

Effect of unilateral renal ischemia on the contralateral kidney assessed by Caspase 3 expression

Efeito da isquemia renal unilateral no rim contralateral avaliada pela expressão de Caspase 3

Carolina Rodrigues Dal Bo^{1,2} , Vitória Penido de Paula^{1,2} , Anna Paula Weinhardt Baptista Strazzi³ , Nelson Wolosker^{1,2,4} , Thiago Pinheiro Arrais Aloia^{3,4} , Angela Mazzeo³ , Oskar Grau Kaufmann^{3,4} 

Abstract

Background: Studies have demonstrated with histological analysis and Doppler flow measurement analysis that unilateral renal ischemia, which is performed in some surgeries, interfered with the contralateral kidney, identifying the phenomenon of kidney-kidney crosstalk. **Objectives:** To identify the effects on the ischemic and contralateral kidney of renal ischemia induced by two types of clamping technique by analyzing the volume of kidney cells positive for Caspase 3. **Methods:** Sixteen pigs were divided into 2 groups, as follows: A (n = 8) – clamping of left renal artery only and AV (n = 8) – clamping of left renal artery and vein. Immunohistochemical analyses (anti Caspase 3) were conducted with biopsy specimens collected from the ischemic and contralateral kidney at 0, 30, 60, and 90 minutes of ischemia and morphometric analysis was performed, taking the mean to represent the volume of the Caspase 3 positive area (%). **Results:** Morphometric analysis of specimens collected at 30, 60, and 90 minutes of ischemia showed that the mean area marked for Caspase 3 was statistically larger in the contralateral kidney than the ischemic kidney in both groups: clamped renal artery (A) and clamped renal artery and vein (AV). Comparing the ischemic and contralateral kidney, there was no statistically significant difference in the area marked for Caspase 3 between the two types of clamping. **Conclusions:** In the experimental model of unilateral renal ischemia, the non-ischemic kidney exhibited cell damage, demonstrated by Caspase 3 expression. The type of hilum clamping does not appear to influence the area marked for Caspase 3.

Keywords: apoptosis; kidney; ischemia; immunohistochemistry; Caspase 3.

Resumo

Contexto: Estudos demonstraram, por análise histológica e Dopplerfluxométrica, a interferência da isquemia renal unilateral, realizada em algumas cirurgias, sobre o rim contralateral, identificando o fenômeno de *kidney-kidney crosstalk*. **Objetivos:** Identificar o efeito da isquemia de duas estratégias de oclusão da vasculatura renal esquerda sobre o rim contralateral através do volume de células renais positivas para Caspase 3. **Métodos:** Suínos foram divididos em 2 grupos: A (n = 8), artéria renal esquerda clampeada, e AV (n = 8), artéria e veia renais esquerdas clampeadas. Foi realizado o estudo imuno-histoquímico (anti-Caspase 3), com o material de biópsias coletadas do rim isquêmico e contralateral em 0, 30, 60 e 90 minutos de isquemia, e análise morfométrica, sendo que a média representou o volume de área de Caspase 3 positiva (%). **Resultados:** A análise morfométrica do rim contralateral nos tempos 30, 60 e 90 minutos de isquemia mostrou que a média da área marcada por Caspase 3 foi estatisticamente superior à média do rim isquêmico nos dois grupos: artéria renal clampeada (A) e artéria e veia renais clampeadas (AV). Comparando o rim isquêmico e contralateral nos dois tipos de clameamento, não houve diferença estatisticamente significativa da área marcada por Caspase 3. **Conclusões:** No modelo experimental de isquemia renal unilateral, o rim não isquêmico apresentou dano celular, demonstrado pela expressão da Caspase 3 de forma aguda em decorrência da isquemia contralateral. O tipo de clameamento do hilo não parece ter influência sobre o volume de área marcada por Caspase 3.

Palavras-chave: apoptose; rim; isquemia; imuno-histoquímica; Caspase 3.

How to cite: Bo CRD, Paula VP, Strazzi APWB, et al. Effect of unilateral renal ischemia on the contralateral kidney assessed by Caspase 3 expression. *J Vasc Bras.* 2021;20:e20210040. <https://doi.org/10.1590/1677-5449.210040>

¹ Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein – FICSAE, São Paulo, SP, Brasil.

² Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo, SP, Brasil.

³ Instituto de Ensino e Pesquisa – IIEP, Hospital Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil.

⁴ Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, SP, Brasil.

Financial support: A research scholarship was sponsored by Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP).

Conflicts of interest: No conflicts of interest declared concerning the publication of this article.

Submitted: March 25, 2021. Accepted: May 14, 2021.

The study was carried out at Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), São Paulo, SP, Brazil.



Copyright© 2021 The authors. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

■ INTRODUCTION

Temporary occlusion of renal blood flow by clamping the renal artery or simultaneously clamping the renal artery and vein is a procedure routinely employed in partial nephrectomy in order to reduce intraoperative bleeding.¹⁻⁴ Patients who undergo this procedure may develop transitory or even definitive acute renal failure and the duration of clamping is a determinant factor.

The relationship between the risk of renal injury and the type of clamping performed is controversial in the literature – some studies suggest that simultaneously occluding both arterial and venous flow causes less renal damage after surgery. Other studies suggest that clamping the renal artery only is the better approach, claiming that the presence of venous flow causes less kidney damage.^{5,6}

Several experimental studies⁷⁻⁹ have demonstrated that renal ischemia interferes to reduce the function of distant organs, such as the liver, heart, brain, and lungs, in a mechanism known as organ crosstalk. Two recent studies observed that unilateral renal ischemia affected the contralateral kidney, identifying the phenomenon of kidney-kidney crosstalk, demonstrated by histological analysis and by increases in resistance and pulsatility indexes calculated with Doppler flow measurement.^{10,11}

Studies have shown that immunohistochemical analysis is a technique with high sensitivity for early detection of ischemic injury. Some authors suggest it can be used to plug gaps left by histological analysis of tissue ischemia.¹²⁻¹⁵ One immunohistochemical marker, Caspase 3, is a known marker of apoptosis that has been described in ischemic damage to several organs, including the brain, heart, and liver.¹⁶

We reviewed the literature and found no studies that have investigated the effect of unilateral renal ischemia on the contralateral kidney using immunohistochemical Caspase 3 analysis.

■ OBJECTIVE

The objective of this study was to identify the effect of renal ischemia by clamping of the left renal artery only and by simultaneous clamping of the left renal artery and vein on the ischemic kidney and the contralateral kidney, analyzing the volume of renal cells positive for Caspase 3 over the course of the time in ischemia.

■ METHODS

The surgical study was conducted between January and December of 2016 at the Surgical Experimentation and Training Center at the Hospital Israelita Albert Einstein (CETEC), accredited by the American

Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC), is in accordance with the standards set out by the National Board of Control for Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Animal Use and Care Committee at the Hospital Israelita Albert Einstein (protocol CEUA 3290). The immunohistochemical analysis was performed at a laboratory run by the Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (IIEP), from April 2018 to April 2019.

Sixteen Large White pigs, aged from 90 to 120 days, and weighing 30 kg each were divided into two groups of eight animals according to the type of renal clamping: group AV, with clamping of both the left renal artery and vein, and group A, with clamping of the left renal artery only. Biopsies were taken concomitantly from each animals' ischemic kidney and contralateral non-ischemic kidney (the right kidney was the non-ischemic kidney) at 0, 30, 60, and 90 minutes of ischemia. Biopsies were processed in paraffin blocks and cut into 5 µm slices which were mounted on slides and used for immunohistochemical analysis.

Anesthetic procedure and intraoperative technique

All of the animals were anesthetized in advance with intramuscular injection of Ketamine (10.0 mg/kg) and Midazolam (0.25 mg/kg), mixed in the same syringe. Fifteen minutes after the injection, the marginal vein of the ear was catheterized with a 20 or 22 caliber catheter (BD Insystem, BectonTherapy Systems Inc., Utah, United States)¹⁷ to provide venous access for anesthetic induction, which was accomplished using 7 mg/kg of Thiopental. Size 6.5 to 8.5 endotracheal tubes (Portex®, Minnesota, USA) were used to intubate the animals. Anesthesia was maintained with inhaled Isoflurane 2%. Analgesia was maintained with Fentanyl, at an initial dose of 2.5 µg/kg.¹⁸

With the animal anesthetized and in the dorsal decubitus position, the site was cleaned and surgical fields were positioned. All animals were subjected to invasive hemodynamic monitoring of arterial blood pressure (BP).

A midline xipho-pubic laparotomy was performed, with access to the retroperitoneal space, and the intestines were displaced. After dissection to reveal the renal vessels bilaterally, the diameter of the renal artery was measured and noted (mean diameter: 3-4 mm) and Doppler flow pattern was observed, at t=0, to rule out any preexisting abnormalities. After confirming that both kidneys were morphologically adequate for analysis, with maximum volume of 12 cm,³ the baseline biopsies were taken from both kidneys.

