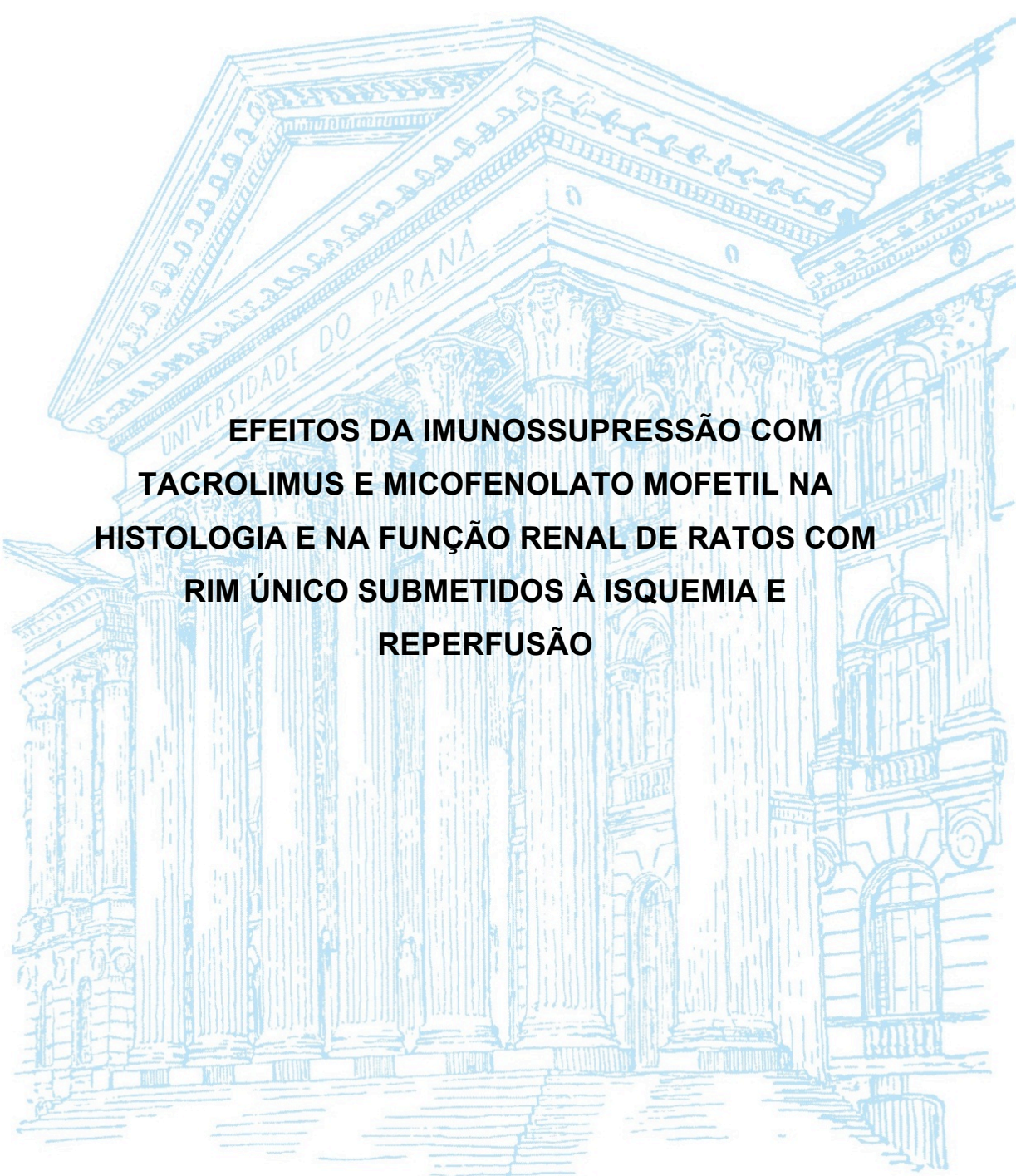


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**PAULO HENRIQUE GOULART FERNANDES DIAS**



**EFEITOS DA IMUNOSSUPRESSÃO COM  
TACROLIMUS E MICOFENOLATO MOFETIL NA  
HISTOLOGIA E NA FUNÇÃO RENAL DE RATOS COM  
RIM ÚNICO SUBMETIDOS À ISQUEMIA E  
REPERFUSÃO**

