

## ESTUDO DA MORFOLOGIA RENAL APÓS A OCLUSÃO DA AORTA ABDOMINAL INFRA-RENAL EM RATOS

### STUDY OF RENAL MORPHOLOGY AFTER INFRARENAL AORTIC CROSS-CLAMPING IN RATS

Eliane Alencar do Nascimento Feitosa, TCB- RJ<sup>1</sup>; Murched Omar Taha, TCBC-SP<sup>2</sup>;  
Djalma José Fagundes, TCBC- SP<sup>3</sup>; Cristina Maeda Takiya<sup>4</sup>;  
Lúcio Ronaldo Cardoso<sup>5</sup>; Doris Moura Campos<sup>6</sup>

**RESUMO: Objetivo:** Relacionar as alterações morfológicas renais sob microscopia de luz, de ratos submetidos à oclusão de aorta, em modelo que simule a condição clínica de reparação cirúrgica de um aneurisma de aorta abdominal. **Método:** Ratos Wistar (N=60), machos pesando entre 200 e 250g, foram distribuídos em três grupos: I (simulado); II (isquemia); III (isquemia + reperfusão); e cada grupo redistribuído em dois subgrupos: A (30 min); B (60 min). Foi realizada isquemia utilizando clamp vascular (8mm) na aorta abdominal infra-renal de acordo com o grupo estudado. Ao final de cada experimento os animais foram mortos e realizada análise histológica renal cortical e medular (descritiva e morfométrica) através de metodologia convencional (parafina-hematoxilina-eosina). A análise semiquantitativa de lesão tubular e intersticial foi realizada de acordo com o índice de lesão tubular e índice de lesão intersticial. Para a análise estatística foram aplicados os seguintes testes: Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, Comparações múltiplas ( $p < 0,001$ ). **Resultados:** Observou-se no grupo III alterações histológicas tubulares e intersticiais significantes com relação aos outros grupos ( $p < 0,001$ ). **Conclusão:** A oclusão da aorta abdominal infra-renal em ratos está associada a lesões estruturais renais tanto tubulares quanto intersticiais principalmente na fase de reperfusão (*Rev. Col. Bras. Cir.* 2005; 32(4): 178-182).

**Descritores:** Morfologia; Rim; Aorta abdominal; Ratos, Wistar

## INTRODUÇÃO

Desde a primeira operação realizada com sucesso para a ressecção de aneurisma da aorta abdominal infra-renal feita por Dubost em 1951, tem sido verificada a associação subsequente de insuficiência renal, que é uma causa importante de morbidade e mortalidade no pós-operatório<sup>1-4</sup>. Sua instalação é multifatorial tendo sido verificado que o clampeamento da aorta infra-renal parece ser um dos fatores mais importantes na patogênese da disfunção renal<sup>5-7</sup>. Esta varia de 1 a 65% em diferentes estudos<sup>8-10</sup>. A insuficiência renal tem como substrato anatômico a necrose tubular aguda, com manifestações clínicas e laboratoriais muito semelhantes em seres humanos e animais de experimentação como o rato<sup>8,11</sup>.

O desenvolvimento e a progressão da insuficiência renal aguda se devem à perda da função das células epiteliais tubulares devido a um processo de deleção ou morte. A disfunção renal ocorre, na grande maioria das vezes, após períodos de isquemia/reperfusão renal<sup>12-16</sup>.

Além disso, é bem conhecido o fato de que na lesão isquêmica e na isquemia/reperfusão ocorre também necrose tubular e células em apoptose, que podem ser vistas ao longo

dos segmentos do néfron, e contribuem para o estabelecimento da insuficiência renal<sup>17-21</sup>.

Independente da via das lesões nefron-tubulares, é importante estabelecer uma relação temporal entre a oclusão da artéria aorta infra-renal e o aparecimento de lesões renais.

A proposta desta pesquisa foi relacionar as alterações morfológicas sob microscopia de luz com o grupo de oclusão de aorta, num modelo em ratos que simule a condição clínica de reparação cirúrgica de um aneurisma da aorta abdominal.

## MÉTODO

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP-EPM (Protocolo no. 836/01) e ratificado pela Comissão de Ética da Universidade Iguazu (UNIG).

Foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), machos, com peso médio de 220 gramas. Os animais foram mantidos no Biotério da Universidade Iguazu (UNIG) por quinze dias, para observação e adaptação.