Next, the left renal hilum was clamped using a bulldog vascular clamp and the right kidney was left without ischemia. Serial biopsies were taken from the renal parenchyma, of both kidneys, at 30, 60, and 90 minutes.

Biopsy specimens were standardized at 1x1 cm² from the cortical region. The serial biopsies did not negatively impact the kidneys, because they were taken from different sites in the cortex. After 90 minutes, the surgical clamps were removed and at the end of the surgical procedure the animals were euthanized under general anesthesia with an intravenous (IV) overdose of Thiopental and potassium chloride 19.1% (dose 15-30 mg/kg)

Immunohistochemical analysis

For immunohistochemical analysis, the renal biopsy specimens collected at 0, 30, 60, and 90 minutes were fixed in formol 10% for 24 hours, dehydrated in a series of alcohol solutions of increasing concentrations, diaphanized in xylol, and set in paraffin. Four 5 µm thick slices mounted on silanized slides were used for each biopsy specimen/animal.

Once deparaffinized, the slides were hydrated and placed in a 10 mM (pH 6.0) solution of citric acid, which was heated for 12 minutes in a microwave oven for antigen recovery. Once cooled, the slides were incubated in a solution of 3% H₂O₂ to block endogenous peroxidase. Later, the slides were washed three times in phosphate buffered saline solution (PBS) with 0.5% Tween 20 soap for 5 minutes and incubated with a protein blocker (LowProteinBlocking, eBioscience, ThermoFisherScientific Inc., Massachusetts, United States). After being washed again in Tween 20, the slides were incubated overnight with rabbit polyclonal anti-Caspase 3 primary antibody (ThermoFisherScientific Inc., Massachusetts, United States).

On the following day, the slides were washed in Tween 20 and incubated with goat anti-IgG (H+L) secondary antibody (ThermoFisherScientific Inc., Massachusetts, United States). Slides were revealed with Diaminobenzidine-DAB (eBioscience ThermoFisherScientific Inc., Massachusetts, United States) and counterstained with hematoxylin for 1 minute.

Finally, the slides were dehydrated, immersed in xylol and protected with coverslips for analysis under an AxioVert A1 microscope (Zeiss, Germany) and microphotographed with an Axio CAM 503 Color digital camera (Zeiss, Germany). One slide was processed per animal, per time point (0, 30, 60, and 90 minutes), per kidney (ischemic and non-ischemic).

A morphometric analysis was conducted to calculate the volume of cells positive (%) for Caspase 3 using

OLYMPUS cellSens Dimension software (Olympus Corporation, Tokyo, Japan). We took photos of eight slides per animal. Each slide had four slices from the same biopsy paraffin block, of which the first slice was the negative control for the reaction. Photos were taken of ten fields at random, with the mean result taken as the volume of Caspase 3 positive area per animal, expressed as a percentage.

Statistical analysis

This experimental research study generated data in a controlled, prospective, and randomized manner. Data were subjected to statistical analysis using R (The R Foundation, Vienna, Austria).¹⁹ The measures analyzed are all quantitative and were expressed as means and standard deviations. The significance level was set at 5%.

Considering the low variability between animals and respecting the 3Rs bioethics principle for experimental studies with animals (replacement, reduction, and refinement) in defining the sample size, we conducted the study with 16 pigs, and, on the basis of the preliminary data, the variables were evaluated in terms of their distributions using quantile graphs, histograms, and box plots, in addition to the Shapiro-Wilk test. It was observed that the majority of data were concentrated close to the mean and the data varied little with relation to the mean. The assumption of normal distribution was not ruled out. This suggests that the sample represented the study population well and statistical tests could be applied with confidence, so it was unnecessary to subject additional animals to experimentation.

Comparison between the marked areas in groups differentiated by the type of clamping (A, unilateral renal artery, or AV, unilateral renal artery and vein) and kidney laterality (right, non-ischemic, or left, ischemic) were made using mixed linear regression models in order to account for the dependent nature of different measures from the same animal.¹⁹⁻²¹

RESULTS

The estimated mean area marked for Caspase 3 in the ischemic kidney and the contralateral kidney in group A (unilateral clamping of the renal artery) was not statistically different to the mean in group AV (unilateral clamping of the renal artery and vein) at any of the time points (Tables 1 and 2). In the group in which unilateral clamping of the renal artery and vein was performed (group AV), the mean estimated area marked for Caspase 3 in the non-ischemic kidney was not statistically greater than the mean area for the ischemic kidney at any of the time points, except for baseline (t=0) (Table 3 and Figure 1).

Table 1. Area marked for Caspase 3 in the ischemic kidney in groups A and AV and result of the mixed linear regression model for area marked as outcome.

Duration of ischemia	A (%)	AV (%)	DM (95%CI)	p value
0 minutes	0.02 (0.02)	0.02 (0.04)	0.00 (-0.02; 0.02)	0.953
30 minutes	0.24 (0.20)	0.20 (0.16)	-0.04 (-0.23; 0.15)	0.637
60 minutes	0.11 (0.13)	0.13 (0.12)	0.02 (-0.15; 0.18)	0.838
90 minutes	0.55 (0.36)	0.70 (0.34)	0.15 (-0.20; 0.51)	0.354

DM = difference in ischemic kidney means between groups A and AV; CI = confidence interval; p value according to the mixed linear regression model; Standard deviation in parentheses.

Table 2. Mean volume of area marked for Caspase 3 in the contralateral (non-ischemic) kidney in groups A and AV and result of the mixed linear regression model for area marked as outcome.

Duration of ischemia	A (%)	AV (%)	DM (95%CI)	p value
0 minutes	0.00 (0.00)	0.03 (0.05)	0.03 (-0.01; 0.06)	0.146
30 minutes	1.01 (0.35)	1.11 (0.50)	0.11 (-0.25; 0.46)	0.528
60 minutes	1.24 (0.79)	1.24 (0.71)	-0.01 (-0.68; 0.65)	0.965
90 minutes	0.84 (0.57)	1.11 (0.49)	0.29 (-0.21; 0.79)	0.229

DM = difference in contralateral kidney means (non-ischemic) between groups A and AV; CI = confidence interval; p value according to the mixed linear regression model; Standard deviation in parentheses.

Table 3. Mean volume of area marked for Caspase 3 in group AV in the ischemic kidney and the non-ischemic kidney and result of the mixed linear regression model for area marked as outcome.

Duration of ischemia	Non-ischemic kidney (%)	Ischemic kidney (%)	DM (95%CI)	p value
0 minutes	0.03 (0.05)	0.02 (0.04)	-0.01 (-0.02; 0.00)	0.135
30 minutes	1.11 (0.50)	0.20 (0.16)	-1.03 (-1.14; -0.91)	< 0.001
60 minutes	1.24 (0.71)	0.13 (0.12)	-1.15 (-1.33; -0.98)	< 0.001
90 minutes	1.11 (0.49)	0.70 (0.34)	-0.41 (-0.56; -0.26)	< 0.001

DM = difference between means for ischemic kidney and non-ischemic kidney in group AV; CI = confidence interval; p value according to the mixed linear regression model; Standard deviation in parentheses.

In the group in which unilateral clamping of the renal artery was performed (group A), the mean estimated area marked for Caspase 3 in the non-ischemic kidney was greater than the mean area for the ischemic kidney at all time points and this difference was statistically significant (Table 4).

DISCUSSION

Among the animals subjected to clamping of the renal artery alone, there was a statistically significant difference at baseline between the ischemic kidney and the non-ischemic kidney. Despite this, as the ischemia time elapsed (30, 60, and 90 minutes), the non-ischemic kidney exhibited significant progression of the injury, which indicates that the consequences of renal ischemia are reflected in the non-ischemic kidney.

Among the animals subjected to simultaneous clamping of the renal artery and vein, there was no statistically significant difference at baseline in area marked for Caspase 3 between the ischemic kidney and the non-ischemic kidney. As the time elapsed,

the area marked for Caspase 3 increased in the non-ischemic kidney, which could indicate that the cellular apoptosis in the ischemic kidney was also reflected in the contralateral kidney.

Ischemic kidney injury generally results in damage to cells of the nephron and cells of the renal vasculature. These cells are lost through a process of necrosis and apoptosis, which can lead to kidney failure.²² Ischemia caused by obstruction of the arteries of the kidney impairs the supply of nutrients and oxygen, changing cellular respiration and, consequently, renal metabolism through a cascade of biochemical reactions triggered by lack of energy (ATP).²³ Additional damage is also observed, such as changes to the cellular cytoskeleton and polarity of surface membranes, activation of phospholipases and proteases and, finally, incapacity of cellular functions dependent on the ATPase enzyme (sodium-potassium pump).²⁴

After the surgical clamping maneuver, blood flow is reestablished and, in this scenario, renal reperfusion intensifies the injuries caused by ischemia through production of reactive oxygen species, in addition to occurrence of cellular disarrangement, hypercoagulability,

Table 4. Mean volume of area marked for Caspase 3 in group A in the ischemic kidney and the non-ischemic kidney and result of the mixed linear regression model for area marked as outcome.