**CURITIBA**

**2014**

**PAULO HENRIQUE GOULART FERNANDES DIAS**

**EFEITOS DA IMUNOSSUPRESSÃO COM TACROLIMUS E  
MICOFENOLATO MOFETIL NA HISTOLOGIA E NA FUNÇÃO RENAL  
DE RATOS COM RIM ÚNICO SUBMETIDOS À ISQUEMIA E  
REPERFUSÃO**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre.**

**Orientador: Prof. Dr. Rogério de Fraga**

**Co-orientador: Prof. Dr. Renato Tambara Filho**

**CURITIBA**

**2014**



Dias, Paulo Henrique Goulart Fernandes  
Efeitos da imunossupressão com tacrolimus e micofenolato  
mofetil na histologia e na função renal de ratos com rim único  
submetidos à isquemia e reperfusão / Paulo Henrique Goulart  
Fernandes Dias – Curitiba, 2014.

76: il.

Orientador: Prof. Dr. Rogério de Fraga.

Co-orientador: Prof. Dr. Renato Tambara Filho.

Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências da Saúde da Uni-  
versidade Federal do Paraná.

1.Imunossupressão. 2.Rim – Histologia. 3.Rim – Fisiologia.  
4.Isquemia. 5.Reperfusão. 6.Micofenolato mofetil. 7.Tacrolimus.

NLM: WJ 368

Dedico este trabalho a Deus e às pessoas que sempre estiveram ao meu lado na construção das realizações de minha vida.

À minha esposa Renata, pelo carinho, compreensão e suporte.

Ao meu filho Henrique, fonte de minha inspiração e alegria.

À meu pai, Paulo, pelo exemplo de trabalho e concentração.

À minha mãe, Maria Luiza, pela formação de valores e incentivo acadêmico e na profissão.

À Zenaide, pelo amor diário.

Aos meus irmãos, Cinthia e Fernando, pelo companheirismo e dedicação.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Orientador, Prof. Dr. Rogério de Fraga, pela oportunidade, confiança, constante incentivo, dedicação e auxílio para o desenvolvimento deste estudo.

Ao Co-orientador, Prof. Dr. Renato Tambara Filho, exemplo de dedicação à área acadêmica, pela confiança e pelos ensinamentos que muito contribuíram para minha formação médica e pessoal.

Ao Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias, pela confiança e oportunidade de realizar esta pós-graduação.

À Patologista Dra. Regina P. Xavier Gomes, pela valiosa contribuição realizando análises histológicas e disponibilizando seu grande conhecimento nas discussões e em ensinamentos teóricos.

Aos Professores e médicos do serviço de urologia do HC-UFPR, por minha formação profissional.

Aos alunos de iniciação científica, Júlio Slongo e Gabriel Augusto Oliveira, pelo auxílio no experimento e dedicação no cuidado dos animais.

Aos meus colegas Alexandre Cavalheiro Cavalli, Ricardo Cavalheiro Cavalli, Rafael Cavalheiro Cavalli, Marcelo Alves Aranha Júnior, Carlos Eduardo de Alcântara Castilho, André Watanabi, pelo companheirismo e auxílio na execução do experimento.

À estatística Prof<sup>a</sup>. Érika Cristina Ferreira, pelas horas dedicadas com os números e pela objetividade nas explicações.

À Prof<sup>a</sup>. Maria Lúcia de Oliveira Machado, pela revisão ortográfica.

À bibliotecária Áurea Maria Costin, pela revisão das referências bibliográficas.

À UFPR, por proporcionar a estrutura adequada à pesquisa, como o biotério e o laboratório de anatomia e experimentação animal.



A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

"Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo".

*Martin Luther King*

"Saiba que seu destino é traçado pelos próprios pensamentos, e não por alguma força que venha de fora. O seu pensamento é a planta concebida por um arquiteto para construir um edifício denominado prosperidade. Você deve tornar o seu pensamento mais elevado, mais belo e mais próspero".

