand J Urol Nephrol* 1977; 11(1):27-34.
119. Metzner PJ and Boyce WH: Simplified renal hypothermia: an adjunct to conservative renal surgery. *BJU* 1972; 44(1): 76-85.
120. Gibbons RP, Correa RJ, Cummings KB and Mason JT: Surgical management of renal lesions using in situ hypothermia and ischemia. *J Urol* 1976; 115(1): 12-17.
121. Janetschek G, Abelmaksoud A, Bagheri F, Alzahrani H, Leeb K and Gschwendtner M: Laparoscopic partial nephrectomy in cold ischemia: renal artery perfusion. *J Urol*. 2004; 171 (1): 68-71.

122. Landman J, Rehman J, Sundaram CP, Bhayani S, Monga M, Pattaras G et al: Renal hypothermia achieved by retrograde intracavitary saline perfusion. J Endourol 2002; 16 (7): 445-49.
123. Gill IS, Abreu SC, Desai MM, Steinberg AP, Ramani AP, NG C et al: Laparoscopic ice slush renal hypothermia for partial nephrectomy: the initial experience. J Urol. 2003; 170 (1): 52-6.
124. Wakabayashi Y, Narita M, Kim CJ, Kawakami T, Yoshiki T and Okada Yusaku: Renal hypothermia using ice slush for retroperitoneal laparoscopic partial nephrectomy. Urology 2004; 63(4): 773-5.
125. Ames CD, Venkatesh R, Weld KJ, Morrissey K, Foyil KV, Shen Tabitha et al: Laparoscopic renal parenchymal hypothermia with novel ice-slush deployment mechanism. Urology 2005; 66(1): 33-7.

MANUSCRITO 1

Artigo elaborado pelas normas de publicação no International Brazilian Journal of Urology

PÁGINA TÍTULO

AValiação DAS ALTERAÇÕES FUNCIONAIS E HISTOLÓGICAS NA ISQUEMIA RENAL, COMPARANDO-SE DUAS TÉCNICAS DE HIPOTERMIA. ESTUDO EXPERIMENTAL EM SUÍNOS

EDUARDO PIOTTO LEONARDI, PAULO ROBERTO KAWANO, RODRIGO ARTUR OTSUKA, JULIANY QUITZAN, JOÃO LUIZ AMARO E OSCAR EDUARDO HIDETOSHI FUGITA

PALAVRAS CHAVE: ISQUEMIA RENAL, HIPOTERMIA, NEFRECTOMIA PARCIAL, LAPAROSCOPIA, CÂNCER RENAL

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, CAMPUS BOTUCATU, FACULDADE DE MEDICINA, DEPARTAMENTO DE UROLOGIA, DISTRITO DE RUBIÃO JÚNIOR, BOTUCATU, SÃO PAULO, BRASIL

CEP: 18.618-970

☎ 55 14 38116271/6802

FAX: 55 14 38220421

EDUARDO PIOTTO LEONARDI

HOSPITAL DOM LUIZ I, AVENIDA GENERALÍSSIMO DEODORO, 868 PRÉDIO DOS CONSULTÓRIOS II, SALA 2 (UROLaser – SERVIÇOS DE UROLOGIA LTDA) BELÉM – PA, BRASIL

CEP: 66055-240

☎ 55 91 30810708

FAX: 55 91 32251858

eduardo.leonardi@sbu.org.br

NÚMERO DE PALAVRAS: 2167

CONFLITO DE INTERESSE: PESQUISA REALIZADA COM VERBA FAPESP

INTRODUÇÃO

Cirurgias renais como nefrectomias parciais, transplante renal e cirurgia renovascular são situações clínicas que freqüentemente exigem a interrupção transitória do fluxo sanguíneo renal. A hipotermia renal é um dos métodos de preservação da função renal mais eficiente para se proteger as células renais das lesões de isquemia e reperfusão. Em 1975, Ward sugeriu que 15°C seria a temperatura ideal para causar hipotermia renal regional.(1) Apesar de existirem vários métodos de hipotermia renal, tradicionalmente, obtêm-se o resfriamento renal envolvendo-se o rim com gelo moído após obstrução da artéria renal.(2-4)

Atualmente, as cirurgias renais laparoscópicas evoluíram muito, o que tornou este acesso uma alternativa para nefrectomia parcial (NPL).(5) A técnica com gelo moído foi duplicada para laparoscopia, mas apresenta dificuldade técnica para a colocação da bolsa plástica e para introdução do gelo, o que torna o método trabalhoso. Perfusão de solução fria na artéria renal é pouco utilizada pelo risco de lesão dos vasos renais.(6,7)

Landman *et al* propuseram um modelo de hipotermia em que o resfriamento renal é feito por meio de cateterismo do ureter com perfusão de solução salina fria na via excretora.(8) É uma técnica de fácil aplicabilidade, permite um campo cirúrgico livre de gelo e evita o resfriamento de estruturas anatômicas que envolvem o campo cirúrgico. Entretanto, esta técnica suscita dúvidas sobre sua capacidade em produzir temperatura ideal no túbulo contornado proximal, já que resfria melhor a medula renal do que a córtex.(9,10)

Este estudo pretende comparar a técnica de Landman com o método tradicional de resfriamento com gelo e avaliar as alterações funcionais do rim e as alterações histológicas das células da borda em escova do túbulo proximal de rins suínos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados porcos mestiços com pesos entre 15 e 20 kg. Um dia antes do procedimento foram coletadas amostras de sangue e urina para medir creatinina, uréia e se obterem cultura de urina e o débito urinário. Com uma incisão tipo Gibson, o rim esquerdo foi submetido às condições inerentes ao experimento, e após, foi realizada a nefrectomia do rim direito. (Figura 1)

A aferição da temperatura foi feita por meio de um termômetro eletrônico, inserindo-se agulhas nas camadas cortical e medular do parênquima renal, duas no pólo superior e duas no inferior, orientados por um ultra-som portátil com probe linear de 3 MHz. (Figuras 2 e 3) Em todos os grupos, as temperaturas foram aferidas a cada 5 minutos durante 60 minutos. Após o término do experimento, as temperaturas eram aferidas por mais 10 minutos.

Os animais foram divididos em 4 grupos:

Grupo 1: Resfriamento renal por infusão retrógrada de solução salina à 4°C com oclusão do pedículo renal. (oito animais)

Após cistotomia e identificação do meato ureteral esquerdo, foi introduzido um cateter duplo lúmen nº 6 FR, por meio do qual foi realizada a perfusão retrógrada de solução salina a 4°C, impulsionado por uma bomba de infusão que criava um fluxo ideal a uma velocidade de 30 ml/min. (Figura 4) A outra via do cateter drenava o líquido irrigado na via excretora. Iniciamos a perfusão após oclusão de todo o pedículo renal com clampe vascular.

Grupo 2: Resfriamento renal com gelo moído associado com oclusão do pedículo renal (oito animais)

Envolvia-se o rim esquerdo com uma bolsa criada com uma luva estéril formando um reservatório para o gelo. Logo após a oclusão do pedículo renal, gelo moído era colocado sobre o rim. (Figura 5)

Grupo 3: Oclusão do pedículo renal sem resfriamento renal – isquemia quente (quatro animais)

Neste grupo foi realizada apenas a oclusão do pedículo renal sem submeter os rins a qualquer técnica de hipotermia. (figura 6)

Grupo 4: Grupo controle cirúrgico – sham (4 animais)

Neste grupo, os animais foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico dos grupos anteriores, mas não à isquemia nem à hipotermia. (Figura 6)

No pós-operatório, os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas que permitiam uma medida rigorosa do débito urinário diário. Amostras de sangue e urina foram coletadas no 1º e 5º dia de pós-operatório (PO) para a mesma análise bioquímica do pré-operatório. No 5º dia, os animais foram sacrificados e os rins, pelves e ureteres removidos em bloco. As peças foram submetidas a cortes histológicos das camadas cortical e medular dos pólos superior e inferior e coradas com hematoxilina-eosina. Dois patologistas realizaram a análise semi-quantitativa das seguintes alterações encontradas: hiperplasia tubular, degeneração do epitélio tubular, necrose tubular, dilatação tubular, proteína na luz tubular, infiltrado mononuclear e congestão. Estas alterações foram graduadas de acordo com o seguinte padrão: 0 – sem alterações, 1 – alterações leves, 2 – alterações moderadas e 3 – alterações acentuadas. Esta análise foi realizada sem que o patologista tivesse conhecimento prévio do grupo a que pertenciam às amostras analisadas.

RESULTADOS

Todas as culturas de urina foram negativas.

3.1 – Temperatura: o comportamento das temperaturas entre os grupos são mostrados na figura 7.

Grupo 1: em média, as temperaturas mínimas das camadas medular e cortical foram respectivamente 24,9 e 25,4°C. Nos primeiros 20 minutos do experimento a temperatura caiu numa velocidade de 0,37°C/min na medular (33,68 a 26,2°C) e 0,28°C/min no córtex (33,3 a 27,6°C). A partir de 20 minutos, a temperatura estabilizou entre 26,2 e 24,9°C na medular e entre 27,6 e 25,4°C na cortical até os 60 minutos. Após o restabelecimento da perfusão sanguínea e da suspensão da hipotermia, o retorno à temperatura inicial ocorreu numa velocidade de 0,58°C/min na camada medular e 0,53°C/min na cortical. (figura 7)

Grupo 2: em média, as temperaturas mínimas das camadas medular e cortical foram respectivamente 6,38 e 5°C. A temperatura caiu nos 20 minutos iniciais numa velocidade de 1,44°C/min (33,8 a 5°C) na camada cortical e 1,37°C/min (33,9 a 6,5°C) na medular. Após 20 minutos, a temperatura estabilizou entre 5 e 6,8°C na camada cortical e entre 6,5 e 7,8°C na camada medular até completar os 60 minutos. Nos primeiros 10 minutos após o retorno da perfusão sanguínea renal, a temperatura subiu numa velocidade de 2,4°C/min na cortical e 2,3°C/min na medular. (figura 7)

Grupo 3: as temperaturas médias entre as camadas cortical e medular se mantiveram estáveis entre os tempos de aferição. (figura 7)

Grupo 4: não houve mudanças entre as temperaturas da camada cortical e medular durante o experimento. (figura 7)

3.2 - creatinina e uréia: as variações médias dos valores de creatinina e uréia entre os grupos estão na tabela 1. Para estas variáveis foi realizada análise de variância para comparação dos grupos fixando-se os tempos.