Duration of ischemia	Non-ischemic kidney (%)	Ischemic kidney (%)	DM (95%CI)	p value
0 minutes	0.00 (0.00)	0.02 (0.02)	0.02 (0.01; 0.02)	< 0.001
30 minutes	1.01 (0.35)	0.24 (0.20)	-0.79 (-0.90; -0.69)	< 0.001
60 minutes	1.24 (0.79)	0.11 (0.13)	-1.29 (-1.48; -1.11)	< 0.001
90 minutes	0.84 (0.57)	0.55 (0.36)	-0.27 (-0.42; -0.13)	< 0.001

DM = difference between means for ischemic kidney and non ischemic kidney in group A; CI = confidence interval; p value according to the mixed linear regression model; Standard deviation in parentheses.

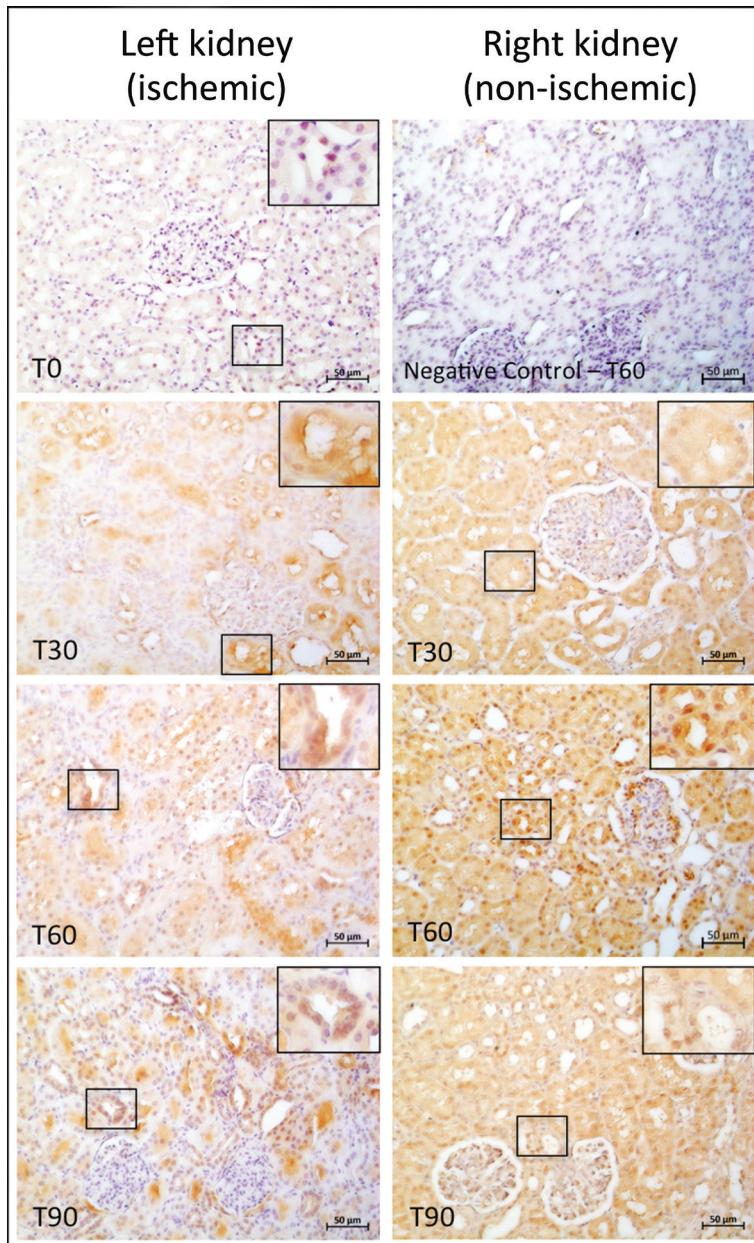


Figure 1. Immunostaining for Caspase 3 in convoluted renal tubules, indicated by the chestnut-brown color. Staining is cytoplasmic and nuclear, and the images compare the ischemic kidney (left kidney) to the non-ischemic kidney (right kidney) at 0, 30, 60, and 90 minutes of ischemia. (T0) Left kidney without clamp (positive control); (Negative control – T60) Negative reaction control; (T30) 30 minutes of unilateral renal ischemia; (T60) 60 minutes of unilateral renal ischemia; (T90) 90 minutes of unilateral renal ischemia; Bar: 50 µm.

and congestion of microcirculation. This provokes reduction of renal blood flow, which characterizes the clinical status of renal failure.²⁵ From this perspective, considering that in the present study the non-ischemic kidney underwent greater apoptosis than the ischemic kidney, one explanation could be that the ischemia is momentarily protecting the kidney that has had the renal hilum is clamped.

The phenomenon of organ crosstalk can be defined as mutual biological communication between distant organs mediated by signaling factors. This phenomenon helps to coordinate and maintain homeostasis, but a sudden dysfunction in any organ causes dysregulation in another organ.²⁶

This interference appears to be linked to the inflammatory cascade generated by the ischemia mechanism. However, as far as we know, there are no experimental studies that prove that immunomarkers from the ischemic kidney interfere in the function of the contralateral kidney, that has not suffered ischemia.

A study that conducted histological analysis of pig kidneys to investigate the phenomenon of kidney-kidney crosstalk demonstrated a significant increase ($p < 0.05$) in the number of lesions to the control kidney after 10-20 minutes of ischemia induced by clamping the renal artery only, but only after 50-60 minutes of ischemia induced by clamping both renal artery and vein.¹⁰

However, with regard to apoptosis, the present study did not identify a statistically significant difference in the area marked for Caspase 3 between the group in which only the renal artery was clamped and the group in which both the artery and the vein were clamped.

With regard to limitations, this was an experimental study design using pigs because they are excellent biomedical models, given the anatomic, physiological, and immunological similarities to human beings. However, their kidneys have greater tolerance to ischemia duration than the human kidney.²⁷

Unilateral renal ischemia was induced for 90 minutes in an attempt to identify any possible difference between the two types of clamping (renal artery only vs. renal artery and vein). After 120 minutes of surgery, on average, the majority of the animals were hypotensive and unresponsive as a result of dehydration, hypothermia and, possibly, intolerance of the anesthetic.

The difficulty in keeping the animals alive meant that our sample size was insufficient to assess the safety of the effect of renal reperfusion on the contralateral kidney, which should be considered in future investigations.

CONCLUSIONS

In the experimental model of unilateral renal ischemia, the non-ischemic kidney suffered acute cellular damage, demonstrated by Caspase 3 expression, caused by the contralateral ischemia. The type of clamping of the hilum (unilateral renal artery vs. unilateral renal artery and vein) did not appear to have an effect on the volume of area marked for Caspase 3.

REFERENCES

- Abuelo JG. Normotensive ischemic acute renal failure. *N Engl J Med*. 2007;357(8):797-805. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra064398>. PMID:17715412.
- Badr KF, Ichikawa I. Prerenal failure: a deleterious shift from renal compensation to decompensation. *N Engl J Med*. 1988;319(10):623-9. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198809083191007>. PMID:3045546.
- Simmons MN, Schreiber MJ, Gill IS. Surgical renal ischemia: a contemporary overview. *J Urol*. 2008;180(1):19-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2008.03.022>. PMID:18485395.
- Himmelfarb J, Joannidis M, Molitoris B, et al. Evaluation and initial management of acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(4):962-7. <http://dx.doi.org/10.2215/CJN.04971107>. PMID:18354074.
- Orvieto MA, Zorn KC, Mendiola F, et al. Recovery of renal function after complete renal hilar versus artery alone clamping during open and laparoscopic surgery. *J Urol*. 2007;177(6):2371-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2007.01.115>. PMID:17509361.
- Kerbl K, Chandhoke PS, Clayman RV, McDougall E, Stone AM, Figenshau RS. Ligation of the renal pedicle during laparoscopic nephrectomy: a comparison of staples, clips, and sutures. *J Laparoendosc Surg*. 1993;3(1):9-12. <http://dx.doi.org/10.1089/lps.1993.3.9>. PMID:8453134.
- Gardner DS, De Brot S, Dunford LJ, et al. Remote effects of acute kidney injury in a porcine model. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;310(4):F259-71. <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00389.2015>. PMID:26608790.
- Crane NJ, Huffman SW, Alemozaffar M, Gage FA, Levin IW, Elster EA. Evidence of a heterogeneous tissue oxygenation: renal ischemia/reperfusion injury in a large animal model. *J Biomed Opt*. 2013;18(3):035001. <http://dx.doi.org/10.1117/1.JBO.18.3.035001>. PMID:23456040.
- Oishi Y, Manabe I. Organ system crosstalk in cardiometabolic disease in the age of multimorbidity. *Front Cardiovasc Med*. 2020;7:64. <http://dx.doi.org/10.3389/fcvm.2020.00064>.
- Baptista Sincos AP, Mazzeo A, Sincos IR, et al. Duplex scan and histologic assessment of acute renal injury in a kidney-kidney crosstalk swine experimental model. *J Vasc Surg*. 2018;68(2):588-95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2017.06.118>. PMID:28958477.
- Mazzeo A, Sincos APB, Leite KRM, Goes MA Jr, Pavão OFS, Kaufmann OG. Study of kidney morphologic and structural changes related to different ischemia times and types of clamping of the renal vascular pedicle. *Int Braz J Urol*. 2019;45(4):754-62. <http://dx.doi.org/10.1590/s1677-5538.18.0559>. PMID:31184454.
- Yanagihara T, Yoshimine T, Morimoto K, Yamamoto K, Homburger HA. Immunohistochemical Investigation of Cerebral Ischemia in Gerbils. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1985;44(2):204-15. <http://dx.doi.org/10.1097/00005072-198503000-00009>. PMID:2579210.
- Mondello C, Cardia L, Ventura-Spagnolo E. Immunohistochemical detection of early myocardial infarction: a systematic review.