Os procedimentos operatórios foram realizados no Laboratório do Biotério da Universidade Iguazu e no Labora-

1. Pós-graduanda do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação da UNIFESP-EPM.

2. Professor Afiliado do Departamento de Cirurgia da UNIFESP-EPM.

3. Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia-coordenador do PPG-CeEX da UNIFESP-EPM.

4. Professora Adjunta do Departamento de Histologia e Embriologia da UFRJ.

5. Professor Adjunto da Disciplina de Nefrologia da UFRJ.

6. Aluna bolsista de Iniciação Científica PIBIC-CNPq.

Recebido em 20/12/2004

Aceito para publicação em 14/06/2005

Conflito de interesse: nenhum

Fonte de financiamento: nenhuma

Trabalho realizado no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação-UNIFESP-EPM, no Departamento de Histologia e Embriologia - UFRJ; Laboratório do Biotério da Universidade Iguazu-UNIG.

tório da Disciplina de Histologia e Embriologia-UFRJ. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: I= simulado; II= isquemia; III= isquemia + reperfusão. Os animais foram redistribuídos aleatoriamente (n=10) nos seguintes subgrupos: IA= simulado de 30 minutos; IB= simulado de 60 minutos; IIA= isquemia de 30 minutos; IIB= isquemia de 60 minutos; IIIA= isquemia de 30 minutos + reperfusão de 30 minutos; IIIB= isquemia de 60 minutos + reperfusão de 60 minutos.

Os animais foram anestesiados com inalação de éter dietílico. Iniciou-se o ato operatório somente após ter sido constatada a perda dos reflexos de endireitamento, de retirada do membro pélvico ao estímulo doloroso provocados por preensão e do reflexo palpebral. Foi realizada laparotomia mediana de aproximadamente quatro centímetros com bisturi lâmina 15, com subsequente afastamento das alças intestinais para a direita. A dissecação da aorta abdominal infra-renal foi realizada por meio de gazes, cotonetes e pinças hemostáticas apropriadas.

Em seguida foi realizada heparinização sistêmica na dose de 10 a 15 U/100g/peso, por punção da veia cava utilizando-se seringa de 1 ml acoplada à agulha 13x3 (30G ½). Após três minutos a aorta abdominal infra-renal foi ocluída através de clampe vascular 8 mm. Ao término do tempo de oclusão da aorta infra-renal de cada animal foi realizada nefrectomia bilateral, e os animais mortos por exsanguinação.

O estudo histológico compreendeu uma análise descritiva e uma semi-quantitativa. O estudo descritivo compreendeu uma análise do compartimento glomerular e do compartimento túbulo-intersticial renal. Neste último foi analisado em separado o compartimento intersticial onde os seguintes parâmetros foram determinados: edema intersticial, congestão capilar, hemorragia intersticial e inflamação e, no compartimento tubular, o grau de vacuolização, descamação celular e alteração nuclear.

A avaliação semiquantitativa de cada parâmetro foi feita às cegas. As imagens foram capturadas por câmara digital (Coolpix 550, Nikon, Japan) acoplada a microscópio de luz (Eclipse400, Nikon, Japan) utilizando a lente objetiva de X40. Os cortes histológicos receberam coloração pela HE sendo analisados 10 campos corticais e cinco campos medulares por animal.

As imagens foram avaliadas por um observador e a quantificação foi feita segundo uma escala de zero a três cruzes, correspondendo à alteração ausente, leve, moderada e intensa, respectivamente.

Os resultados foram expressos como índice de lesão intersticial e índice de lesão tubular, correspondendo ao somatório de pontos conferidos para cada parâmetro correspondente, segundo metodologia descrita por Takito<sup>22</sup>:

-índice de lesão intersticial: valor máximo=12

-índice de lesão tubular: valor máximo=9

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada pela Disciplina de bioestatística do Departamento de Medicina Preventiva da UNIFESP-EPM.

Para a análise estatística, de acordo com a natureza das variáveis estudadas, foram aplicados os seguintes testes: teste de Mann-Whitney; análise de variância por posto de

Kruskal-Wallis; em todos os testes fixou-se em 0,001 o nível de rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se com um asterisco (\*) os valores significantes<sup>23</sup>.