Pré-operatório: os valores médios de creatinina entre os animais variaram de 0,81 a 1,34 mg/dl e a diferença entre os grupos não foi significativa. ($p=0,57$) Os valores médios dos níveis de uréia acompanharam a variação dos níveis de creatinina. A variação entre os grupos foi de 20,2 a 29 mg/dl e, também, não houve diferença significativa. ($p=0,60$)

1°PO: os valores médios de creatinina variaram de 1,55 a 2,68 mg/dl, não havendo diferença significativa entre os grupos neste tempo. ($p=0,15$) Os valores médios de uréia variaram de 77,2 a 53,7 mg/dl, com diferenças significativa entre os grupos. ($p=0,011$)

5°PO: os valores médios de creatinina variaram de 2,43 a 1,07 mg/dl, não havendo diferença significativa entre os grupos. ($p=0,1$) A média dos valores de uréia variou de 57,4 a 44,9 mg/dl, sem haver diferença entre os grupos. ($p=0,48$)

3.3 – Diurese: ocorreu uma queda do volume médio de diurese no 1° PO em todos os grupos. Nos dias subseqüentes, houve um aumento gradual e equivalente no volume médio de diurese. (figura 8)

3.4 – Histologia: na análise histológica foi aplicado o teste exato de Fisher. Nenhum animal apresentou, em qualquer das variáveis avaliadas, alteração acentuada. Nota-se

que, para cada variável histológica estudada, não existiu diferença estatisticamente significativa entre os 4 grupos, considerando que os valores médios entre os pontos para cada variável não foram maiores do que 1,25, ou seja, em média, as alterações foram no máximo leves. (tabela 2)

DISCUSSÃO

A recente disponibilidade de clampes vasculares atraumáticos permitiu a duplicação da nefrectomia parcial aberta para via laparoscópica.(11) Apesar dos diferentes métodos de hipotermia que foram propostos para facilitar sua aplicação na laparoscopia, destacamos as duas técnicas aplicadas no presente estudo.(6-8)

Ward, em um estudo em cães, determinou como 15°C a temperatura ótima para proteger os rins das lesões de isquemia e reperfusão e, Wickham *et al*, mostraram que entre 15° e 20°C, rins de coelhos não apresentam alterações funcionais, mesmo por períodos de até 3 horas de isquemia fria (IF).(1,12) Em nenhum dos grupos estudados por nós em que se produziu hipotermia renal, seja por infusão retrógrada seja por contato com gelo moído, foi possível manter as temperaturas próximas da ideal.

No grupo 1, reproduzimos a técnica descrita por Landman *et al* e obtivemos resultados semelhantes.(8) Esta técnica resfriou mais a medular do que a córtex renal. Após 20 minutos de isquemia, a temperatura média do córtex se manteve acima da ideal, entre 25,4°C e 27,6°C. No grupo 2, inversamente ao ocorrido no grupo 1, esta técnica resfriou mais o córtex, e a menor temperatura média atingida nesta camada foi de 5°C, diferente do estudo de Landman *et al*, em que a menor temperatura cortical foi de

23,7°C.(8) A temperatura média desta camada se manteve entre 5 e 6,8°C, cerca de 10°C abaixo do ideal. Ward mostrou que os extremos de temperatura tanto acima quanto abaixo de 15°C (37 ou 0°C) podem prejudicar a função renal. Tanto o presente estudo quanto Landman *et al* não apresentaram alterações da função renal seja nos grupos de isquemia quente (IQ) seja nos grupos de IF.(1,8) Wickham *et al* mostraram que temperaturas entre 15 a 20°C proporcionam o grau máximo de proteção renal, entretanto, temperaturas entre 5 e 30°C com 45 minutos de isquemia provocaram pouco prejuízo da função renal em coelhos.(12) Metzner *et al*, em um estudo retrospectivo em humanos submetidos à técnica de hipotermia com gelo observou que o uso desta técnica proporciona temperaturas no córtex renal em torno de 5°C e não considera que isto cause prejuízos à função renal.(4)

Tanto na comparação entre os grupos 1 e 2, quanto na comparação isolada de cada um deles com o grupo controle, não se encontrou diferenças funcionais e histológicas estatisticamente significativas. Estas observações foram semelhantes ao estudo de Landman *et al*.(8) Curiosamente os animais do grupo 3, submetidos a 60 minutos de IQ, não apresentaram alterações funcionais ou histológicas acentuadas apesar de tempos acima de 30 minutos de IQ poderem provocar prejuízo irreversível da função renal.(10) As alterações produzidas neste grupo foram estatisticamente semelhantes às encontradas nos outros grupos.

O tempo de IQ que o rim humano suporta sem que as células renais sofram lesão irreversível de isquemia e reperfusão ainda é controverso. Estudos com vários modelos animais, inclusive suínos, das décadas de 1960 e 1980, concluíram que 30 minutos seria o tempo máximo de IQ sem que ocorresse insuficiência renal irreversível.(12,13)

Thompson *et al*, em um estudo retrospectivo recente em humanos, avaliaram o impacto do tempo de isquemia em pacientes com rim único, submetidos à nefrectomia parcial aberta e concluíram que 20 e 35 minutos são os tempos máximos que rins solitários toleram de IQ e IF, respectivamente.(14) Por outro lado, estudos recentes realizados em suínos sugerem que estes animais suportam um tempo de isquemia quente superior a 90 minutos, tanto em cirurgias abertas quanto laparoscópicas.(15,16) Estes últimos trabalhos poderiam explicar tanto a ausência de significância estatística na maioria das variáveis estudadas no presente estudo quanto as conclusões de Landman *et al*. Sessenta minutos de IQ não foi suficiente para se causar alterações laboratoriais e/ou celulares agudas importantes no grupo 3, sugerindo que não se pode utilizar tempo de IQ abaixo de 90 minutos no modelo suíno.

O tempo de IQ que o rim de um mamífero suporta pode variar com a espécie. Ratos suportam até 2 horas de IQ e ovelhas, até 90 minutos. Já em coelhos, tempo de IQ maior do que 2 horas é uniformemente fatal.(17-19) Apesar de o rim do suíno ter características anatômicas muito semelhantes ao rim humano, pode ser que não haja a mesma correspondência em relação à função renal.(20)

A possibilidade de que as células renais humanas suportassem 90 minutos de IQ como as células renais de suínos, permitiria tempo suficiente para a realização de NPL em tumores renais complexos, sem a preocupação de se submeter o tecido renal a qualquer técnica de resfriamento. Entretanto, é temeroso se basear nesses estudos para se aplicar um tempo de isquemia seguro em seres humanos. Parece que o estudo de Thompson *et al* está mais próximo de uma situação real, apesar de se tratar de um estudo retrospectivo.(14)

CONCLUSÕES

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os métodos de hipotermia renal de contato com gelo moído e de resfriamento retrógrado por infusão de solução salina à 4°C na via excretora.

A ausência de diferença estatística significativa nos parâmetros clínicos e histológicos estudados entre os grupos pode ser atribuída ao tempo de IQ realizado e/ou ao modelo animal utilizado. Tempos de IQ superiores a 90 minutos no modelo suíno podem ser necessários para reproduzir as alterações celulares e funcionais causadas pela IQ em humanos.

Figura 1: Incisão tipo Gibson



Figura 2 – Instrumentos. (A) ultra-som portátil; (B) termômetro eletrônico.



Figura 3 – Agulhas do termômetro nas camadas cortical e medular orientado por ultra-som. (A) colocação das agulhas; (B) controle da posição com ultra-som.

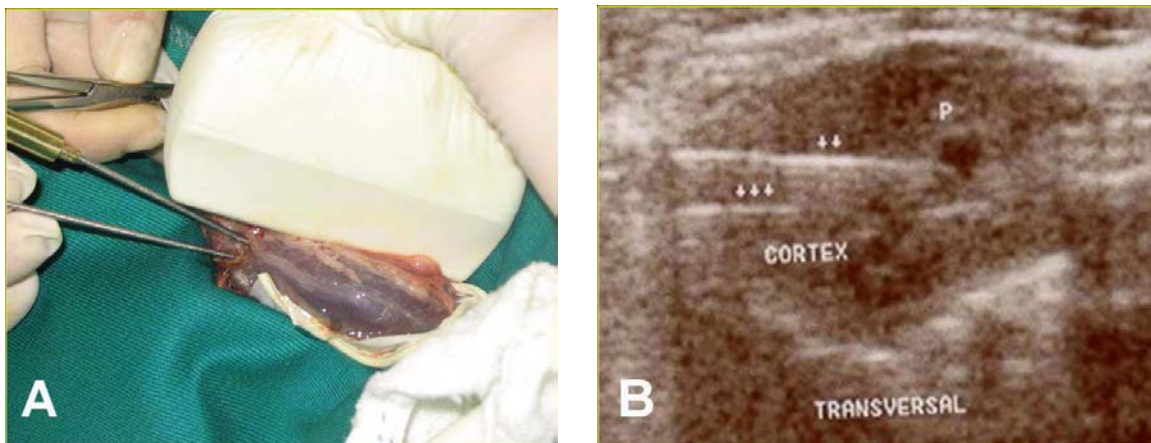


Figura 4 – Grupo 1. (A) cateter ureteral duplo lúmen; (B) disposição dos instrumentos na sala de cirurgia