- Int J Legal Med. 2017;131(2):411-21. <http://dx.doi.org/10.1007/s00414-016-1494-1>. PMID:27885432.
14. Aljakna A, Fracasso T, Sabatasso S. Molecular tissue changes in early myocardial ischemia: from pathophysiology to the identification of new diagnostic markers. *Int J Legal Med.* 2018;132(2):425-38. <http://dx.doi.org/10.1007/s00414-017-1750-z>. PMID:29362873.
 15. Mondello C, Cardia L, Bartoloni G, Asmundo A, Ventura Spagnolo E. Immunohistochemical study on dystrophin expression in CAD-related sudden cardiac death: a marker of early myocardial ischaemia. *Int J Legal Med.* 2018;132(5):1333-9. <http://dx.doi.org/10.1007/s00414-018-1843-3>. PMID:29732464.
 16. Faubel S, Edelstein CL. Caspases as drug targets in ischemic organ injury. *Curr Drug Target Immune Endocr Metabol Disord.* 2005;5(3):269-87. <http://dx.doi.org/10.2174/1568008054863754>. PMID:16178788.
 17. Belczak SQ. Tratamento endovascular de trauma arterial periférico com o uso de stents revestidos: estudo experimental em porcos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.
 18. Lederman A. Indução de aneurisma em aorta abdominal de porcos: um modelo endovascular [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.
 19. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing [software]. New Zealand: R Foundation for Statistical Computing; 2017. [cited 2021 jan 18]. <https://www.R-project.org/>.
 20. Morettin PA, Bussab WO. Medidas-Resumo. In: Morettin PA, Bussab WO, editors. Estatística básica. São Paulo: Saraiva; 2010. p. 35-56.
 21. Faraway JJ. Multinomial Data. In: Faraway JJ, editor. Extending the linear model with R: generalized linear, mixed effects and nonparametric regression models. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC; 2016. p. 129-50. <http://dx.doi.org/10.1201/9781315382722-9>.
 22. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(8):2199-210. <http://dx.doi.org/10.1097/O1.ASN.0000079785.13922.F6>. PMID:12874476.
 23. Secin FP. Importance and limits of ischemia in renal partial surgery: experimental and clinical research. *Adv Urol.* 2008;2008:102461. <http://dx.doi.org/10.1155/2008/102461>. PMID:18645616.
 24. Goes N, Urmsom J, Ramassar V, Halloran PF. Ischemic acute tubular necrosis induces an extensive local cytokine response. Evidence for induction of interferon-gamma, transforming growth factor-beta 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-2, and interleukin-10. *Transplantation.* 1995;59(4):565-72. <http://dx.doi.org/10.1097/00007890-199502270-00022>. PMID:7878762.
 25. Jablonski P, Howden B, Rae D, et al. The influence of the contralateral kidney upon recovery from unilateral warm renal ischemia. *Pathology.* 1985;17(4):623-7. <http://dx.doi.org/10.3109/00313028509084764>. PMID:4094791.
 26. Armutcu F. Organ crosstalk: the potent roles of inflammation and fibrotic changes in the course of organ interactions. *Inflamm Res.* 2019;68(10):825-39. <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-019-01271-7>. PMID:31327029.
 27. Giraud S, Favreau F, Chatauret N, Thuillier R, Maiga S, Hauet T. Contribution of large pig for renal ischemia-reperfusion and transplantation studies: the preclinical model. *J Biomed Biotechnol.* 2011;532127. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/532127>.

Correspondence

Carolina Rodrigues Dal Bo
Hospital Israelita Albert Einstein - HIAE
Avenida Albert Einstein, 627 - Morumbi
05652-900 - São Paulo (SP), Brasil
Tel: +55 (11) 2151-0011
E-mail: carolinardalbo@gmail.com

Author information

CRDB and VPP - 6th year medical students, Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein (FICSAE), undergraduate researchers, Endovascular Surgery Research Group, Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE).
APWBS - Vascular surgeon, Board certified, Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular (SBACV); PhD in Health Sciences, postdoctoral fellow in endovascular surgery, Instituto de Ensino e Pesquisa (IIEP), Hospital Albert Einstein (HIAE).
NW - Vascular surgeon, vice-president of Research and Innovation, Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE); PhD in Health Sciences, Universidade de São Paulo (USP); Professor, Postgraduate Program in Health Sciences, Faculdade Israelita Albert Einstein (FICSAE), Tenured and Associate Professor, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP); Researcher level 1 at Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
TPAA - Biologist, Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO); Board certified in Comparative anatomy and in Developmental Biology and Stem Cells; MSc and PhD in Anatomy of Domestic and Wild Animals, Universidade de São Paulo (USP); Postdoctoral fellow in Neuroimmunomodulation, Universidade de São Paulo (USP), Experimental Hepatology, Instituto de Ensino e Pesquisa (IIEP), Hospital Albert Einstein.
AM - Pharmacist, MSc, Instituto de Ensino e Pesquisa (IIEP), Hospital Albert Einstein (HIAE); MBA Board certified, Gestão de Projetos, Universidade São Judas Tadeu (USTJ).
OGK - Urologist, PhD in Urology, Universidade de São Paulo (USP); Postdoctoral fellow in Robotic Surgery, Laparoscopy and Endourology, University of California, Irvine; MBA, Health Management Einstein/Insper; Collaborating professor, Pós-Graduação, Instituto de Ensino e Pesquisa (IIEP), Hospital Albert Einstein (HIAE).

Author contributions

Conception and design: CRDB, VPP, APWBS, TPAA, NW, OGK
Analysis and interpretation: CRDB, VPP, APWBS, TPAA
Data collection: CRDB, VPP, APWBS, AM
Writing the article: CRDB, VPP, APWBS, TPAA
Critical revision of the article: CRDB, VPP, APWBS, TPAA, NW, OGK
Final approval of the article*: CRDB, VPP, APWBS, AM, TPAA, NW, OGK
Statistical analysis: CRDB, VPP, OGK
Overall responsibility: APWBS, NW, OGK

*All authors have read and approved of the final version of the article submitted to J Vasc Bras.

Efeito da isquemia renal unilateral no rim contralateral avaliada pela expressão de Caspase 3

Effect of unilateral renal ischemia on the contralateral kidney assessed by Caspase 3 expression

Carolina Rodrigues Dal Bo^{1,2} , Vitória Penido de Paula^{1,2} , Anna Paula Weinhardt Baptista Strazzi³ , Nelson Wolosker^{1,2,4} , Thiago Pinheiro Arrais Aloia^{3,4} , Angela Mazzeo³ , Oskar Grau Kaufmann^{3,4} 

Resumo

Contexto: Estudos demonstraram, por análise histológica e Dopplerfluxométrica, a interferência da isquemia renal unilateral, realizada em algumas cirurgias, sobre o rim contralateral, identificando o fenômeno de *kidney-kidney crosstalk*. **Objetivos:** Identificar o efeito da isquemia de duas estratégias de oclusão da vasculatura renal esquerda sobre o rim contralateral através do volume de células renais positivas para Caspase 3. **Métodos:** Suínos foram divididos em 2 grupos: A (n = 8), artéria renal esquerda clampeada, e AV (n = 8), artéria e veia renais esquerdas clampeadas. Foi realizado o estudo imuno-histoquímico (anti-Caspase 3), com o material de biópsias coletadas do rim isquêmico e contralateral em 0, 30, 60 e 90 minutos de isquemia, e análise morfométrica, sendo que a média representou o volume de área de Caspase 3 positiva (%). **Resultados:** A análise morfométrica do rim contralateral nos tempos 30, 60 e 90 minutos de isquemia mostrou que a média da área marcada por Caspase 3 foi estatisticamente superior à média do rim isquêmico nos dois grupos: artéria renal clampeada (A) e artéria e veia renais clampeadas (AV). Comparando o rim isquêmico e contralateral nos dois tipos de clameamento, não houve diferença estatisticamente significante da área marcada por Caspase 3. **Conclusões:** No modelo experimental de isquemia renal unilateral, o rim não isquêmico apresentou dano celular, demonstrado pela expressão da Caspase 3 de forma aguda em decorrência da isquemia contralateral. O tipo de clameamento do hilo não parece ter influência sobre o volume de área marcada por Caspase 3.