## RESULTADOS

O corte de rins dos animais do grupo IA apresentavam histologia preservada semelhante ao normal, aspecto visto tanto nas colorações pela HE e PAS. Nos animais do grupo IB foi verificado haver uma pequena alteração do contorno apical de células tubulares na HE assim como diminuto alargamento do interstício renal por edema.

Na coloração pelo PAS não foi verificada alteração grosseira em borda estriada dos túbulos. Nos animais dos grupos IIA e B assim como nos dos grupos IIA e IIIB foram verificadas intensificação das lesões tubulares, irregularidade na borda apical chegando à perda focal do citoplasma apical nos grupos III(A e B) e perda focal da afinidade tintorial pelo PAS indicativo de alteração/perda da borda estriada além de progressão do edema intersticial.

Congestão capilar discreta foi verificada no interstício e glomérulos evidenciada nos grupos IIIA e B (Figuras 1, 2, 3 e 4). Células inflamatórias não foram vistas nos grupos I, II e IIIA. No grupo IIIB foi verificada a presença de células inflamatórias, leucócitos polimorfonucleares ou células mononucleares no interstício (uma célula inflamatória em raros campos) sendo mais comum a presença destas células nos capilares sanguíneos intersticiais. Hemorragia intersticial não foi verificada nos cortes histológicos dos grupos.

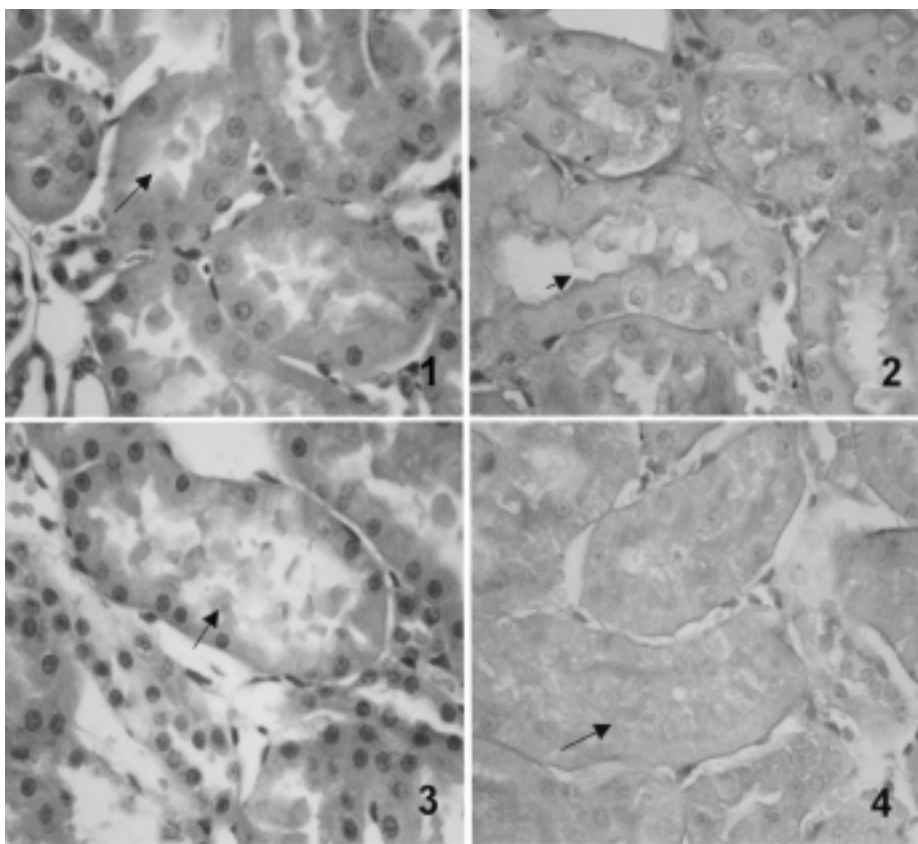
A análise descritiva das lesões renais se correlacionou com os achados histomorfométricos como pode ser visto no Gráfico 1.

A análise estatística dos dados histomorfométricos demonstrou haver alteração tubular e intersticial significante entre os animais dos grupos IIIB em comparação com os outros grupos estudados. Também foi verificado haver diferença significativa entre os animais isquêmicos e reperfundidos com o tempo.