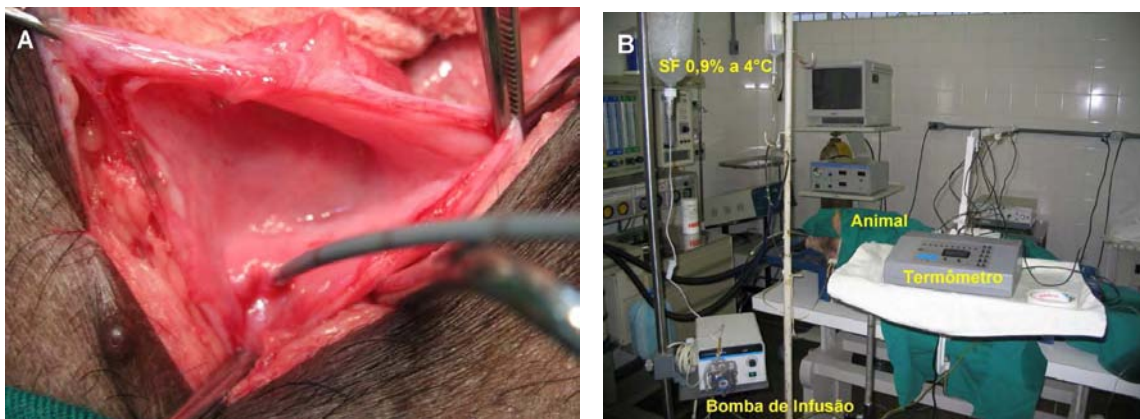


Figura 5 – Experimento do Grupo 2



Figura 6 – Grupo 3 (com isquemia quente) e 4 (sem isquemia e sem hipotermia)

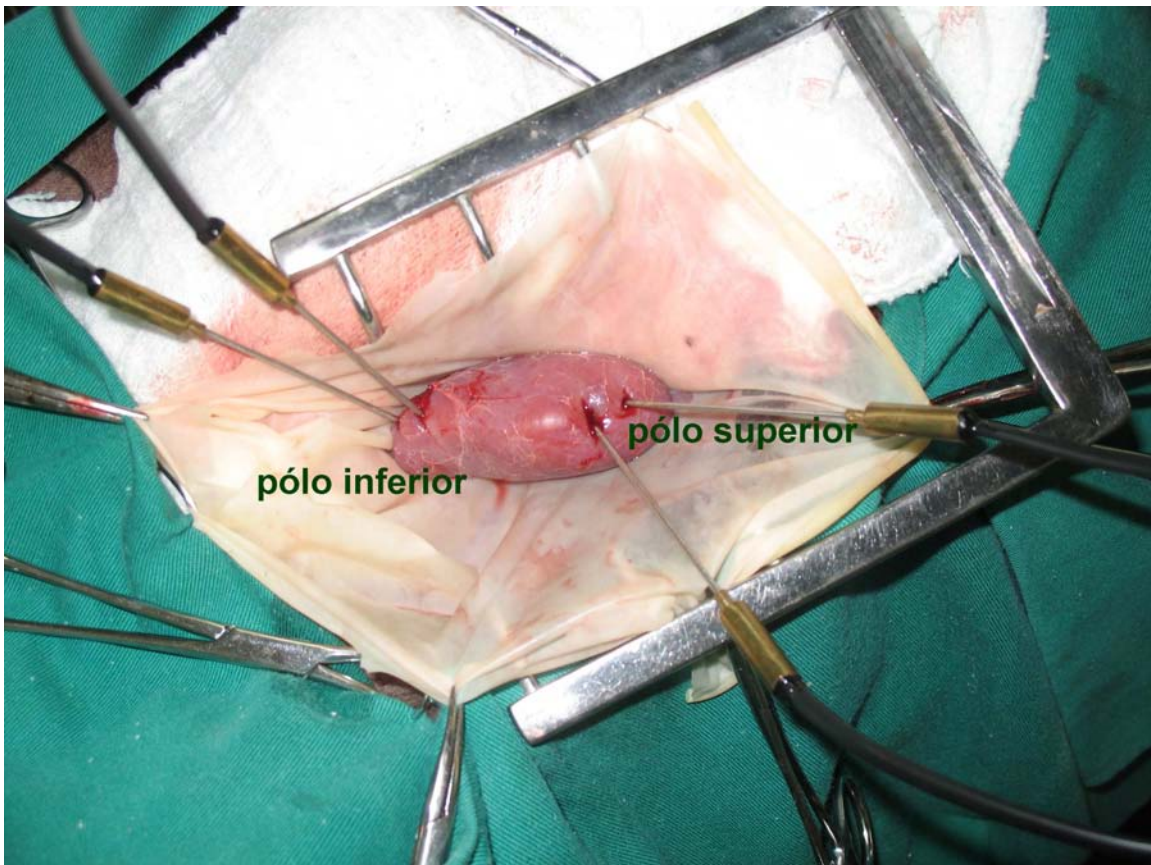


Figura 7 – Comportamento da temperatura (em média) nas camadas cortical e medular nos 4 grupos do estudo.

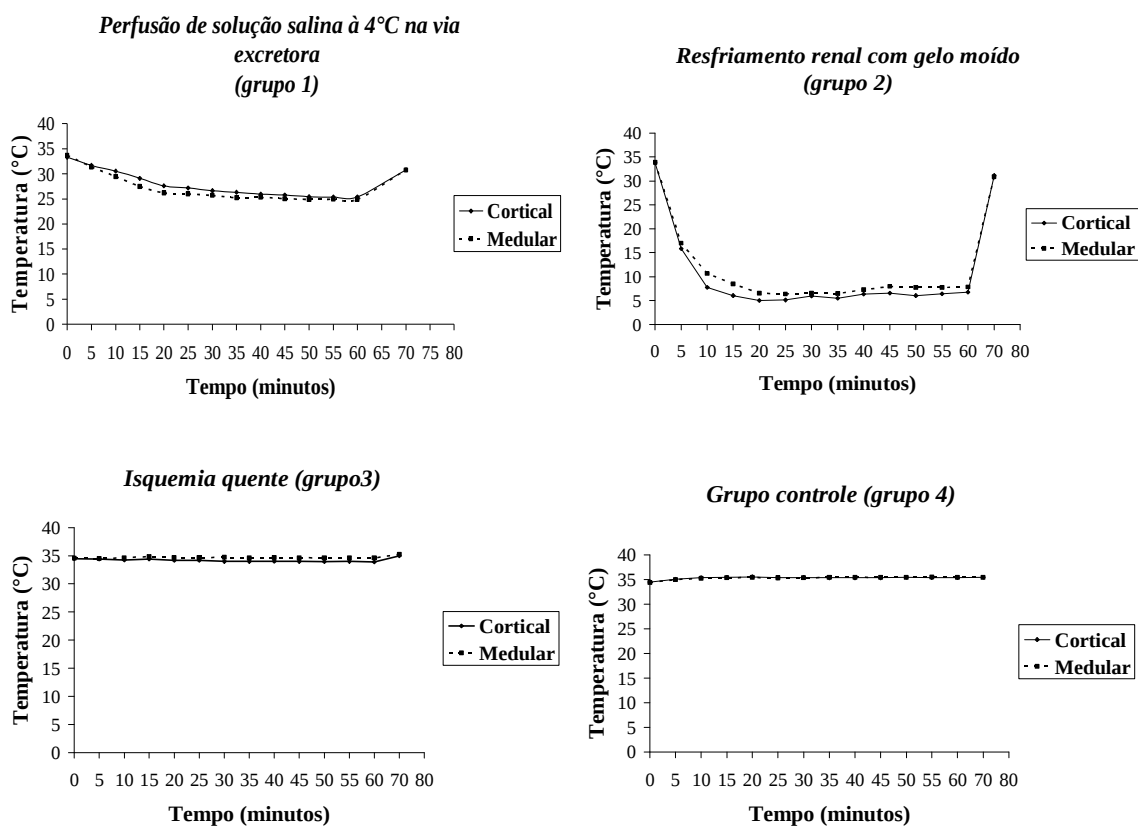


Figura 8 - Comportamento da diurese durante o experimento

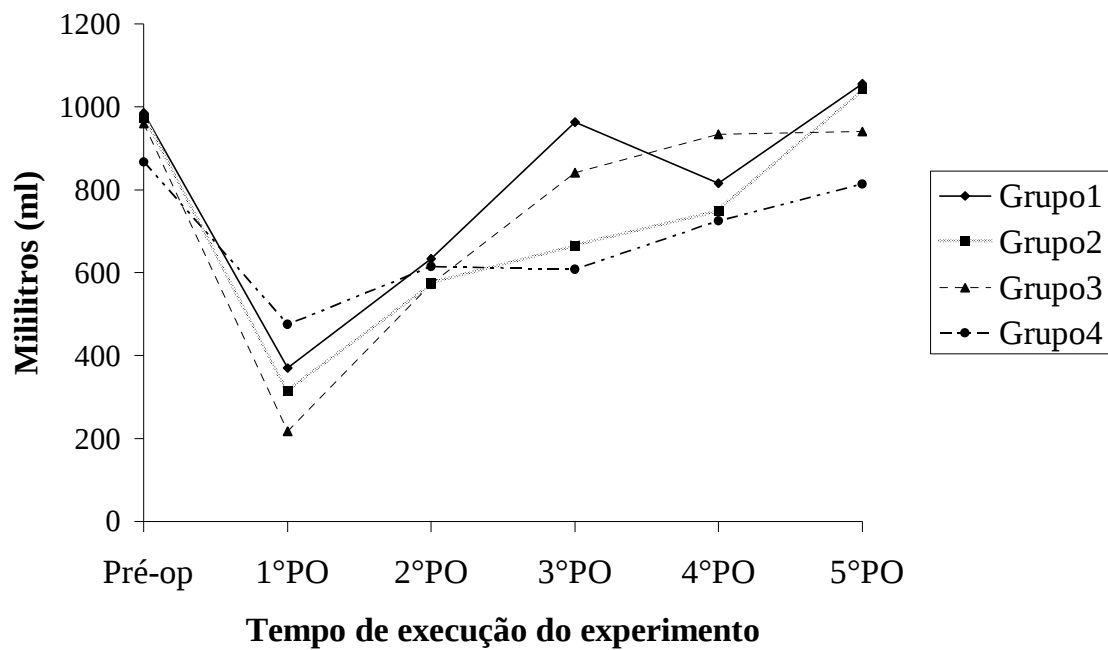


Tabela 1 – Médias dos valores de creatinina e uréia (mg/dl) entre os grupos

	<i>Grupo 1</i>		<i>Grupo 2</i>		<i>Grupo 3</i>		<i>Grupo 4</i>		<i>valor p</i>	
	<u>Cr</u>	<u>Uréia</u>	<u>Cr</u>	<u>Uréia</u>	<u>Cr</u>	<u>Uréia</u>	<u>Cr</u>	<u>Uréia</u>	<u>Cr</u>	<u>Uréia</u>
<i>Pré-op</i>	0,81	21	1,34	29	0,87	20,2	0,85	27,2	0,57	0,60
<i>1° PO</i>	2,68	77,2	2,07	63,1	2,15	64	1,55	53,7	0,15	0,011*
<i>5° PO</i>	2,43	57,4	1,27	44,9	1,42	48,7	1,07	45	0,10	0,48