*Martin Luther King*

## RESUMO

**Introdução:** Há poucos estudos que avaliam o efeito simultâneo da nefrotoxicidade induzidas por drogas imunossupressoras e da isquemia e reperfusão na disfunção renal pós-transplante. **Objetivo:** Avaliar as alterações histológicas renais e a função renal, em ratos com rim único, submetidos à isquemia e reperfusão renal e à imunossupressão com tacrolimus e micofenolato mofetil. **Método:** Realizado estudo experimental com 80 ratos Wistar, os quais foram divididos aleatoriamente em oito grupos de 10 animais: Controle (não submetido à cirurgia); SHAM (submetido à cirurgia, sem uso de drogas imunossupressoras). Os demais grupos foram submetidos à cirurgia e à imunossupressão: T1 (tacrolimus 1mg/kg/dia); T2 (tacrolimus 0,1mg/kg/dia); T3 (tacrolimus 10mg/kg/dia); M1 (micofenolato mofetil 20mg/Kg/dia); MT1 (micofenolato mofetil 20mg/kg/dia e tacrolimus 1mg/kg/dia); MT2 (micofenolato mofetil 20mg/kg/dia e tacrolimus 0,5mg/kg/dia). A cirurgia visou reproduzir aspectos de um transplante renal, com nefrectomia direita e clampeamento renal esquerdo por 20 minutos e consequente processo de isquemia e reperfusão renal. No pós-operatório, os ratos receberam medicação diariamente, através de gavagem, e, no 14º dia, foram submetidos a eutanásia, sendo realizada análise histológica renal e análise de uréia e de creatinina. As variáveis histológicas pesquisadas foram classificadas de acordo com a fisiopatologia e local da lesão no rim. **Resultados:** Histologicamente, as lesões encontradas que apresentaram diferença significativa entre os grupos foram a vacuolização citoplasmática e a presença de cilindros hialinos. Esses estiveram presentes somente no grupo T3, em que foi utilizado tacrolimus em doses mais elevadas. Já a vacuolização citoplasmática foi encontrada em maior intensidade nos grupos T3, M1 e MT1, enquanto que no grupo MT2 observou-se taxas menores, bastante similares ao grupo SHAM e Controle. O grupo T3 apresentou incremento significativo da uréia e da creatinina quando comparado com os grupos Controle e SHAM. O grupo M1, em que foi utilizado micofenolato mofetil de forma isolada, apresentou menor taxa de elevação de uréia quando comparado a todos os grupos em que foi utilizado tacrolimus, exceto o grupo MT2 (metade da dose habitual de tacrolimus), o qual também apresentou níveis séricos baixos de uréia. Em contrapartida, os grupos em que foram utilizados micofenolato mofetil isolado ou em associação com tacrolimus apresentaram níveis de creatinina estatisticamente similares ao grupo T3. **Conclusão:** Do ponto de vista histológico, a associação de lesão por isquemia e reperfusão com o uso de tacrolimus ou micofenolato mofetil de forma isolada apresentou uma maior taxa de alterações renais características de nefrotoxicidade precoce. Do ponto de vista laboratorial, através da dosagem sérica de uréia e creatinina, a associação de lesão por isquemia e reperfusão com tacrolimus em doses mais elevadas mostrou-se nefrotóxica.

Palavras-chave: Imunossupressão. Micofenolato mofetil. Tacrolimus. Histologia Renal. Função Renal. Isquemia. Reperfusão.