## DISCUSSÃO

Este trabalho confirmou a presença de alterações histológicas tubulares após lesão por isquemia e isquemia/reperfusão em ratos submetidos à clampeamento infra-renal da aorta e sacrificados imediatamente após a oclusão, tanto após 30 quanto 60 minutos de isquemia, com e sem reperfusão.

É bem conhecido o fato de que alterações morfológicas compatíveis com necrose isquêmica de células tubulares renais são verificadas após pelo menos 30 minutos de isquemia e com mais de uma hora de reperfusão<sup>24-27</sup>. As modificações, reflexo da irreversibilidade da injúria, consistem na presença de alterações nucleares como picnose, cariólise ou cariorréxis associada com a homogeneidade e acidofilia citoplasmática<sup>18</sup>. É bem conhecido o fato que muitas vezes as células agredidas ainda conseguem sobreviver apresentando somente alterações subletais que consistem em degeneração hídrica ou vacuolar com modificações metabólicas discretas, mas ainda compatíveis com a sobrevivência celular.



**Figura 1** - Fotomicrografia do rim de animal do grupo IIIA. Túbulos renais exibindo irregularidade no bordo apical das células e edema intersticial. HE X 40.

**Figura 2** - Aspecto do rim de animal do grupo IIIA. Corte histológico corado pelo PAS exibindo túbulos renais com perda focal da afinidade tintorial pelo PAS. X 40.

**Figura 3** - Corte histológico do rim de animal do grupo IIIB. Células tubulares apresentando irregularidade do bordo apical que por vezes se apresenta solto na luz tubular e importante edema intersticial. HE X 40.

**Figura 4** - Rim de animal do grupo IIIB exibindo intensa perda da afinidade tintorial pelo PAS e edema intersticial evidente. PAS X 40.

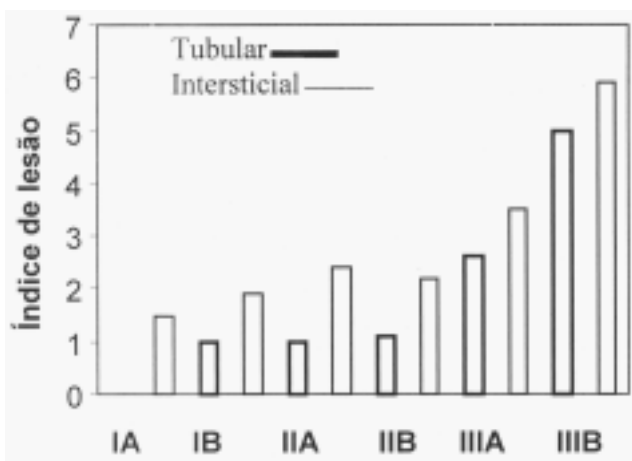
Entretanto, com o aporte de oxigênio, quando do restabelecimento do fluxo sanguíneo, as lesões se exacerbam pelo fato dessas células já estarem metabolicamente comprometidas não tendo, portanto, a capacidade de exercer suas funções no sentido de manter o equilíbrio iônico e suas defesas antioxidantes<sup>18,19</sup>. Associado à morte celular por necrose, genes reguladores da apoptose também são ativados culminando com a perda maior de células ao longo dos segmentos dos nefrons o que contribui para o estabelecimento da insuficiência renal<sup>20,21</sup>.

Nosso protocolo experimental, empregando animais mortos logo após a isquemia ou logo após a liberação do clampe, permitiu a demonstração de que com 30 minutos de isquemia já há alterações tubulares que são agravadas com 30 minutos de reperfusão. Existem trabalhos anteriores confirmando que a presença de necrose tubular aguda morfológica é verificada após dois dias de reperfusão<sup>28</sup>.

Foram verificadas, porém, modificações da borda estriada tubular, associada à ruptura da integridade celular e à obstrução tubular em estudos realizados após 30 minutos de isquemia e duas horas de reperfusão<sup>29</sup> ou após uma hora de isquemia com uma a três horas de reperfusão<sup>8</sup>. Os achados são semelhantes aos encontrados em nosso experimento após uma hora de isquemia e reperfusão. Em estudo semelhante ao nosso, porém com exploração ultra-estrutural, Arendshorst *et al*<sup>8</sup> comprovaram que após uma a três horas de isquemia houve o aparecimento de modificações subletais (tumefação mitocondrial de baixa amplitude – condensação da matrix e dilatação das cristas) em túbulos, o que corrobora os nossos achados.