Pré-op: pré-operatório, 1°PO: 1° dia de pós-operatório, 5°PO: 5° dia de pós-operatório,

Cr: creatinina *(p<0,05)

Tabela 2 – Alterações celulares na microscopia óptica

(média de pontos para cada variável entre os 4 grupos)

	HT		DET		NT		DT		PLT		IMN		CON	
<i>Local</i>	<i>PI</i>	<i>PS</i>	<i>PI</i>	<i>PS</i>	<i>PI</i>	<i>PS</i>	<i>PI</i>	<i>PS</i>	<i>PI</i>	<i>PS</i>	<i>PI</i>	<i>PS</i>	<i>PI</i>	<i>PS</i>
Grupo 1	0,5	0,75	0,75	0,5	0,37	0,37	1	0,5	0,87	0,75	0,37	0,37	0,25	0
Grupo 2	0,37	0,62	0,87	0,87	0,25	0,25	0,75	0,25	0,5	0,37	0,25	0,5	0	0,12
Grupo 3	1	0,5	0,5	1	0,25	0	0,25	0,75	0,75	0,75	0,25	0,25	0	0,25
Grupo 4	0,25	0,25	1	0,75	0	0	0,25	0,75	0,25	0,75	1,25	0,25	0	0,25
Valor p	0,19	0,53	0,6	0,51	0,8	0,83	0,31	0,44	0,08	0,28	1	0,72	0,3	0,52

HT: hiperplasia tubular, DET: degeneração do epitélio tubular, NT: necrose tubular,

DT: dilatação tubular, PLT: proteína na luz tubular IMN: infiltrado mononuclear e

CON: congestão, PI: pólo inferior, PS: pólo superior

REFERÊNCIAS

1. Ward JP: Determination of the optimum temperature for regional renal hypothermia during temporary renal ischaemia. BJU 1975; 47(1): 17-24.
2. Wagenknecht LV, Hupe W, Bucheler E and Klosterhalfen H: Selective hypothermic of the kidney for intrarenal surgery. Eur Urol 1977; 3(2): 62-8.
3. Cockett ATK: The kidney and regional hypothermia. Surgery 1960;50(6):905-10.
4. Metzner PJ and Boyce WH: Simplified renal hypothermia: an adjunct to conservative renal surgery. BJU 1972; 44(1): 76-85.
5. Gill IS, Matin SF, Desai MM, Kaouk JH, Steinberg A, Mascha ED et al: Comparative Analysis of laparoscopic versus open partial nephrectomy for renal tumors in 200 patients. J Urol 2003; 170(1): 64-8.
6. Gill IS, Abreu SC, Desai MM, Steinberg AP, Ramani AP, NG C et al: Laparoscopic ice slush renal hypothermia for partial nephrectomy: the initial experience. J Urol. 2003; 170 (1): 52-6.

7. Janetschek G, Abelmaksoud A, Bagheri F, Alzahrani H, Leeb K and Gschwendtner M: Laparoscopic partial nephrectomy in cold ischemia: renal artery perfusion. J Urol. 2004; 171 (1): 68-71.
8. Landman J, Rehman J, Sundaram CP, Bhayani S, Monga M, Pattaras G et al: Renal hypothermia achieved by retrograde intracavitary saline perfusion. J Endourol 2002; 16 (7): 445-49.
9. Oliver J, MacDowell M and Tracy A: The pathogenesis of acute renal failure associated with traumatic and toxic injury. Renal ischemia, nephrotoxic damage and the ischemic episode. J Clin Invest 1951; 30(12:1): 1307-1439.
10. Rama Raju BV, Prakash A, Kapur M and Gulati SM: Acute renal ischemia and the effect of local hypothermia on the histological changes. An experiment study. Indian J Med Res 1969; 57(5): 925-31.
11. Gill IS, Desai MM, Kaouk JH, Meraney AM, Murphy DP, Sung GT et al: Laparoscopic partial nephrectomy for renal tumor: duplicating open surgical techniques. J Urol 2002; 167(2): 469-76.
12. Wickham JEA, Hanley MG and Joeke AM: Regional renal hypothermia. BJU 1967; 39(6): 727-43.

13. Novick AC: Renal hypothermia in vivo and ex vivo. *Urol Clin North Am* 1983; 10(4): 637-44.
14. Thompson RH, Frank I, Lohse CM, Saad IR, Fergany A and Novick AC: The impact of ischemia time during open nephron sparing surgery on solitary kidneys: a multi-institutional study. *J Urol*. 2007; 177(2): 471-6.
15. Laven BA, Orvieto MA, Chuang MS, Ritch CR, Murray P and Harland RC: Renal tolerance to prolonged warm ischemia time in a laparoscopic versus open surgery porcine model. *J Urol* 2004; 172(6 Pt 1): 2471-74.
16. Baldwin DD, Maynes LJ, Berger KA, Desai PJ, Zuppan CW, Zimmerman GJ et al: Laparoscopic warm renal ischemia in the solitary porcine kidney model. *Urology* 2004; 64(3): 592-7.
17. Badenoch AW and Damady EM: The effect of temporary occlusion of the renal artery in rabbits and relationship to traumatic uremia. *J Path & Bact* 1947; 59: 79-94.
18. Koletsky S: Effects of temporary interruption of the renal circulation in rats. *AMA Arch Path* 1954; 58(6): 592-603.

19. Mitchel RM: Studies on renal transplantation in sheep. Australian and New Zealand J Surg 1959; 28(4): 263-73.
20. Thomsen HS, Larsen S, Talner LB: Papillary morphology in adult human kidneys and in baby and adult pig kidneys: Eur Urol 1983; 9(3):170-80.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE FUNCTIONAL AND HISTOLOGICAL ALTERATIONS IN THE RENAL ISCHEMIA BY THE COMPARISON OF TWO HYPOTHERMAL TECHNIQUES. EXPERIMENTAL STUDY IN PIGS

EDUARDO PIOTTO LEONARDI, PAULO ROBERTO KAWANO, RODRIGO ARTUR OTSUKA, JULIANY QUITZAN, JOÃO LUIZ AMARO E OSCAR EDUARDO HIDETOSHI FUGITA

KEY WORDS: RENAL ISCHEMIA, HYPOTHERMIA, PARTIAL NEPHRECTOMY, LAPAROSCOPY, RENAL CANCER

STATE PAULISTA UNIVERSITY (UNESP), SCHOOL OF MEDICINE, DEPARTMENT OF UROLOGY, DISTRITO DE RUBIÃO JÚNIOR, BOTUCATU, SÃO PAULO, BRAZIL

18618-970

☎ 55 14 3811-6271/6802

FAX: 55 14 3822-0421

EDUARDO PIOTTO LEONARDI

DOM LUIZ I HOSPITAL, AVENIDA GENERALÍSSIMO DEODORO, 868 PRÉDIO DOS CONSULTÓRIOS II, SALA 2 (UROLaser – SERVIÇOS DE UROLOGIA LTDA) BELÉM – PA, BRAZIL

66055-240

☎ 55 91 30810708

FAX: 55 91 32251858

eduardo.leonardi@sbu.org.br

WORD COUNT: 2277

CONFLICT OF INTEREST: THIS RESEARCH HAD SUPPORT FROM THE FAPESP

INTRODUCTION

Renal surgeries such as partial nephrectomy, renal transplant and renovascular surgeries are clinical situations which often require the transitory interruption of renal blood flow. The renal hypothermia is one of the methods of renal function preservation which is the most efficient one in order to protect renal cells from lesions of ischemia and reperfusion. In 1975, Ward suggested that 15°C would be the ideal temperature to cause regional renal hypothermia.(1) Albeit there are several methods of renal hypothermia, it is traditionally obtained by renal cooling involving the kidney with ice slush after the obstruction of the renal artery.(2-4)

Nowadays, laparoscopic renal surgeries have developed a lot, which turned it to be an alternative to partial nephrectomy (LPN).(5) The technique of ice slush was reproduced to the laparoscopy, but presents technical difficulties in order to put the bag and to the introduction of the ice, which makes the method difficult to handle. Perfusion of cold solution in the renal artery is not widely used due to the risks of lesions in renal vessels.(6,7)

Landman *et al* proposed a model of retrograde endoscopic intracavitary cold saline perfusion.(8) It is an easy applicable technique and it allows getting a resection area clear free from ice and it avoids the cooling of anatomic structures which involve the surgical area. However, this technique brings doubts about its capacity to produce the ideal temperature in the proximal convoluted tubule, once it cools the renal medulla better than the cortex.(9,10)

This study intends to compare the Landman's technique with the traditional method of cooling with ice slush and to evaluate the functional alterations of the kidney and the histological alterations of cell brush borders of the proximal convoluted tubules of pigs kidneys.

MATERIALS AND METHODS

We used domestic male pigs with weighs between 15 and 20Kg. A day before the procedure, we collected samples of urine and blood in order to measure creatinine, urea, and also to obtain urine culture and urinary debt. With a Gibson like incision, the left kidney was submitted to the conditions which are part of the experiment, and afterwards, it was realized the nephrectomy of the right kidney. (Figure 1)

The measurement of the temperature was done by means of an electronic thermometer, inserting needles in the cortical and medullar layers of the renal parenchyma, two in the superior pole and two in the inferior one, oriented by a portable ultrasound with linear probe of 3 MHz. (Figures 2 e 3) In all the groups, the temperatures were measured every 5 minutes for 60 minutes. After the end of the experiment, the temperatures were measured for more 10 minutes.