Palavras-chave: apoptose; rim; isquemia; imuno-histoquímica; Caspase 3.

Abstract

Background: Studies have demonstrated with histological analysis and Doppler flow measurement analysis that unilateral renal ischemia, which is performed in some surgeries, interfered with the contralateral kidney, identifying the phenomenon of *kidney-kidney crosstalk*. **Objectives:** To identify the effects on the ischemic and contralateral kidney of renal ischemia induced by two types of clamping technique by analyzing the volume of kidney cells positive for Caspase 3. **Methods:** Sixteen pigs were divided into 2 groups, as follows: A (n = 8) – clamping of left renal artery only and AV (n = 8) – clamping of left renal artery and vein. Immunohistochemical analyses (anti Caspase 3) were conducted with biopsy specimens collected from the ischemic and contralateral kidney at 0, 30, 60, and 90 minutes of ischemia and morphometric analysis was performed, taking the mean to represent the volume of the Caspase 3 positive area (%). **Results:** Morphometric analysis of specimens collected at 30, 60, and 90 minutes of ischemia showed that the mean area marked for Caspase 3 was statistically larger in the contralateral kidney than the ischemic kidney in both groups: clamped renal artery (A) and clamped renal artery and vein (AV). Comparing the ischemic and contralateral kidney, there was no statistically significant difference in the area marked for Caspase 3 between the two types of clamping. **Conclusions:** In the experimental model of unilateral renal ischemia, the non-ischemic kidney exhibited cell damage, demonstrated by Caspase 3 expression. The type of hilum clamping does not appear to influence the area marked for Caspase 3.

Keywords: apoptosis; kidney; ischemia; immunohistochemistry; Caspase 3.

Como citar: Bo CRD, Paula VP, Strazzi APWB, et al. Efeito da isquemia renal unilateral no rim contralateral avaliada pela expressão de Caspase 3. *J Vasc Bras.* 2021;20:e20210040. <https://doi.org/10.1590/1677-5449.210040>

¹ Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein – FICSAE, São Paulo, SP, Brasil.

² Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo, SP, Brasil.

³ Instituto de Ensino e Pesquisa – IIEP, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo, SP, Brasil.

⁴ Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, SP, Brasil.

Fonte de financiamento: Uma bolsa de iniciação científica foi concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP).

Conflitos de interesse: Os autores declararam não haver conflitos de interesse que precisam ser informados.

Submetido em: Março 25, 2021. Aceito em: Maio 14, 2021.

O estudo foi realizado no Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), São Paulo, SP, Brasil.



■ INTRODUÇÃO

A interrupção temporária do fluxo sanguíneo renal por meio do clampeamento da artéria renal ou do clampeamento simultâneo da artéria e da veia renais é um procedimento adotado rotineiramente na nefrectomia parcial a fim de reduzir sangramento intraoperatório¹⁻⁴. Os pacientes submetidos a esse procedimento podem desenvolver insuficiência renal aguda transitória e até definitiva, e o tempo de clampeamento é um fator determinante.

A relação entre o risco de lesão renal e o tipo de clampeamento realizado é controverso na literatura – alguns estudos indicam que a interrupção simultânea do fluxo arterial e venoso gera menos lesão renal após a cirurgia. Outros estudos sugerem que o clampeamento apenas da artéria renal seja uma melhor abordagem, justificando que a presença do fluxo venoso provoca menos danos ao rim^{5,6}.

Diversos estudos experimentais⁷⁻⁹ demonstraram a interferência da isquemia renal na diminuição da função de órgãos à distância, como fígado, coração, cérebro e pulmão, em um mecanismo reconhecido como *organ crosstalk*. Dois estudos, recentemente, observaram a interferência da isquemia renal unilateral sobre o rim contralateral, identificando o fenômeno de *kidney-kidney crosstalk*, demonstrado por análise histológica e por aumento dos índices de resistência e pulsatilidade na análise Dopplerfluxométrica^{10,11}.

A imuno-histoquímica foi demonstrada em estudos como uma técnica com alta sensibilidade para detectar precocemente lesões isquêmicas. Alguns autores sugerem o seu uso para complementar as lacunas da análise histológica na isquemia tecidual¹²⁻¹⁵. Entre os marcadores imuno-histoquímicos, a Caspase 3 é um marcador de apoptose conhecido e descrito em danos isquêmicos em vários órgãos, incluindo cérebro, coração e fígado¹⁶.

Após revisão da literatura, não identificamos estudos que avaliaram o efeito da isquemia renal unilateral sobre o rim contralateral através da análise imuno-histoquímica por Caspase 3.

■ OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi identificar o efeito da isquemia renal por clampeamento simples da artéria renal esquerda e do clampeamento simultâneo da artéria e da veia renal esquerdas sobre o rim isquêmico e sobre o contralateral, analisando o volume de células renais positivas para Caspase 3 ao longo do tempo de isquemia.

■ MÉTODOS

O estudo operatório foi conduzido entre janeiro e dezembro de 2016 no Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia do Hospital Israelita

Albert Einstein (CETEC), acreditado pela Associação Americana para Acreditação de Cuidados com Animais de Laboratório (AAALAC), estando de acordo com as normas expedidas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e tendo sido aprovado pelo Comitê de Uso e Cuidado de Animais do Hospital Israelita Albert Einstein (protocolo CEUA 3290). A análise imuno-histoquímica foi realizada no laboratório do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (IIEP) entre abril de 2018 e abril de 2019.

Dezesseis suínos da raça Large White, com idade entre 90 e 120 dias e pesando 30 kg cada, foram divididos em dois grupos de acordo com o tipo de clampeamento renal, contendo oito animais cada: o grupo AV, com clampeamento de artéria e veia renais esquerdas, e o grupo A, com clampeamento da artéria renal esquerda. Os animais foram submetidos a biópsias no rim isquêmico e no rim contralateral (rim direito - não isquêmico) concomitantemente nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos de isquemia. As biópsias foram processadas em blocos de parafina e fragmentadas em cortes de 5 µm de espessura que, após serem fixados em lâminas, foram usados para análise imuno-histoquímica.

Procedimento anestésico e técnica intraoperatória

Todos os animais foram previamente anestesiados com injeção intramuscular de Cetamina (10,0 mg/kg) e Midazolam (0,25 mg/kg), misturados na mesma seringa. Passados 15 minutos da injeção, a veia marginal da orelha foi cateterizada com cateter de calibre 20 ou 22 (BD Insystem, BectonTherapy Systems Inc., Utah, EUA)¹⁷, para servir de acesso venoso para a indução anestésica, que foi realizada com Tiopental 7 mg/kg. Para intubação dos animais, foram utilizados tubos endotraqueais tamanho 6,5 a 8,5 (Portex®, Minnesota, EUA). A anestesia foi mantida inalatória com Isoflurano 2%. A analgesia foi mantida com Fentanil, com dose inicial de 2,5 µg/kg¹⁸.

Com o animal anestesiado na posição de decúbito dorsal horizontal, realizou-se a higienização local e colocação dos campos cirúrgicos. Todos os animais foram submetidos à monitorização hemodinâmica com pressão arterial (PA) invasiva.

Efetuiu-se laparotomia xifopúbica mediana e acesso ao retroperitônio com mobilização das alças. Após dissecação e reparo dos vasos renais, bilateralmente, registrou-se a aferição do diâmetro da artéria renal (valor médio de 3-4 mm) e o padrão do fluxo renal ao Doppler, no tempo zero, para descartar qualquer alteração prévia. Após a certificação de que ambos os rins eram morfologicamente adequados para análise, com volume máximo de 12 cm³, efetuou-se biópsia no tempo zero, em ambos os rins.

Em seguida, foi realizado clampeamento do hilo renal esquerdo com *clamp* vascular tipo *bulldog*, e o direito permaneceu não isquêmico. A partir daí, foram realizadas biópsias seriadas do parênquima renal nos tempos 30, 60 e 90 minutos, em ambos os rins.