## ABSTRACT

**Introduction:** There are few studies concerning the simultaneous effect of nephrotoxicity induced by immunosuppressive drugs and ischemia and reperfusion in post renal transplant dysfunction. **Objective:** To evaluate the kidney histological changes and renal function impairment in rats with a solitary kidney submitted to ischemia and reperfusion and immunosuppression with tacrolimus and mycophenolate mofetil. **Material and Method:** An experimental study was performed with 80 male Wistar rats, which were randomly distributed into eight groups: control (no surgery), SHAM (submitted to surgery without immunosuppressive drugs). The other groups were submitted to surgery and immunosuppression: T1 (tacrolimus 1mg/kg/day), T2 (tacrolimus 0.1 mg/kg/day), T3 (tacrolimus 10mg/kg/day), M1 (mycophenolate mofetil 20mg/kg/day); MT1 (mycophenolate mofetil 20mg/kg/day and tacrolimus 1mg/kg/day); MT2 (20mg/kg/day mycophenolate mofetil and tacrolimus 0.5 mg/kg/day). Surgery consisted in right nephrectomy and clamping left kidney for 20 minutes with secondary ischemia and reperfusion's process as a simulation of some aspects of renal transplantation. Postoperatively, rats received daily medication, by gavage, and, at 14 days, were euthanized, with subsequently renal histology's analysis and urea and creatinine's serum measurement. Histological variables were classified according to the pathophysiology and location of injury in the kidney. **Results:** Comparing groups, cytoplasmatic vacuolation and the presence of hyaline casts were the only two kinds of histological lesions found with significative difference. While casts were only present in the T3 group, vacuolation was more intensily found in T3, M1 and MT1 groups, and less intense in MT2 and control group. T3 group showed significant increase in urea and creatinine levels when compared with control and SHAM groups. In M1 groups were found lower serum levels in urea compared to all groups in which tacrolimus was administrated, except MT2 group, also presenting low serum levels of urea. In contrast, groups in which mycophenolate mofetil was used alone or in combination with tacrolimus showed creatinine levels statistically similar to T3 group. **Conclusion:** The association of ischemia and reperfusion injury with a single immunosuppressor (tacrolimus or mycophenolate mofetil) presented a higher rate of histological features of early nephrotoxicity. Concerning renal function, considering serum urea and creatinine measurement, association of ischemia and reperfusion injury with tacrolimus in higher doses proved to be nephrotoxic.

Key words: Immunosuppression. Kidney Histology. Renal function. Ischemia. Reperfusion. Mycophenolate mofetil. Tacrolimus.

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1- MEDIANA E DESVIOS PADRÃO DAS DOSAGENS SÉRICAS DE TACROLIMUS (NG/DL).....	39
GRÁFICO 2 - MEDIANA E DESVIOS PADRÃO DAS DOSAGENS SÉRICAS DE DE URÉIA (MG/DL).....	40
GRÁFICO 3 - MEDIANA E DESVIOS PADRÃO DAS DOSAGENS SÉRICAS DE CREATININA (MG/DL).....	41
GRÁFICO 4 – ESCORE DE VACUOLIZAÇÃO CITOPLASMÁTICA .....	43
GRÁFICO 5 – ESCORE DE FIBROSE INTERSTICIAL.....	45
GRÁFICO 6 – ESCORE DE ATROFIA TUBULAR .....	46

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - RATOS WISTAR .....	27
FIGURA 2 - TÉCNICA DE ANESTESIA INTRA-PERITONEAL .....	29
FIGURA 3 - POSICIONAMENTO DOS RATOS .....	29
FIGURA 4 - LAPAROTOMIA MEDIANA .....	30
FIGURA 5 - NEFRECTOMIA DIREITA .....	30
FIGURA 6 - CLAMPEAMENTO RENAL À ESQUERDA.....	31
FIGURA 7 - SUTURA DA PAREDE ABDOMINAL.....	31
FIGURA 8 - TÉCNICA DA PEGA DO ANIMAL .....	32
FIGURA 9 - SONDA DE GAVAGEM.....	32
FIGURA 10 - TÉCNICA DE GAVAGEM.....	32
FIGURA 11 - VACUOLIZAÇÃO CITOPLASMÁTICA (40X) .....	43
FIGURA 12 - VACUOLIZAÇÃO CITOPLASMÁTICA (100X) .....	44
FIGURA 13 - FIBROSE INTERSTICIAL .....	45
FIGURA 14 - CILINDROS HIALINOS .....	47



## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - GRUPOS .....	28
QUADRO 2 - GRADUAÇÃO DOS ACHADOS HISTOLÓGICOS .....	37

## LISTA DE SIGLAS

ADP -	Adenosina difosfato
ATP -	Adenosina trifosfato
CDK -	Ciclinas
COBEA -	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DAG -	Diacilglicerol
DNA -	Ácido desoxirribonucléico
EDTA -	Ácido etilenodiaminotetracético
FDA -	Food and drug administration
FK506 -	Tacrolimus
HE -	Hematoxilina & eosina
HLA -	Antígeno leucocitário humano
IMPDH -	Inosina monofosfato desidrogenase
IP-3 -	Inositol trifosfato
MMF -	Micofenolato mofetil
MPA -	Ácido micofenólico
MTOR -	Mammalian target of rapamycin
NADH -	Hidrogeno niacina adenina dinucleotídeo
NPC Tx -	Nefropatia ou disfunção crônica do transplante
PAS -	Ácido periódico de Schiff
PLC -	Fosfolipase C
PTKs -	Proteínas tirosinaquinasas
RNA -	Ácido ribonucléico
RS-61443 -	Pró-droga semi-sintética éster morfolinoetil, também conhecida como micofenolato mofetil
SWTC -	South West Transplant Centre
TCR -	Receptor de células T
TNF -	Fator de necrose tumoral
UFPR -	Universidade Federal do Paraná
USP -	Universidade de São Paulo