The animals were sampled into 4 groups:

Group 1: Renal cooling by retrograde infusion of saline solution at 4°C with the occlusion of the renal pedicle. (eight animals)

After the cystotomy and identification of the left ureteral meatus, it was introduced a double lumen ureteral catheter number 6 FR, by means of what it was realized the a retrograde perfusion of saline solution at 4°C, propelled by an infusion bomb which created an ideal flow at a speed of 30ml/min (Figure 4). The other via of the catheter drained the intracavitary liquid irrigated. We started the perfusion after the occlusion of the entire renal pedicle with vascular clamps.

Group 2: External renal cooling involving the kidney with ice slush with the occlusion of the renal pedicle (eight animals)

It involved the left kidney with a bag created by a sterile glove forming an ice reserve. Right after the occlusion of the renal pedicle, ice slush was put over the kidney. (Figure 5)

Group 3: Occlusion of the renal pedicle without renal cooling – warm ischemia (four animals)

In this group just the occlusion of the renal pedicle was realized without submitting the kidneys to any technique of hypothermia. (Fig.6)

Group 4: Group of surgical control (four animals)

In this group, the animals were submitted to the same surgical procedure of the previous groups, but not to ischemia or hypothermia. (Figure 6)

In the post-operation, the animals were put in metabolic cages which allowed a rigorous measurement of the daily urinary debt. Samples of blood and urine were collected on the 1st and 5th post-operation days (PO) for the same biochemical analysis of the pre-operation. On the 5th day, the animals were sacrificed and the kidneys, pelvis and ureter removed “*en bloc*”. Cortical and medullary tissue specimens were taken from the upper pole, middle section, and lower pole of each kidney for histopathology study. All specimens were stained with hematoxylin and eosin. Two pathologists realized the semi-quantitative analysis and the following alterations were found: tubular hyperplasia, tubular epithelium degeneration, tubular necrosis, tubular dilatation, intraluminal protein, mononuclear infiltrate and congestion. Such alterations were graduated according to the following pattern: 0 – without alterations, 1 – weak alterations, 2 – mild alterations, 3- acute alterations. This analysis was realized without the pathologist’s having previous knowledge of the group which the samples analyzed belonged to.

RESULTS

All the urine cultures were negative.

3.1 – Temperature: the behavior of the temperatures among the groups are shown in figure 7.

Group 1: In average, the minimum temperatures of the medullar and cortical layers respectively were 24,9 and 25,4°C. In the first 20 minutes of the experiment the temperature fell at the speed of 0,37°C/ min in the medullar (33,68 to 26,2°C) and 0,28°C in the cortex (33,3 to 27,6°C). After 20 minutes, the temperature stabilized between 26,2 and 24,9°C in the medullar layer and between 27,6 and 25,4°C in the cortical layer it completed the 60 minutes. After the reestablishment of the blood perfusion and the hypothermia suspension, the return to the initial temperature took place at the speed of 0,58°C/ min in the medullar layer and 0,53°C in the cortical. (figure 7)

Group 2: In average, the minimum temperatures of the medullar and cortical layers respectively were 6,38 and 5°C. The temperature fell in the 20 first minutes at the speed of 1,44°C/min, (33,8 to 5°C) in the cortical layer and 1,37°C/min (33,9 to 6,5°C) in the medullar. After 20 minutes, the temperature stabilized between 5 and 6,8°C in the cortical layer and between 6,5 and 7,8°C in the medullar layer until it completed the 60 minutes. In the first 10 minutes after the return of the renal blood perfusion, the temperature rose at the speed of 2,4°C/min in the cortical and 2,3°C in the medullar. (figure 7)

Group 3: The average temperatures between the cortical and medullar layers were kept stable between the times of measurement. (figure 7)

Group 4: There were no changes between the cortical and medullar temperatures while the experiment. (fig.7)

3.2 – Creatinine and urea: the average variations of the values of creatinine and urea among the groups are in table 1. For these variables it was realized the variance analysis to compare the groups having in mind the times.

Pre-operation: the average values of creatinine among animals varied from 0,81 to 1,34 mg/dl and the difference between the groups were not significant. ($p=0,57$) The average values of the urea levels followed the variation of the levels of creatinine. The variation among the groups were of 20,2 to 29 mg/dl and there was no significant difference either. ($p=0,60$)

1st PO: the average values of creatinine varied from 1,55 to 2,68 mg/dl, showing no significant difference among the groups in this time. ($p=0,15$) The average values of urea varied from 77,2 to 53,7 mg/dl, with significant differences among the groups. ($p=0,011$)

5th PO: the average values of creatinine varied from 2,43 to 1,07 mg/dl, showing no significant difference among the groups. ($p=0,1$) The average values of urea varied from 57,4 to 44,9 mg/dl without difference among the groups. ($p=0,48$)

3.3 – Diuresis: a fall in the diuresis average volume took place on the 1st PO of all groups. On the subsequent days, there was a gradual and equivalent increase in the diuresis average volume. (figure 8)

3.4 – Histology – in the histological analysis it was applied the exact test of Fisher. No animal presented, in any of the variables evaluated, acute alteration. Note that, for each histological studied variable, there was no statistically significant difference among the four groups, considering that the average levels between the points of each variable were not higher than 1,25, or, in average, the alterations were weak at the most. (table 2)

DISCUSSION

The recent availability of non-traumatic vascular clamps allowed the LNP duplicate the open technique.(11) In spite of the different hypothermia methods which were proposed to facilitate its application in the laparoscopy, we highlight two techniques applied in the present study.(6-8)

In a study with dogs, Ward determined 15°C as a great temperature to protect the kidneys from ischemia and reperfusion lesions and, Wickham *et al*, showed that between 15° and 20°C, rabbits' kidneys did not present functional alterations, even for periods of up to 3 hours of cold ischemia (CI).(1,12). In none of our studied groups in which renal hypothermia was produced, being by retrograde infusion or through contact with ice slush, it was possible to keep the temperatures close to the ideal.

In group 1, we reproduced the technique described by Landman *et al* and we obtained similar results.(8) This technique cooled the medullar better than the renal cortex. After 20 minutes of ischemia, the average temperature of the cortex kept itself over the ideal, between 25,4°C and 27,6°C. In group 2, oppositely to what happened in group 1, this technique cooled the cortex better, and the lowest average temperature

reached in this layer was 5°C, different to Landman *et al* study, in which the lowest cortical temperature was 23,7°C.(8) The average temperature of this layer kept itself between 5 and 6,8°C, about 10°C below the ideal. Ward showed that temperature extremes either above or below 15°C (37 ou 0°C) may harm renal function. Both the present study and Landman *et al* did not present renal function alterations being in groups of warm ischemia (WI), being in groups of CI.(1,8) Wickham *et al* showed that temperatures between 15 and 20°C gave the highest level of renal protection. However, temperatures between 5 and 30°C with 45 minutes of ischemia induce little harm to renal function in rabbits.(12) In a retrospective study in humans submitted to the technique of hypothermia with ice slush, Metzner *et al* observed that the use of this technique gives temperatures around 5°C in the renal cortex and does not consider this to cause any harm to renal function.(4)

Both in the comparison of groups 1 and 2 and in the isolated comparison of each of the groups with the control group, we did not find functional and histological differences statistically significant. Such observations were similar to the study of Landman *et al*.(8) Curiously, the animals in group 3, submitted to 60 minutes of WI, did not present acute functional or histological alterations despite times above 30 minutes of WI may induce irreversible harm to renal function.(10) The alterations produced in this group were statistically similar to those found in other groups.

The time of WI that a human kidney stands without the renal cells suffer from irreversible lesions from ischemia and reperfusion is yet controversial. Studies in several animal models, including pigs, from the 1960 and 1980 decades, concluded that 30 minutes would be the maximum time of WI that may be tolerated without detectable

depression of renal function.(12,13) In a recent retrospective study in human, Thompson *et al* evaluated the impact of the time of the ischemia in 537 patients with solitary kidney who underwent open nephron sparing surgery and concluded that 20 and 35 minutes are the maximum time that solitary kidneys tolerate the WI and CI, respectively.(14) On the other hand, recent studies realized in pig model suggest that these animals stand a time of WI superior to 90 minutes, either in open surgeries or laparoscopic ones.(15,16). These last works may explain either the lack of statistic significance in the majority of the studied variables or the conclusions of Landman *et al*. Sixty minutes of WI were not enough to cause laboratorial and/or important acute cellular alterations in group 3, suggesting that time lower than 90 minutes of WI may not be used in a pig model.

The time of warm ischemia that a mammal kidney stands may vary according to the species. Rats stand up to 2 hours of WI and lambs up to 90 minutes. In rabbits, the time of WI above two hours is fatal.(17-19) Although the porcine kidney has very similar anatomic characteristics to a human kidney, it is possible that there is not the same correspondence in relation to renal function.(20)

The possibility that human renal cells could stand 90 minutes of WI such as the pig renal cells, would allow enough time to the realization of LPN in complex renal tumors, without the worry of submitting the renal tissue to any cooling technique. However, it is frightening to be based on such studies to apply a safe time of ischemia in human beings. It seems that the study of Thompson *et al* is closer to a real situation, in spite of being treating of a retrospective study.(14)

CONCLUSIONS

There was no statistically significant difference among the methods of renal hypothermia of contact with ice slush and the retrograde cooling by the infusion of a saline solution at 4°C in the excretory via.

The absence of statistically significant difference in clinic and histological parameter studied among the groups may be attributed to the time of WI realized and/or the animal model used. Times of WI superior to 90 minutes in the pig model maybe necessary to reproduce the cellular and functional alterations caused by WI in humans.

Figure 1: Incision



Figure 2 – Equipments. (A) ultrasound e (B), Electronic thermometer.