As biópsias foram padronizadas em 1x1 cm² na região cortical. As biópsias seriadas não afetaram negativamente os rins, pois foram realizadas no córtex em diferentes locais. Após 90 minutos, as pinças cirúrgicas foram retiradas, e, ao final do procedimento cirúrgico, os animais foram eutanasiados sob anestesia geral com overdose de Tiopental e cloreto de potássio 19,1% intravenoso (IV) (dose 15-30 mg/kg)

Análise imuno-histoquímica

Para a realização da análise imuno-histoquímica, as biópsias renais coletadas nos diferentes tempos foram fixadas em formol 10% por 24 horas, desidratadas em soluções crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e incluídos em parafina. Foram utilizados quatro cortes de 5 µm de espessura realizados em lâminas silanizadas para cada fragmento da biópsia/animal.

Após desparafinizadas, as lâminas foram hidratadas e colocadas em solução de ácido cítrico 10 mM (pH 6,0), que foi aquecida por 12 minutos no micro-ondas para recuperação antigênica. Após resfriadas, as lâminas foram incubadas em solução de H₂O₂ 3% para bloqueio da peroxidase endógena. Posteriormente, as lâminas foram lavadas três vezes em solução salina tamponada (PBS) com sabão Tween 20 0,5% por 5 minutos e incubadas com um bloqueador de proteínas (LowProteinBlocking, eBioscience, ThermoFisherScientific Inc., Massachusetts, EUA). Após lavadas novamente em Tween 20, as lâminas foram incubadas *overnight* com anticorpo primário de coelho policlonal anti-Caspase 3 (ThermoFisherScientific Inc., Massachusetts, EUA).

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em Tween 20 e incubadas com anticorpo secundário de cabra anti-IGG (H+L) (ThermoFisherScientific Inc., Massachusetts, EUA). As lâminas foram reveladas por Diaminobenzidina-DAB (eBioscience ThermoFisherScientific Inc., Massachusetts, EUA) e contracoradas com hematoxilina por 1 minuto.

Finalmente, as lâminas foram desidratadas, imersas em xilol e protegidas por lamínulas para serem analisadas ao microscópio AxioVert A1 (Zeiss, Alemanha) e fotomicrografadas pela câmera digital Axio CAM 503 Color (Zeiss, Alemanha). Cada animal teve uma lâmina confeccionada por tempo (0, 30, 60 e 90 minutos) de cada rim (isquêmico e não isquêmico).

Foi realizada a análise morfométrica para calcular o volume de células positivas (%) para Caspase 3 utilizando o *software* OLYMPUS cellSens Dimension (OLYMPUS CORPORATION, Tóquio, Japão).

Realizamos fotos de oito lâminas por animal. Cada lâmina continha quatro cortes do mesmo bloco parafinado da biópsia, sendo o primeiro corte o controle negativo da reação. Foram realizadas fotos de dez campos aleatórios, sendo que a média representou o volume de área de Caspase 3 positiva expressa em porcentagem por animal.

Análise estatística

A realização desta pesquisa experimental gerou dados de forma controlada, prospectiva e randomizada. Os dados foram analisados estatisticamente usando o pacote estatístico R (The R Foundation, Viena, Áustria)¹⁹. As medidas avaliadas são todas quantitativas e foram descritas como médias e desvio padrão. O nível de significância adotado foi de 5%.

Considerando a variabilidade baixa entre animais e respeitando o princípio bioético dos 3Rs em estudo experimentais com animais (substituição, refinamento e redução), para definição do número amostral, realizamos um estudo com 16 suínos, e, a partir de dados preliminares, as variáveis foram avaliadas em relação à sua distribuição por meio dos gráficos de quantis, histograma e *boxplot*, além do teste de Shapiro-Wilk. Foi observado que a maior parte dos dados se concentrava próxima da média, e a variação dos dados em relação à média era pequena, não sendo rejeitada a suposição de normalidade. Isso sugere que a amostra representava bem a população estudada e era suficiente para aplicar testes estatísticos com segurança, não sendo necessário submeter mais animais ao estudo experimental.

A comparação entre as áreas marcadas nos grupos definidos a partir do tipo de clampeamento (A, artéria renal unilateral, e AV, artéria e veia renais unilaterais) e lado do rim (direito, não isquêmico, e esquerdo, isquêmico) foi feita por meio de modelos de regressão lineares mistos a fim de contemplar a dependência entre as diferentes medidas realizadas em um mesmo animal¹⁹⁻²¹.

RESULTADOS

No rim isquêmico e no rim contralateral, a média estimada da área marcada por Caspase 3 no grupo A (clampeamento unilateral da artéria renal) não foi estatisticamente diferente da média do grupo AV (clampeamento unilateral da artéria e veia renais) em todos os momentos (Tabelas 1 e 2). No grupo em que foi realizado clampeamento unilateral da artéria e veia renal (grupo AV), a média estimada da área marcada por Caspase 3 no rim não isquêmico foi estatisticamente superior à média do rim isquêmico em todos os instantes de tempo, exceto no momento inicial (tempo zero) (Tabela 3 e Figura 1).

Tabela 1. Área marcada por Caspase 3 no rim isquêmico pelos grupos A e AV e resultado do modelo de regressão linear misto para a área marcada como desfecho.

Tempo de isquemia	A (%)	AV (%)	DM (IC 95%)	Valor p
0 minuto	0,02 (0,02)	0,02 (0,04)	0,00 (-0,02; 0,02)	0,953
30 minutos	0,24 (0,20)	0,20 (0,16)	-0,04 (-0,23; 0,15)	0,637
60 minutos	0,11 (0,13)	0,13 (0,12)	0,02 (-0,15; 0,18)	0,838
90 minutos	0,55 (0,36)	0,70 (0,34)	0,15 (-0,20; 0,51)	0,354

DM = diferença de médias entre os grupos A e AV no rim isquêmico; IC = intervalo de confiança; Valor-p referente ao modelo de regressão linear misto; Desvio padrão em parênteses.

Tabela 2. Média do volume de área marcada por Caspase 3 no rim contralateral (não isquêmico) pelos grupos A e AV e resultado do modelo de regressão linear misto para área marcada como desfecho.

Tempo de isquemia	A (%)	AV (%)	DM (IC 95%)	Valor p
0 minuto	0,00 (0,00)	0,03 (0,05)	0,03 (-0,01; 0,06)	0,146
30 minutos	1,01 (0,35)	1,11 (0,50)	0,11 (-0,25; 0,46)	0,528
60 minutos	1,24 (0,79)	1,24 (0,71)	-0,01 (-0,68; 0,65)	0,965
90 minutos	0,84 (0,57)	1,11 (0,49)	0,29 (-0,21; 0,79)	0,229

DM = diferença de médias entre os grupos A e AV no rim não isquêmico; IC = intervalo de confiança; Valor-p referente ao modelo de regressão linear misto; Desvio padrão em parênteses.

Tabela 3. Média do volume de área marcada por Caspase 3 no grupo AV no rim isquêmico e no não isquêmico e resultado do modelo de regressão linear misto para área marcada como desfecho.

Tempo de isquemia	Rim não isquêmico (%)	Rim isquêmico (%)	DM (IC 95%)	Valor p
0 minuto	0,03 (0,05)	0,02 (0,04)	-0,01 (-0,02; 0,00)	0,135
30 minutos	1,11 (0,50)	0,20 (0,16)	-1,03 (-1,14; -0,91)	< 0,001
60 minutos	1,24 (0,71)	0,13 (0,12)	-1,15 (-1,33; -0,98)	< 0,001
90 minutos	1,11 (0,49)	0,70 (0,34)	-0,41 (-0,56; -0,26)	< 0,001

DM = diferença de médias entre o rim isquêmico e não isquêmico no grupo AV; IC = intervalo de confiança; Valor-p referente ao modelo de regressão linear misto; Desvio padrão em parênteses.

No grupo em que foi realizado clampeamento unilateral da artéria renal (grupo A), a média estimada da área marcada por Caspase 3 do rim não isquêmico foi maior que a média do rim isquêmico em todos os instantes de tempo, sendo essa diferença estatisticamente significativa (Tabela 4).

■ DISCUSSÃO

Nos animais submetidos ao clampeamento apenas da artéria renal, houve diferença estatisticamente significativa no tempo zero entre o rim isquêmico e o não isquêmico. Apesar disso, ao longo do tempo (30, 60 e 90 minutos), o rim não isquêmico apresentou uma progressão de lesão significativa, o que indica que as consequências da isquemia renal são refletidas no rim não isquêmico.

Nos animais submetidos ao clampeamento simultâneo da artéria e da veia renal, no tempo inicial não havia diferença estatisticamente significativa na área marcada por Caspase 3 entre o rim isquêmico e o rim não isquêmico. Com o passar do tempo, observou-se aumento da área marcada por Caspase 3 no rim não isquêmico, o que pode indicar que a

apoptose celular sofrida pelo rim isquêmico também seja refletida no rim contralateral.