## LISTA DE ABREVIATURAS

C -	Controle
CH -	Cilindros hialinos
HG -	Hipertrofia glomerular;
LH -	Lesão histológica
LI -	Lesão isquêmica
M1 : Grupo IV -	(micofenolato mofetil 20mg/Kg/dia)
MT1: Grupo V -	(micofenolato mofetil 20mg/kg/dia e tacrolimus 1mg/kg/dia)
MT2: Grupo VI -	(micofenolato mofetil 20mg/kg/dia e tacrolimus 0,5mg/kg/dia)
N -	Número de animais
NTA -	Necrose tubular aguda
SF -	Solução fisiológica
SHAM -	Simulação
T1: Grupo I -	(tacrolimus 1mg/kg/dia)
T2: Grupo II -	(tacrolimus 0,1mg/kg/dia)
T3: Grupo III -	(tacrolimus 10mg/kg/dia)
TC -	Toxicidade crônica
TTA -	Toxicidade tubular aguda
TVT-	Toxicidade vascular aguda
VC -	Vacuolização citoplasmática



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 OBJETIVOS .....	18
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
2.1 IMUNOSSUPRESSÃO.....	19
2.1.1 Tacrolimus.....	20
2.1.2 Micofenolato mofetil .....	21
2.1.3 Imunossupressão x transplante renal .....	21
2.2 DISFUNÇÃO RENAL PÓS-TRANSPLANTE .....	22
2.2.1 Disfunção renal pós-transplante x nefrotoxicidade induzida por drogas .....	22
2.2.2 Disfunção renal pós-transplante x lesão por isquemia e reperfusão renal .....	23
2.2.3 Efeitos aditivos da nefrotoxicidade por drogas e da lesão por isquemia e reperfusão renal x disfunção renal pós-transplante .....	24
<b>3 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	26
3.1 POPULAÇÃO E AMOSTRA DA PESQUISA .....	26
3.1.1 Critérios de inclusão.....	26
3.2 AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO .....	26
3.3 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	27
3.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO .....	28
3.4.1 Ato anestésico.....	28
3.4.2 Preparo e posicionamento dos ratos.....	29
3.4.3 Técnica cirúrgica .....	30
3.4.4 Pós-operatório.....	31
3.5 COLETA DAS AMOSTRAS .....	33
3.6 ANÁLISES DAS AMOSTRAS .....	33
3.6.1 Análises bioquímicas.....	33
3.6.2 Análises histológicas .....	34

3.6.2.1 Critérios histológicos .....	35
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	37
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
4.1 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	38
4.1.1 Dosagem de tacrolimus.....	38
4.1.2 Dosagem de uréia.....	39
4.1.3 Dosagem de creatinina. ....	40
4.2 ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	42
4.2.1 Lesão por isquemia (NTA) .....	42
4.2.2 Toxicidade tubular aguda (TTA).....	42
4.2.3 Toxicidade vascular aguda (TVA) .....	44
4.2.4 Toxicidade crônica (TC) .....	44
4.2.5 Outros achados .....	46
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>56</b>
<b>APÊNDICE 1 - DOSAGENS SÉRICAS DE TACROLIMUS (NG/ML)</b> .....	<b>61</b>
<b>APÊNDICE 2 - DOSAGENS SÉRICAS DE URÉIA (MG/DL)</b> .....	<b>62</b>
<b>APÊNDICE 3 - DOSAGENS SÉRICAS DE CREATININA (MG/DL)</b> .....	<b>63</b>
<b>APÊNDICE 4 - INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS HISTOLÓGICAS DE CADA RATO DO GRUPO CONTROLE E MÉDIAS</b> .....	<b>64</b>
<b>APÊNDICE 5 - INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS HISTOLÓGICA DE CADA RATO DO GRUPO SHAM E MÉDIAS</b> .....	<b>65</b>
<b>APÊNDICE 6 - INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS HISTOLÓGICAS DE CADA RATO DO GRUPO T1 E MÉDIAS</b> .....	<b>66</b>
<b>APÊNDICE 7 - INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS HISTOLÓGICAS DE CADA RATO DO GRUPO T2 E MÉDIAS</b> .....	<b>67</b>
<b>APÊNDICE 8 - INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS HISTOLÓGICA DE CADA RATO DO GRUPO T3 E MÉDIAS</b> .....	<b>68</b>