Figure 3 – Introduction of needles in the kidney under ultrasound control

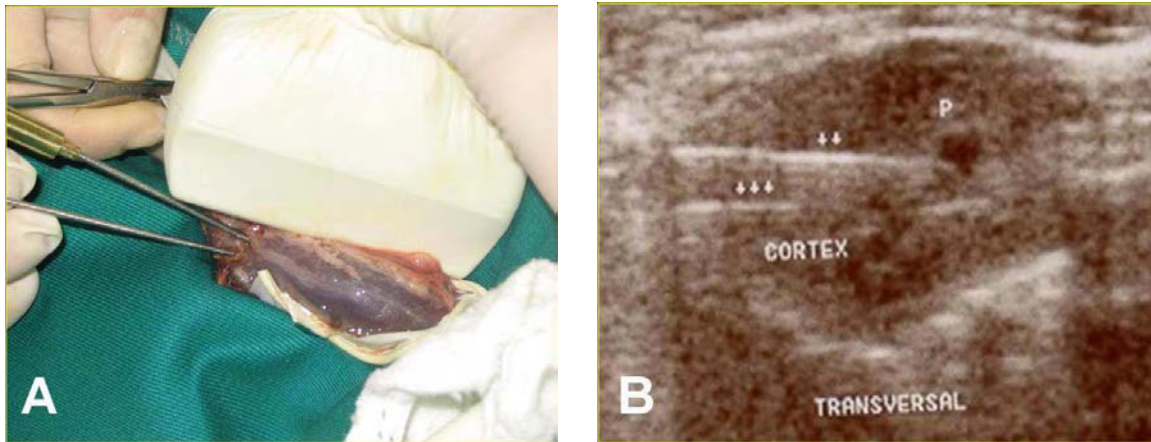


Figure 4 – Group 1. (A), Double lumen ureteral catheter. (B), Equipments location

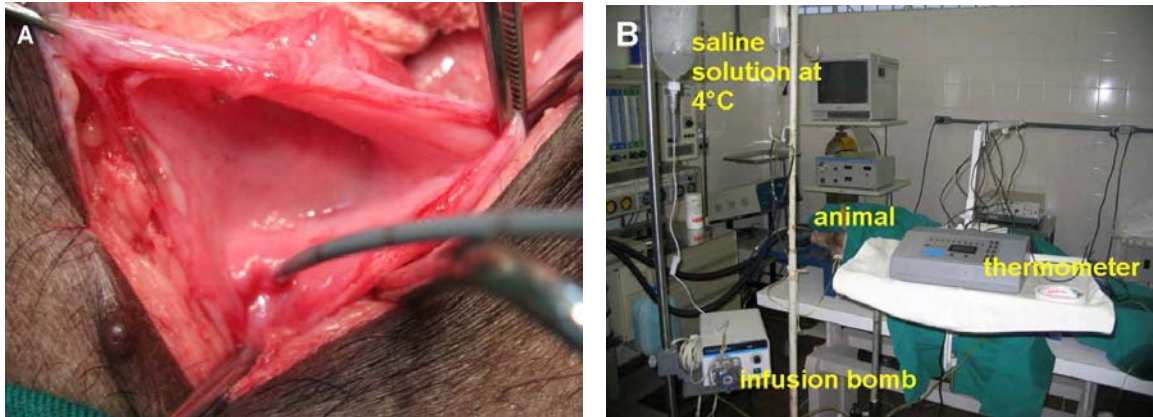


Figure 5 – Group 2 Experiment

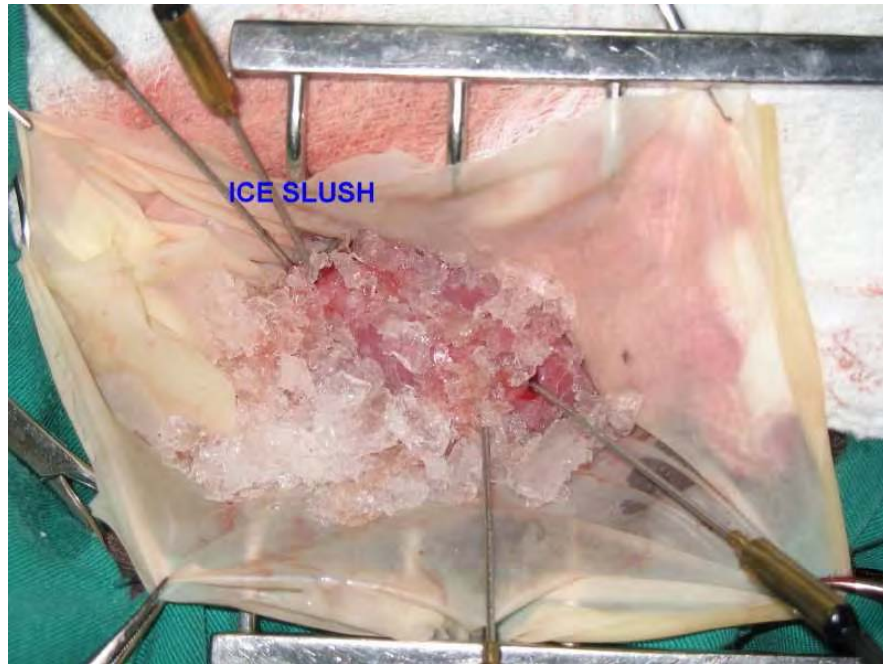


Figure 6 – Group 3 (warm ischemia) e 4 (without ischemia and without hypothermia)

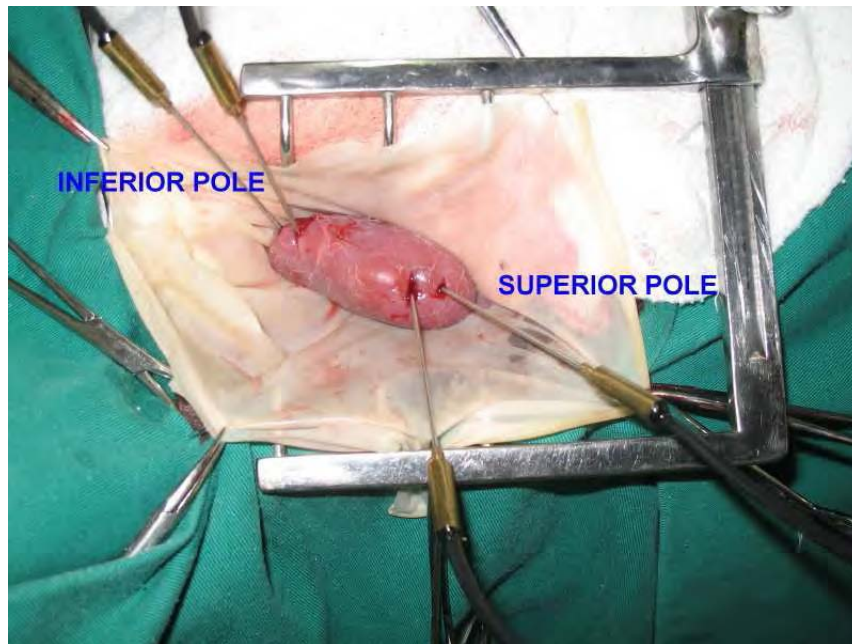


Figure 7 – Results of experiments (temperature)