A lesão isquêmica do rim geralmente resulta em danos às células do néfron e às células da vasculatura renal. Essas células são perdidas através do processo de necrose e apoptose, podendo levar à falência renal²². A isquemia causada por uma obstrução nas artérias do rim prejudica a chegada de nutrientes e de oxigênio, alterando a respiração celular e, conseqüentemente, o metabolismo renal através de uma cascata de reações bioquímicas decorrentes da falta de energia (ATP)²³. Outros danos também são verificados, tais como alteração no citoesqueleto celular, na polaridade da superfície das membranas, na ativação de fosfolipases e proteases e, por fim, na incapacidade das funções celulares dependentes da enzima ATPase (bomba de sódio-potássio)²⁴.

Após a finalização da manobra cirúrgica de clampeamento, o fluxo sanguíneo é restabelecido, e a reperfusão renal, nesse cenário, intensifica as lesões causadas pela isquemia através da produção de espécies reativas de oxigênio, além da ocorrência de desarranjo celular, hipercoagulabilidade e congestão da microcirculação. Isso favorece a redução do fluxo

Tabela 4. Média do volume de área marcada por Caspase 3 no grupo A no rim isquêmico e no não isquêmico e resultado do modelo de regressão linear misto para área marcada como desfecho.

Tempo de isquemia	Rim não isquêmico (%)	Rim isquêmico (%)	DM (IC 95%)	Valor p
0 minuto	0,00 (0,00)	0,02 (0,02)	0,02 (0,01; 0,02)	< 0,001
30 minutos	1,01 (0,35)	0,24 (0,20)	-0,79 (-0,90; -0,69)	< 0,001
60 minutos	1,24 (0,79)	0,11 (0,13)	-1,29 (-1,48; -1,11)	< 0,001
90 minutos	0,84 (0,57)	0,55 (0,36)	-0,27 (-0,42; -0,13)	< 0,001

DM = diferença de médias entre o rim isquêmico e não isquêmico no grupo A; IC = intervalo de confiança; Valor-p referente ao modelo de regressão linear misto; Desvio padrão em parênteses.

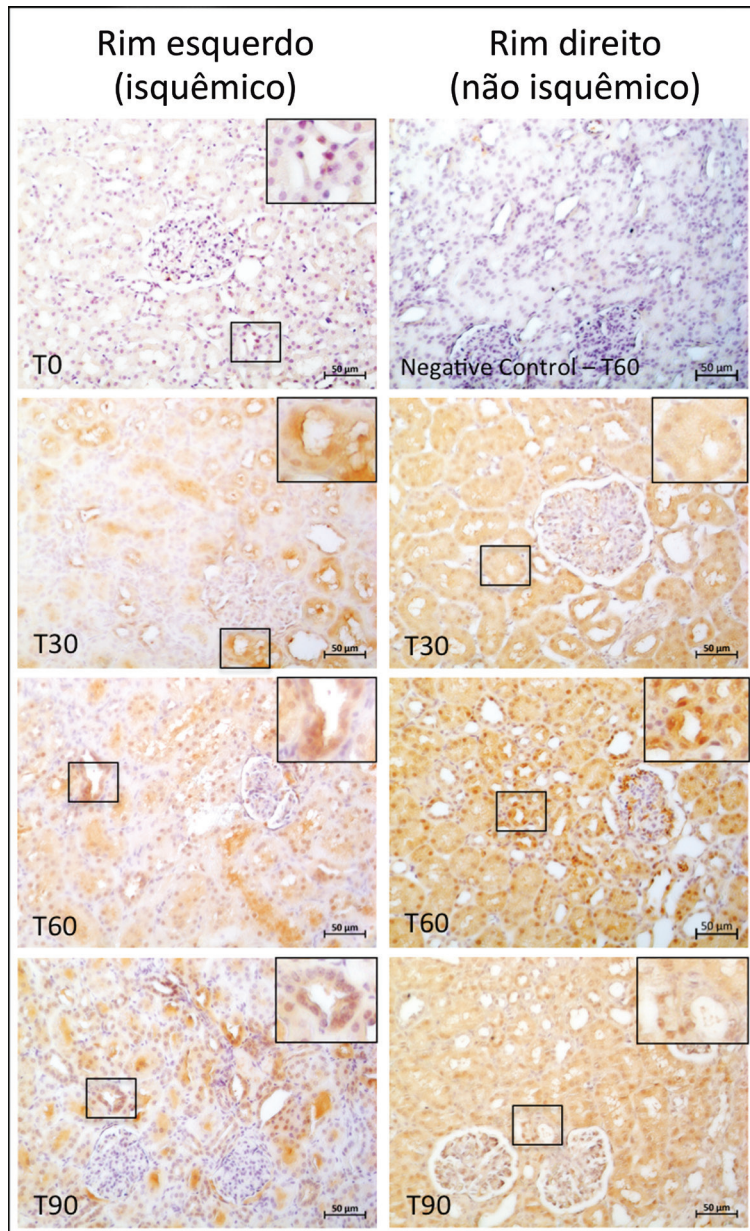


Figura 1. Imunomarcagem por Caspase 3 nos túbulos contorcidos renais representados pela cor marrom-acastanhado. A marcação é citoplasmática e nuclear, e as imagens comparam o rim isquêmico (rim esquerdo) com o rim não isquêmico (rim direito) nos tempos 0, 30, 60 e 90 de isquemia. (T0) Rim esquerdo sem *clamp* (controle positivo); (Negative control – T60) Controle negativo da reação; (T30) 30 minutos de isquemia renal unilateral; (T60) 60 minutos de isquemia renal unilateral; (T90) 90 minutos de isquemia renal unilateral; Barra: 50 µm.

sanguíneo renal, o que caracteriza o quadro clínico da insuficiência renal²⁵. Nesse sentido, levando em consideração que, neste estudo, o rim não isquêmico sofreu maior apoptose que o rim isquêmico, uma explicação seria que a isquemia pode estar momentaneamente protegendo o rim em que o hilo renal está clampeado.

O fenômeno *organ crosstalk* pode ser definido como a comunicação biológica mútua entre órgãos distantes mediada por fatores de sinalização. Esse fenômeno ajuda a coordenar e manter a homeostase, mas uma súbita disfunção em qualquer órgão causa desregulação em outro órgão²⁶.

Essa interferência parece estar envolvida com a cascata inflamatória gerada pelo mecanismo de isquemia. Entretanto, até onde sabemos, não há estudos experimentais que comprovem a interferência com imunomarcadores do rim isquêmico na função do rim contralateral, não isquêmico.

Um estudo que realizou análise histológica de rins de suínos para estudar o fenômeno *kidney-kidney crosstalk* demonstrou aumento significativo ($p < 0,05$) do número de lesões no rim controle a partir de 10-20 minutos de isquemia clampeando apenas a artéria renal e somente com 50-60 minutos de isquemia clampeando artéria e veia renais¹⁰.

No entanto, em relação à apoptose, o presente estudo não identificou diferença estatisticamente significativa na área marcada por Caspase 3 entre o grupo em que foi clampeada a artéria renal exclusivamente e o grupo em que foi clampeada tanto a artéria quanto a veia renais.

Em relação às limitações, este estudo foi experimental, delineado com suínos, pois eles são excelentes modelos biomédicos dadas as semelhanças anatômicas, fisiológicas e imunológicas ao ser humano. Entretanto, os rins desses animais possuem uma maior tolerância ao tempo de isquemia do que o rim humano²⁷.

A isquemia renal unilateral foi realizada até 90 minutos em uma tentativa de identificar qualquer diferença possível entre os dois tipos de clampeamento (apenas artéria renal vs. artéria e veia renais). Após 120 minutos de cirurgia, em média, a maioria dos animais encontrava-se em estado hipotensivo e sem resposta em decorrência de desidratação, hipotermia e, possivelmente, intolerância anestésica.

Devido à dificuldade em manter os animais vivos, tivemos uma amostra insuficiente para avaliação da segurança do efeito da reperfusão renal no rim contralateral, a qual deve ser considerada em investigações futuras.

CONCLUSÃO

No modelo experimental de isquemia renal unilateral, o rim não isquêmico apresentou dano celular, demonstrado pela expressão da Caspase

3, de forma aguda em decorrência da isquemia contralateral. O tipo de clampeamento do hilo (artéria renal unilateral vs. artéria e veia renais unilaterais) não parece ter influência sobre o volume de área marcada por Caspase 3.