<b>APÊNDICE 9 - INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS HISTOLÓGICAS DE CADA RATO DO GRUPO M1 E MÉDIAS .....</b>	<b>69</b>
<b>APÊNDICE 10 - INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS HISTOLÓGICA DE CADA RATO DO GRUPO MT1 E MÉDIAS .....</b>	<b>70</b>
<b>APÊNDICE 11 - INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS HISTOLÓGICA DE CADA RATO DO GRUPO MT2 E MÉDIAS .....</b>	<b>71</b>
<b>APÊNDICE 12 - COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DA VACUOLIZAÇÃO CITOPLASMÁTICA .....</b>	<b>72</b>
<b>APÊNDICE 13 - COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DA TROMBOSE GLOMERULAR .....</b>	<b>73</b>
<b>APÊNDICE 14 - COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DA FIBROSE INTERSTICIAL.</b>	<b>74</b>
<b>APÊNDICE 15 - COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DA ATROFIA TUBULAR .....</b>	<b>75</b>
<b>APÊNDICE 16 - COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO .....</b>	<b>76</b>
<b>APÊNDICE 17 - COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DOS CILINDROS HIALINOS.</b>	<b>77</b>
<b>ANEXO - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS .....</b>	<b>78</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica tem elevada morbidade e mortalidade, e sua incidência e prevalência tem aumentado progressivamente, em proporções epidêmicas, no Brasil e em todo o mundo. O custo elevado para manter pacientes em tratamento renal substitutivo tem sido motivo de grande preocupação por parte de órgãos governamentais (SESSO; GORDAN, 2007). Para a maioria dos pacientes portadores de insuficiência renal crônica, o transplante renal é a terapêutica mais eficaz, pois melhora a sobrevida e a qualidade de vida (HUMAR *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2003).

Desde a introdução do transplante renal como modalidade terapêutica, a sobrevida do enxerto vem aumentando de maneira significativa (SALVATIERRA, 1997; CTS, 1999). Este fato é decorrente dos avanços na tipagem HLA (antígeno leucocitário humano), do teste de microlinfocitotoxicidade e da introdução de novos imunossupressores. Entretanto, perdas do enxerto ainda são motivos para preocupação no contexto do transplante renal.

A perda do enxerto é bifásica, sendo que cerca de 15 a 20% das perdas ocorrem no primeiro ano após o transplante e, posteriormente de maneira constante na proporção de três a cinco por cento ao ano (UNOS, 1999; RECOBRA, 1999). As perdas precoces se devem principalmente à rejeição aguda (CECKA, 1998). Já a nefropatia ou disfunção crônica do transplante (NPC Tx) é a causa mais freqüente de perda do enxerto, sendo responsável por 24 a 67% dos casos (BIA, 1995).

A patogenia da NPC Tx ainda não está totalmente esclarecida, sendo multifatorial. No entanto, fatores imunológicos, imunossupressão inadequada e tempo de isquemia do órgão (PAUL, 1995; TULLIUS; TILNEY, 1995; JOHNSON, *et al.*, 1999) apresentam importante papel em sua fisiopatologia (BIA, 1995). A determinação e prevenção desses fatores de risco podem contribuir para o aumento da sobrevida do enxerto.