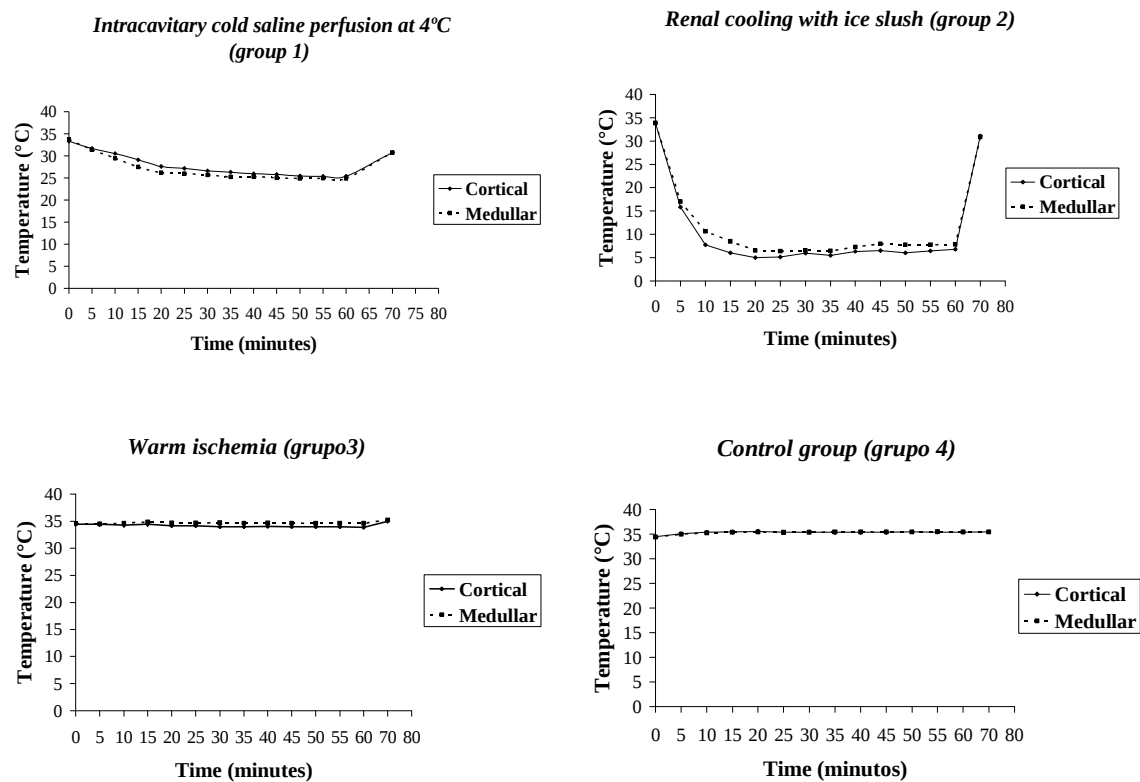


Figura 8: Diuresis development during the experiment

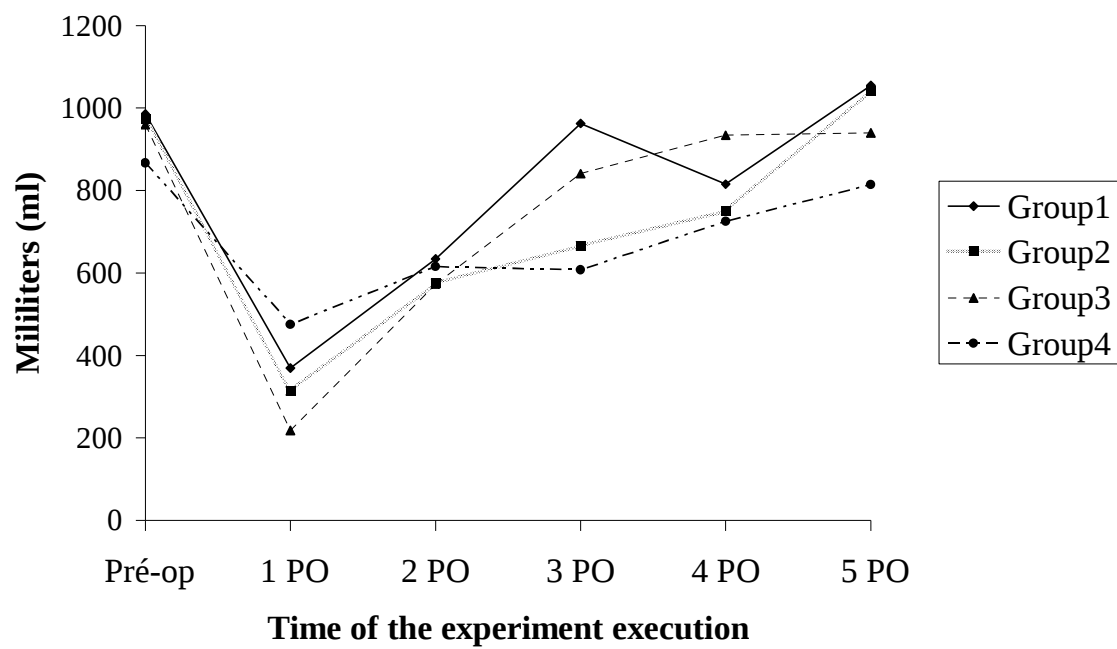


Table 1 – Average of values of creatinine and urea (mg/dl) among groups

	<i>Group 1</i>		<i>Group 2</i>		<i>Group 3</i>		<i>Group 4</i>		<i>value p</i>	
	<u>Cr</u>	<u>Urea</u>	<u>Cr</u>	<u>Urea</u>	<u>Cr</u>	<u>Urea</u>	<u>Cr</u>	<u>Urea</u>	<u>Cr</u>	<u>Urea</u>
<i>Pre-op</i>	0,81	21	1,34	29	0,87	20,2	0,85	27,2	0,57	0,60
<i>1st PO</i>	2,68	77,2	2,07	63,1	2,15	64	1,55	53,7	0,15	0,011*
<i>5th PO</i>	2,43	57,4	1,27	44,9	1,42	48,7	1,07	45	0,10	0,48

Pre-op: pre-operation, 1st PO: 1st post operation day, 5th PO: 5th post operation day,

Cr: creatinine, *(p<0,05)

Table 2 – Cellular alterations in the optical microscopy
(average of points for each variable among the four groups)

	TH		TED		TN		TD		PTL		MNI		CON	
<i>Local</i>	<i>IP</i>	<i>SP</i>	<i>IP</i>	<i>SP</i>	<i>IP</i>	<i>SP</i>	<i>IP</i>	<i>SP</i>	<i>IP</i>	<i>SP</i>	<i>IP</i>	<i>SP</i>	<i>IP</i>	<i>SP</i>
Group 1	0,5	0,75	0,75	0,5	0,37	0,37	1	0,5	0,87	0,75	0,37	0,37	0,25	0
Group 2	0,37	0,62	0,87	0,87	0,25	0,25	0,75	0,25	0,5	0,37	0,25	0,5	0	0,12
Group 3	1	0,5	0,5	1	0,25	0	0,25	0,75	0,75	0,75	0,25	0,25	0	0,25
Group 4	0,25	0,25	1	0,75	0	0	0,25	0,75	0,25	0,75	1,25	0,25	0	0,25
Value p	0,19	0,53	0,6	0,51	0,8	0,83	0,31	0,44	0,08	0,28	1	0,72	0,3	0,52

TH: tubular hyperplasia, TED: tubular epithelium degeneration, TN: tubular necrosis, TD: tubular dilatation, PTL: protein in the tubular light, MNI: mononuclear infiltrate and CON: congestion. IP: inferior pole, SP: superior pole

REFERENCES

1. Ward JP: Determination of the optimum temperature for regional renal hypothermia during temporary renal ischaemia. BJU 1975; 47(1): 17-24.
2. Wagenknecht LV, Hupe W, Bucheler E and Klosterhalfen H: Selective hypothermic of the kidney for intrarenal surgery. Eur Urol 1977; 3(2): 62-8.
3. Cockett ATK: The kidney and regional hypothermia. Surgery 1960;50(6):905-10.
4. Metzner PJ and Boyce WH: Simplified renal hypothermia: an adjunct to conservative renal surgery. BJU 1972; 44(1): 76-85.
5. Gill IS, Matin SF, Desai MM, Kaouk JH, Steinberg A, Mascha ED et al: Comparative Analysis of laparoscopic versus open partial nephrectomy for renal tumors in 200 patients. J Urol 2003; 170(1): 64-8.
6. Gill IS, Abreu SC, Desai MM, Steinberg AP, Ramani AP, NG C et al: Laparoscopic ice slush renal hypothermia for partial nephrectomy: the initial experience. J Urol. 2003; 170 (1): 52-6.

7. Janetschek G, Abelmaksoud A, Bagheri F, Alzahrani H, Leeb K and Gschwendtner M: Laparoscopic partial nephrectomy in cold ischemia: renal artery perfusion. *J Urol*. 2004; 171 (1): 68-71.
8. Landman J, Rehman J, Sundaram CP, Bhayani S, Monga M, Pattaras G et al: Renal hypothermia achieved by retrograde intracavitary saline perfusion. *J Endourol* 2002; 16 (7): 445-49.
9. Oliver J, MacDowell M and Tracy A: The pathogenesis of acute renal failure associated with traumatic and toxic injury. Renal ischemia, nephrotoxic damage and the ischemic episode. *J Clin Invest* 1951; 30(12:1): 1307-1439.
10. Rama Raju BV, Prakash A, Kapur M and Gulati SM: Acute renal ischemia and the effect of local hypothermia on the histological changes. An experiment study. *Indian J Med Res* 1969; 57(5): 925-31.
11. Gill IS, Desai MM, Kaouk JH, Meraney AM, Murphy DP, Sung GT et al: Laparoscopic partial nephrectomy for renal tumor: duplicating open surgical techniques. *J Urol* 2002; 167(2): 469-76.
12. Wickham JEA, Hanley MG and Joeke AM: Regional renal hypothermia. *BJU* 1967; 39(6): 727-43.

13. Novick AC: Renal hypothermia in vivo and ex vivo. *Urol Clin North Am* 1983; 10(4): 637-44.
14. Thompson RH, Frank I, Lohse CM, Saad IR, Fergany A and Novick AC: The impact of ischemia time during open nephron sparing surgery on solitary kidneys: a multi-institutional study. *J Urol*. 2007; 177(2): 471-6.
15. Laven BA, Orvieto MA, Chuang MS, Ritch CR, Murray P and Harland RC: Renal tolerance to prolonged warm ischemia time in a laparoscopic versus open surgery porcine model. *J Urol* 2004; 172(6 Pt 1): 2471-74.
16. Baldwin DD, Maynes LJ, Berger KA, Desai PJ, Zuppan CW, Zimmerman GJ et al: Laparoscopic warm renal ischemia in the solitary porcine kidney model. *Urology* 2004; 64(3): 592-7.
17. Badenoch AW and Damady EM: The effect of temporary occlusion of the renal artery in rabbits and relationship to traumatic uremia. *J Path & Bact* 1947; 59: 79-94.
18. Koletsky S: Effects of temporary interruption of the renal circulation in rats. *AMA Arch Path* 1954; 58(6): 592-603.

19. Mitchel RM: Studies on renal transplantation in sheep. Australian and New Zealand J Surg 1959; 28(4): 263-73.
20. Thomsen HS, Larsen S, Talner LB: Papillary morphology in adult human kidneys and in baby and adult pig kidneys: Eur Urol 1983; 9(3):170-80.



CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 408 sobre o projeto de pesquisa intitulado "Hipotermia renal por resfriamento externo com gelo e por perfusão retrógrada de solução salina fria na via excretora: alterações funcionais e histológicas. Modelo animal em suínos" sob a responsabilidade do Prof. Dr. Oscar Eduardo H. Fugita, com a colaboração de Eduardo Platto Leonardi, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os suínos são provenientes de Biotério convencional sem condições de emitir Atestado de Sanidade.

Projeto de pesquisa aprovado em 11 de agosto de 2004

Prof. Dr.ª Norma Sueli P. Modolo

Presidente do CEEA

Alberto Santos Capelluppi

Membro do CEEA

INFORMATION FOR AUTHORS

Manuscripts submitted for publication should be sent by:

- **E-mail** with attached text files and figures to the e-mail bellow:
submission@brazjurol.com.br
- **or Mail to:**
Dr. Fracisco J. B. Sampaio, Editor
International Braz J Urol
Rua Bambina, 153
Rio de Janeiro, RJ, 22251-050, Brazil

A submission letter signed by all authors must accompany each manuscript. This letter must state that: a)- the paper or portion thereof have not been previously published and are not under consideration by another Journal, b)- that all authors have contributed to the information or material submitted for publication, and that all authors have read and approved the manuscript, c)- that the authors have no direct or indirect commercial financial incentive associated with publishing the manuscript, d)- that the source of extra-institutional funding, specially that provided by commercial companies, is indicated.

After accepted for publication, the manuscript will become property of the International Braz J Urol.

Conflict of Interest – Any conflict of interest, mainly financial agreement with companies whose products are alluded to in the paper, must be clearly disclosed when submitting a manuscript for review. If accepted, a disclosure will be published in the final manuscript.

The requirements for authorship and the general rules for preparation of manuscripts submitted to the **International Braz J Urol** are in accordance with the *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* (International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. Ann Intern Med, 126: 36-47, 1997). An electronic version of the Uniform Requirements is available on various websites, including the International Committee of Medical Journal Editors web site: www.icmje.org.