Sabe-se que os tecidos fixados por imersão podem apresentar artefatos que são facilmente confundidos com alterações patológicas. Estudo realizado considerando a reação das células renais durante autólise *in vitro* evidenciou que, mesmo em tecidos fixados imediatamente após a retirada do organismo há alterações mais proeminentes em túbulos proximais. A maioria dos túbulos se apresenta com a luz não aparente devido à tumefação celular, havendo também alguma perda da afinidade tintorial nuclear<sup>30</sup>.

Não utilizamos uma fixação por perfusão devido ao fato de que esta ao ser realizada com animais ainda vivos



**Gráfico 1** - Distribuição do índice de lesão intersticial e tubular nos diferentes grupos experimentais. IA: Grupo simulado – 30 minutos; IB: Grupo simulado 60 minutos; IIA: Isquemia – 30 minutos; IIB: Isquemia – 60 minutos; IIIA: Isquemia/Reperfusão 30 minutos; IIIB: Isquemia/Reperfusão 60 minutos.

poderia alterar o tempo de reperfusão ou provocar reperfusão nos animais submetidos somente a isquemia o que alteraria o protocolo do nosso experimento. Igualmente, em nosso material levamos em consideração a presença destes artefatos.

As modificações consideradas foram comparativas em relação aos animais do grupo simulado. Por este motivo optamos por utilizar uma análise semiquantitativa de imagens

digitalizadas para diminuir a margem de erro. O achado de modificações no compartimento tubular no grupo IB apesar de ser um controle pode ter sido provocado pelo maior tempo de exposição do rim.

Concluindo, a oclusão da aorta abdominal infra-renal em ratos está associada a modificações morfológicas renais principalmente na fase de reperfusão.

## ABSTRACT

**Background:** The aim of this study was to investigate the influence of infrarenal cross-clamping in the renal tissue. **Methods:** Groups of male Wistar rats (N=60) were subjected or not to infrarenal aortic cross-clamping following or not by reperfusion according to each group: IA (sham-30 min-n=10); IB (sham-60min-n=10); IIA (30min of ischaemia-n=10); IIB (60min of ischaemia-n=10); IIIA (30min of ischaemia + 30min of reperfusion-n=10); IIIB (60min of ischaemia + 60min of reperfusion-n=10). All animals were submitted to nephrectomy. The histological analyses (descriptive and morphometry) were accomplished through conventional methodology (paraffin embedding and hematoxylin and eosin staining). Semiquantitative analyses of tubular damage (modified structure) and interstitial edema were carried out according to an index of intensity of injury. Data was validated by applying statistical tests: Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, Multiple Comparisons. Significance was accepted at  $p < 0.001$ . **Results:** Occurrence of significant tubular and interstitial damages in group III was observed. **Conclusion:** Occlusion of the infrarenal aorta in rats can lead to renal morphological effects, especially in reperfusion phase.