REFERÊNCIAS

1. Abuelo JG. Normotensive ischemic acute renal failure. *N Engl J Med*. 2007;357(8):797-805. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra064398>. PMID:17715412.
2. Badr KF, Ichikawa I. Prerenal failure: a deleterious shift from renal compensation to decompensation. *N Engl J Med*. 1988;319(10):623-9. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198809083191007>. PMID:3045546.
3. Simmons MN, Schreiber MJ, Gill IS. Surgical renal ischemia: a contemporary overview. *J Urol*. 2008;180(1):19-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2008.03.022>. PMID:18485395.
4. Himmelfarb J, Joannidis M, Molitoris B, et al. Evaluation and initial management of acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(4):962-7. <http://dx.doi.org/10.2215/CJN.04971107>. PMID:18354074.
5. Orvieto MA, Zorn KC, Mendiola F, et al. Recovery of renal function after complete renal hilar versus artery alone clamping during open and laparoscopic surgery. *J Urol*. 2007;177(6):2371-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2007.01.115>. PMID:17509361.
6. Kerbl K, Chandhoke PS, Clayman RV, McDougall E, Stone AM, Figenshau RS. Ligation of the renal pedicle during laparoscopic nephrectomy: a comparison of staples, clips, and sutures. *J Laparoendosc Surg*. 1993;3(1):9-12. <http://dx.doi.org/10.1089/lps.1993.3.9>. PMID:8453134.
7. Gardner DS, De Brot S, Dunford LJ, et al. Remote effects of acute kidney injury in a porcine model. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;310(4):F259-71. <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00389.2015>. PMID:26608790.
8. Crane NJ, Huffman SW, Alemozaffar M, Gage FA, Levin IW, Elster EA. Evidence of a heterogeneous tissue oxygenation: renal ischemia/reperfusion injury in a large animal model. *J Biomed Opt*. 2013;18(3):035001. <http://dx.doi.org/10.1117/1.JBO.18.3.035001>. PMID:23456040.
9. Oishi Y, Manabe I. Organ system crosstalk in cardiometabolic disease in the age of multimorbidity. *Front Cardiovasc Med*. 2020;7:64. <http://dx.doi.org/10.3389/fcvm.2020.00064>.
10. Baptista Sincos AP, Mazzeo A, Sincos IR, et al. Duplex scan and histologic assessment of acute renal injury in a kidney-kidney crosstalk swine experimental model. *J Vasc Surg*. 2018;68(2):588-95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2017.06.118>. PMID:28958477.
11. Mazzeo A, Sincos APB, Leite KRM, Goes MA Jr, Pavão OFS, Kaufmann OG. Study of kidney morphologic and structural changes related to different ischemia times and types of clamping of the renal vascular pedicle. *Int Braz J Urol*. 2019;45(4):754-62. <http://dx.doi.org/10.1590/s1677-5538.18.0559>. PMID:31184454.
12. Yanagihara T, Yoshimine T, Morimoto K, Yamamoto K, Homburger HA. Immunohistochemical Investigation of Cerebral Ischemia in Gerbils. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1985;44(2):204-15. <http://dx.doi.org/10.1097/00005072-198503000-00009>. PMID:2579210.
13. Mondello C, Cardia L, Ventura-Spagnolo E. Immunohistochemical detection of early myocardial infarction: a systematic review. *Int J Legal Med*. 2017;131(2):411-21. <http://dx.doi.org/10.1007/s00414-016-1494-1>. PMID:27885432.
14. Aljakna A, Fracasso T, Sabatasso S. Molecular tissue changes in early myocardial ischemia: from pathophysiology to the identification

- of new diagnostic markers. *Int J Legal Med.* 2018;132(2):425-38. <http://dx.doi.org/10.1007/s00414-017-1750-z>. PMID:29362873.
15. Mondello C, Cardia L, Bartoloni G, Asmundo A, Ventura Spagnolo E. Immunohistochemical study on dystrophin expression in CAD-related sudden cardiac death: a marker of early myocardial ischaemia. *Int J Legal Med.* 2018;132(5):1333-9. <http://dx.doi.org/10.1007/s00414-018-1843-3>. PMID:29732464.
 16. Faubel S, Edelstein CL. Caspases as drug targets in ischemic organ injury. *Curr Drug Target Immune Endocr Metabol Disord.* 2005;5(3):269-87. <http://dx.doi.org/10.2174/1568008054863754>. PMID:16178788.
 17. Belczak SQ. Tratamento endovascular de trauma arterial periférico com o uso de stents revestidos: estudo experimental em porcos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.
 18. Lederman A. Indução de aneurisma em aorta abdominal de porcos: um modelo endovascular [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.
 19. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing [software]. New Zealand: R Foundation for Statistical Computing; 2017. [cited 2021 jan 18]. <https://www.R-project.org/>.
 20. Morettin PA, Bussab WO. Medidas-Resumo. In: Morettin PA, Bussab WO, editors. *Estatística básica*. São Paulo: Saraiva; 2010. p. 35-56.
 21. Faraway JJ. Multinomial Data. In: Faraway JJ, editor. *Extending the linear model with R: generalized linear, mixed effects and nonparametric regression models*. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC; 2016. p. 129-50. <http://dx.doi.org/10.1201/9781315382722-9>.
 22. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(8):2199-210. <http://dx.doi.org/10.1097/01.ASN.0000079785.13922.F6>. PMID:12874476.
 23. Secin FP. Importance and limits of ischemia in renal partial surgery: experimental and clinical research. *Adv Urol.* 2008;2008:102461. <http://dx.doi.org/10.1155/2008/102461>. PMID:18645616.
 24. Goes N, Urmson J, Ramassar V, Halloran PF. Ischemic acute tubular necrosis induces an extensive local cytokine response. Evidence for induction of interferon-gamma, transforming growth factor-beta 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-2, and interleukin-10. *Transplantation.* 1995;59(4):565-72. <http://dx.doi.org/10.1097/00007890-199502270-00022>. PMID:7878762.
 25. Jablonski P, Howden B, Rae D, et al. The influence of the contralateral kidney upon recovery from unilateral warm renal ischemia. *Pathology.* 1985;17(4):623-7. <http://dx.doi.org/10.3109/00313028509084764>. PMID:4094791.
 26. Armutcu F. Organ crosstalk: the potent roles of inflammation and fibrotic changes in the course of organ interactions. *Inflamm Res.* 2019;68(10):825-39. <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-019-01271-7>. PMID:31327029.
 27. Giraud S, Favreau F, Chatauret N, Thuillier R, Maiga S, Hauet T. Contribution of large pig for renal ischemia-reperfusion and transplantation studies: the preclinical model. *J Biomed Biotechnol.* 2011;532127. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/532127>.

Correspondência

Carolina Rodrigues Dal Bo
Hospital Israelita Albert Einstein - HIAE
Avenida Albert Einstein, 627 - Morumbi
05652-900 - São Paulo (SP), Brasil
Tel: (11) 2151-0011
E-mail: carolinardalbo@gmail.com

Informações sobre os autores

CRDB e VPP – Acadêmicas, 6º ano, Medicina, Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein (FICSAE); Alunas de Iniciação Científica, Grupo de Pesquisa em Cirurgia Vascular, Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE).

APWBS - Cirurgiã Vascular, Especialista, Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular (SBACV), Doutorado em Ciências da Saúde; Pós-Doutoramento em Cirurgia Endovascular, Instituto de Ensino e Pesquisa (IIEP), Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE).
NW - Cirurgião Vascular, Vice-presidente de Pesquisa e Inovação, Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE); Doutorado em Ciências da Saúde, Universidade de São Paulo (USP); Docente, Programa de Pós-graduação stricto sensu de Ciências da Saúde, Faculdade Israelita Albert Einstein (FICSAE), Professor Livre-docente e Associado, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP); Pesquisador nível I CNPq.

TPAA - Biólogo, Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO); Especialista em Anatomia Comparada, Biologia do Desenvolvimento e Células Tronco; Mestrado e Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Universidade de São Paulo (USP); Pós-Doutorado em Neuroimunomodulação, Universidade de São Paulo (USP), Hepatologia Experimental, Instituto de Ensino e Pesquisa (IIEP), Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE).

AM - Farmacêutica, Mestrado, Instituto de Ensino e Pesquisa (IIEP), Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE); Especializada MBA, Gestão de Projetos, Universidade São Judas Tadeu (USTJ).

OGK - Urologista, Doutorado em Urologia, Universidade de São Paulo (USP), Pós-doutorado em Cirurgia Robótica, Laparoscopia e Endourologia, Universidade da Califórnia, Irvine; MBA Executivo, Gestão de Saúde Einstein/Inspere; Docente Colaborador, Pós-graduação, Instituto de Ensino e Pesquisa (IIEP), Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE).

Contribuição dos autores

Concepção e desenho do estudo: CRDB, VPP, APWBS, TPAA, NW, OGK
Análise e interpretação dos dados: CRDB, VPP, APWBS, TPAA
Coleta de dados: CRDB, VPP, APWBS, AM
Redação do artigo: CRDB, VPP, APWBS, TPAA
Revisão crítica do texto: CRDB, VPP, APWBS, TPAA, NW, OGK
Aprovação final do artigo*: CRDB, VPP, APWBS, AM, TPAA, NW, OGK
Análise estatística: CRDB, VPP, OGK
Responsabilidade geral pelo estudo: APWBS, NW, OGK

*Todos os autores leram e aprovaram a versão final submetida ao J Vasc Bras.