In response to the concerns of the editors of scientific medical journals with ethics, quality and seriousness of published articles, a Committee on Publication Ethics (COPE) was established in 1997 and a guideline document was published. The **International Braz J Urol** signed, approved, and follows the COPE guidelines. The Editor strongly encourages the authors to carefully read these guidelines before submitting a manuscript (www.publicationethics.org.uk/guidelines or www.brazjurol.com.br, vol. 26 (1): 4-10, 2000).

Peer Review – All submissions are subject to editorial review. Typically, each manuscript is anonymously forwarded by the Editor to 3 Reviewers (at least 2). If the Editor receives conflicting or inconclusive revisions, the manuscript is always sent to 1 or 2 Reviewers before the Editor's decision. If considered necessary by the Editor or by the

Reviewers, statistical procedures included in the manuscript will be analysed by a statistician.

The **International Braz J Urol** contains six sections: **Clinical Urology, Surgical Technique, Pediatric Urology, Urological Neurology, Investigative Urology, and Urological Survey**. The articles should be written in English official orthography.

Abbreviations should be avoided, and when necessary must be specified when first time mentioned. Unusual expressions may not be used.

Every manuscript submitted to publication should have a cover page containing the title, short title (up to 50 characters), authors and institution. Up to six key words should be provided. These words should be identical to the medical subject headings (MeSH) that appear in the Index Medicus of the National Library of Medicine (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>).

One of the authors should be designated as correspondent and the complete correspondence address, telephone and fax numbers and E-mail should be provided.

If any financial support has been provided, the name of the institution should be mentioned.

Original Articles, Pediatric Urology and Urological Neurology: Original articles should contain a Cover Page, Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References, Tables and Legends, each section beginning in a separate page and numbered consecutively. Original articles should cover contemporary aspects of Urology. The manuscript text should contain no more than 2500 words, excluding the Abstract. The number of authors is limited to five. References should contain no more than 20 citations, including the most important articles on the subject. Articles not related to the subject must be excluded.

Review and State of the Art: Review and State of the Art articles are accepted for publication upon Editorial Board's request only. A Review Article is a critical analysis of the most recent published manuscripts dealing with a urological topic. A State of the Art article is the view and experience of a recognized expert in the topic. An abstract must be provided.

Surgical Technique: These manuscripts should present new surgical techniques or instruments and should contain Introduction, Surgical Technique, Comments and up to five References. An abstract must be provided.

Investigative Urology: The aim of this section is the publication of experimental studies on Basic Sciences applied to urology. The sections of the manuscript are the same of Original Articles.

Urological Survey: Will be published upon the Editor decision.

Letters to the Editor: The letter should be useful for urological practice and must not exceed 500 words. They will be published according to the Editorial Board evaluation.

ILLUSTRATIONS:

The illustrations should not be sent merged in the text. They should be sent separately, in the final of the manuscript.

- 1) The number of illustrations should not exceed 10 per manuscript.
- 2) Check that each figure is cited in the text.
- 3) The legends must be sent in a separate page.
- 4) The legends of histological illustrations should contain the histological technique and the final magnification.
- 5) The International Braz J Urol encourages color reproduction of illustrations wherever appropriate.
- 6) **All histological illustrations should be supplied in color.**

ELECTRONIC SUBMISSION

- 1) **Do not embed the figures in the text, but supply them as separate files.**
- 2) **For Submitting Photographs Electronically, please:**

Supply photographs as TIFF (preferable) or JPG files. The TIFF of JPG should be saved at a resolution of 300 dpi (dots per inch) at final size. If scanned, the photographs should be scanned at 300 dpi, with 125mm width, saved as TIFF file and in grayscale, **not embed in Word or PowerPoint.**

- 3) **For Submitting Line Artwork Electronically please note that:**

Line drawings must be supplied as EPS files (give an EPS extension, e.g. Fig01.eps). Use black text over light to mid grey and white text over dark grey or black shades. Use lower case for all labeling, except for initial capitals for proper nouns and necessary mathematical notation. Centre each file on the page and save it at final size with the correct orientation. We recommend a minimum final width of 65 mm, but note that artwork may need to be resized and relabeled to fit the format of the Journal.

- 4) **IMPORTANT - Avoid - Do Not**

- a) **DO NOT embed the images in the text; save them as a separate file**
- b) **DO NOT supply artwork as a native file. Most illustration packages now give the option to “save as” or export as EPS, TIFF or JPEG.**
- c) **DO NOT supply photographs in PowerPoint or Word. In general, the files supplied in these formats are at low resolution (less than 300 dpi) and unsuitable for publication.**
- d) **DO NOT use line weights of less than 0.25 point to create line drawings, because they will not appear when printed.**

HARD COPY SUBMISSION

We can accept good quality, 9 x 12 cm, glossy black-and-white or color photographs, unmounted and not attached by clips. The correct position, the name of the manuscript and the number of the photo should be written using a pencil or label on the reverse side of the photograph.

TABLES: The tables should be numbered with Arabic numerals. Each table should be typed on a single page, and a legend should be provided for each table. Number tables consecutively and cite each table in text in consecutive order.

REFERENCES: The References should be numbered following the sequence that they are mentioned in the text. The references should not be alphabetized. They must be identified in the text with Arabic numerals in parenthesis. Do not include unpublished material and personal communications in the reference list. If necessary, mention these in the body of the text. Self-citations should be kept to a minimum. For abbreviations of journal names refer to the "List of Journals Indexed in Index Medicus" (<http://www.nlm.nih.gov>). The authors must present the references according to the following examples; the names of **all authors** must be included; when exist more than six authors, list the first six authors followed by **et al.** The **initial** and the **final** pages of the reference should be provided:

Papers published in periodicals:

- Paterson RF, Lifshitz DA, Kuo RL, Siqueira Jr TM, Lingeman JE: Shock wave lithotripsy monotherapy for renal calculi. *Int Braz J Urol.* 2002; 28:291-301.
- Holm NR, Horn T, Smedts F, Nordling J, de la Rossette J: Does ultrastructural morphology of human detrusor smooth muscle cell characterize acute urinary retention? *J Urol.* 2002; 167:1705-9.

Books:

- Sabiston DC: Textbook of Surgery. Philadelphia, WB Saunders. 1986; vol. 1, p. 25.

Chapters in Books:

- Penn I: Neoplasias in the Allograft Recipient. In: Milford EL (ed.), *Renal Transplantation*. New York, Churchill Livingstone. 1989; pp. 181-95.

The *Int Braz J Urol* has the right to reject inappropriate manuscripts (presentation, number of copies, subjects, etc.) as well as proposes modifications in the original text, according to the Referees' and Editorial Board opinion.

THE EDITORS SUGGEST THE AUTHORS TO OBSERVE THE FOLLOWING GUIDELINES WHEN SUBMITTING A MANUSCRIPT:

The Ideal Manuscript may not exceed 2500 words.

The **Title** must be motivating, trying to focus on the objectives and content of the manuscript.

Introduction must exclude unnecessary information. It should briefly describe the reasons and objective of the paper.

Materials and Methods should describe how the work has been done. It must contain sufficient information to make the study reproducible. The statistical methods have to be specified.

The **Results** should be presented using Tables and Figures whenever possible. Excessive Tables and Figures must be avoided. The tables should not be repeated on the text.

The **Discussion** must comment only the results of the study, considering the recent literature.

Conclusions must be strictly based on the study findings.

References should contain no more than 20 citations, including the most important articles on the subject. Articles not related to the subject must be excluded.

The Abstract must contain up to 250 words and must conform to the following style: Purpose, Materials and Methods, Results and Conclusions. Each section of the manuscript must be synthesized in short sentences, focusing on the most important aspects of the manuscript. **The authors must remember that the public firstly read only the Abstract, reading the article only when they find it interesting.**

NOTES:

1. Recent issues of the International Braz J Urol must be observed concerning the presentation form of the manuscript.
2. If the article is submitted as hard copy, the authors must send a 3.5-inch labeled computer diskette with the final printed version of the manuscript in Microsoft Word software. The version in diskette must be identical of the printed version. The same orientation concerning Illustration and specified above, is valid here.

MANUSCRIPT CHECKLIST

The authors should observe the following checklist before submitting a manuscript to the International Braz J Urol

- ✓ The sequence of manuscript arrangement is according to the Information for Authors.
- ✓ The Article is restricted to about 2,500 words and 5 authors.
- ✓ The place where the work was performed is not mentioned on the text, enabling blind review.
- ✓ Standard abbreviations were avoided and are defined when first used and are consistent throughout the text.
- ✓ Generic names are used for all drugs. Trade names are avoided.
- ✓ Normal laboratory values are provided in parenthesis when first used.
- ✓ The references were presented according to the examples provided in the Information for Authors. The references were numbered consecutively, following the sequence that they are mentioned in the text. They were identified in the text using Arabic numeral in parenthesis. The names of all authors were provided. When exist more than six authors, list the first six authors followed by et al. The initial and the final pages of the reference should be provided.
- ✓ The staining technique and the final magnification were provided for all histological illustrations. The histological illustrations are supplied in color.
- ✓ Legends were provided for all illustrations, tables, and charts. All tables and charts were printed in separate pages and referred to in the text. All illustrations were labeled and their top was indicated on the reverse side. All illustrations and tables are cited in the text.
- ✓ An Abstract was provided for all type of articles. The length of the Abstract is about 250 words.
- ✓ A corresponding author with complete address, telephone, Fax, and E-mail are provided.
- ✓ A submission letter and a disclosure form, signed by all authors, are included.
- ✓ The authors should included written permission from publishers to reproduce or adapt a previously published illustrations or tables.
- ✓ **Conflict of Interest** – Any conflict of interest, mainly financial agreement with companies whose products are alluded to in the paper, is clearly disclosed in the manuscript.
- ✓ **Check that each figure is cited in the text. The illustrations are not merged in the text.**
- ✓ The photographs are supplied as TIFF or JPG files and saved at a resolution of 300 dpi (dots per inch) at final size.
- ✓ The photographs should be scanned at 300 dpi, with 125mm width, saved as TIFF file and in grayscale, **not embed in Word or PowerPoint.**