**Key words:** Morphology; Kidney; Aorta abdominal; Rats, Wistar.

## REFERÊNCIAS

- Allen BT, Anderson CB, Rubin BG, et al. Preservation of renal function in juxtarenal and suprarenal abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg.* 1993;17(5):948-59.
- Bickerstaff LK, Hollier LH, Van Peenen HJ, et al. Abdominal aortic aneurysms: the changing natural history. *J Vasc Surg.* 1984;1(1):6-12.
- Norman PE, Castleden WM, Hockey RL. Prevalence of abdominal aortic aneurysm in Western Australia. *Br J Surg.* 1991;78(9):1118-121.
- Darling RC, Messina CR, Brewster DC, et al. - Autopsy study of unoperated abdominal aortic aneurysms. The case for early resection. *Circulation.* 1977;56(3 suppl):161-4.
- Powers SR, Boba A, Stein A. The mechanism and prevention of distal tubular necrosis following aneurysmectomy. *Surgery.* 1957;42(1):156-62.
- Foster JH, Adkins RB, Chamberlain NO, et al. The renal effects of lower abdominal aortic cross-clamping. Report of negative results in dogs and monkeys. *JAMA.* 1963;183(6):451-4.
- Abbott WM, Cooper JD, Austen WG. The effect of aortic clamping and declamping on renal blood flow distribution. *J Surg Res.* 1973;14(5):385-92.
- Arendshorst WJ, Finn WF, Gottschalk CW. Micropuncture study of acute renal failure following temporary renal ischemia in the rat. *Kidney Int.* 1976; 10(Suppl 6):100-5.
- Myers BD, Moran SM. Hemodynamically mediated acute renal failure. *N Eng J Med.* 1986;314(2):97-105.
- Tanner GA, Sloan KL, Sophasan S. Effects of renal artery occlusion on kidney function in the rat. *Kidney Int.* 1973;4(6):377-89.
- De Andrade DF. Insuficiência renal aguda. In: Paolluci AA. *Nefrologia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1977. p.157-79.
- Gobe G, Zhang XJ, Willgoss DA, et al. Relationship between expression of Bcl-2 genes and growth factors in ischemic acute renal failure in the rat. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11(3):454-67.
- Segreto RA, Segreto HR. Radiação ionizante e resposta celular- atualidades. *Radiol Bras.* 1997;30(6):301-7.
- Segreto HR, Silva MR, Egami MI, et al. Apoptose e radiação: revisão. *Radiol Bras.* 1998;31(1):1-8.
- Herra Sánchez SA. Apoptosis relación com el riñón. *Rev Med Costa Rica Centroam.* 1998;65(545):157-61.
- Ortiz A. Nephrology forum: apoptotic regulatory proteins in renal injury. *Kidney Int.* 2000;58(1):467-85.
- Robbins SL, Cottrán RS, Kumar V. Lesão e adaptações celulares. In: Robbins SL, Cottrán RS, Kumar V. *Patologia estrutural e funcional.* 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1984. p.1-38.
- Kane AB. Mechanisms of cell and tissue injury. In: Kane AB. *Cellular and molecular pathogenesis.* Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p.1-22.
- Schumer M, Colombel MC, Sawczuk IS, et al. Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am J Pathol.* 1992;40(4):831-8
- Gobe G, Zhang XJ, Cuttle L, et al. Bcl-2 genes and growth factors in the pathology of ischaemic acute renal failure. *Immunol Cell Biol.* 1999;77(3):279-86.
- Cuttle L, Zhang XJ, Endre ZH, et al. Bcl-X(L) translocation in renal tubular epithelial cells in vitro protects distal cells from oxidative stress. *Kidney Int.* 2001; 59(5):1779-88.
- Takito AM. Estudo funcional e histológico na síndrome de isquemia e reperfusão em membros posteriores de ratos [dissertação]. São Paulo(SP): Universidade Federal de São Paulo; 1998.
- Siegel S, Castellan Jr. *Nonparametrics statistics.* 2ª ed. New York: McGraw-Hill;1988.
- Robbins SL, Cottrán RS, Kumar V. Cell injury, adaptation, and death. In: Robbins SL, Cottrán RS, Kumar V. *Basic pathology.* 7ª ed. New York: W. Saunders; 2003. p. 3-33.
- Pararajasingam R, Weight SC, Bell PR, et al. Prevention of renal impairment following aortic cross-clamping by manipulation of the endogenous renal nitric oxide response. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000; 19(4):396-9.

26. Ushigome H, Sano H, Okamoto M, et al. The role of tissue factor in renal ischemic reperfusion injury of the rat. *J Surg Re.* 2002;102(2):102-9.
27. Kelly KJ, Plotkin Z, Vulgamott SL, et al. P53 mediates the apoptotic response to GTP depletion after renal ischemia-reperfusion: protective role of a p53 inhibitor. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(1):128-38.
28. Rosenberg C, Griethe W, Gruber G, et al. Cellular responses to hypoxia after renal segmental infarction. *Kidney Int.* 2003;64(3):874-86.
29. Donohoe JF, Venkatachalam MA, Bernard DB, et al. Tubular leakage and obstruction after renal ischaemia: structural-functional correlations. *Kidney Int.* 1978;13(3):208-22.
30. Osvaldo L, Jackson JD, Cook ML, et al. - Reactions of kidney cells during autolysis: light microscopic observations. *Lab Invest.* 1965;14:603-22.

Eliane Alencar do Nascimento Feitosa  
Rua José Linhares, 244/706  
Leblon  
Rio de Janeiro-RJ  
22430-220  
E-mail: eanfeitosa@uol.com.br