A evolução no arsenal de drogas imunossupressoras tem proporcionado o uso racional dos fármacos, redução dos efeitos colaterais e otimização de resultados (HARDINGER; KOCH; BRENNAN, 2004; ALBERÚ; URREA, 2005; SAMANIEGO;

BECKER; DJAMALI, 2006). No entanto, sabe-se que algumas drogas imunossupressoras são tóxicas ao rim. As características histológicas da nefrotoxicidade induzida por estas drogas são fibrose intersticial intensa, geralmente em faixa, calcificação peritubular, hialinose arteriolar e glomerulosclerose focal (MCCAULEY, 1993). Estas alterações podem resultar em insuficiência renal crônica irreversível, em pacientes submetidos a transplante renal, de coração ou de fígado ou ainda, em indivíduos não transplantados tratados com estes medicamentos. Os mecanismos envolvidos são ação tóxica direta tubular, lesão vascular crônica e aumento da síntese de colágeno renal (KLINTMALM; GONWA, 1995).

O tempo de isquemia do rim transplantado merece destaque dentre os fatores de risco para o desenvolvimento da NPC Tx, com estudos demonstrando que um tempo maior de isquemia resulta em liberação de citocinas, alterações vasculares e glomerulares significativamente maiores, associados ao aumento do risco de rejeição crônica (BIA, 1995).

Há poucos estudos que avaliam o efeito simultâneo da nefrotoxicidade induzida por drogas e da isquemia e reperfusão na disfunção renal pós-transplante (NINOVA *et al.*, 2004). O modelo usado no presente experimento permite estudar os efeitos aditivos da isquemia e reperfusão e da imunossupressão, além de avaliar a relação desses fatores com a nefropatia do enxerto. Apresenta ainda a vantagem de excluir outros possíveis fatores de confusão, comuns em ensaios clínicos de transplantes de órgãos, como os efeitos da rejeição aguda e crônica.

## 1.1 OBJETIVOS

Avaliar as alterações histológicas renais e a função renal, através da aferição da uréia e da creatinina, em ratos com rim único submetidos à isquemia e reperfusão renal e à imunossupressão com tacrolimus e micofenolato mofetil.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 IMUNOSSUPRESSÃO

A imunossupressão clínica foi iniciada no começo dos anos 50 com o uso de glicocorticóides associado à azatioprina e/ou globulina antilinfocíticas que permaneceram como principais drogas imunossupressoras até o início dos anos 80, quando a ciclosporina foi introduzida no mercado norte americano. A partir dos anos 90, agentes químicos como tacrolimus, micofenolato mofetil e sirolimus passaram a ser utilizados em transplantes de órgãos (ABBUD FILHO; RAMALHO,1997).

A resposta imunológica contra um órgão transplantado é um processo dependente da célula T, que após encontrar-se com o antígeno pode apresentar diferentes respostas, tais como apoptose, anergia, ativação parcial e/ou total, com expansão clonal e proliferação de células efetoras governadas por diferentes citocinas (ABBUD FILHO, 1994; ABBUD FILHO; RAMALHO,1997). A seqüência que leva a ativação completa do linfócito T requer três sinais externos em receptores localizados em sua membrana celular. O primeiro sinal ocorre com o reconhecimento das moléculas HLA ou de seus peptídeos pelo receptor da célula T (TCR). Essa interação física ativa uma série de proteínas tirosinaquinases (TKs) que, por sua vez, ativam vias efetoras como a via da fosfolipase C (PLC), via do inositol trifosfato (IP-3), calcineurina e diacilglicerol (DAG) e proteinoquinase (PTK). Apenas o primeiro sinal não é suficiente, os receptores CD4 e CD8 também devem se acoplar ao TCR para completar a ligação. O segundo sinal ocorre através da interação de moléculas de adesão e seus respectivos encaixes (HALLORAN *et al.*, 1993; SUTHANTHIRAM; STROM, 1994).

Os dois primeiros sinais de transdução ligam os eventos da membrana citoplasmática aos eventos nucleares que acarretam ativação dos genes e produção de proteínas regulatórias (citocinas), as quais se ligam a seus receptores. Com a produção de citocinas, a célula T passa da fase G0 do ciclo celular para a sua fase ativada G1, mas não está pronta para prosseguir no ciclo (HALLORAN *et al.*, 1993).

Para que o linfócito T tenha condições de seguir o ciclo celular e se proliferar é necessário um terceiro sinal. Este ocorre quando as citocinas encaixam nos seus receptores e emitem sinais de transcrição para o núcleo, através das PTKs e/ou de fatores de transcrição. Esses sinais passam por uma proteína chamada MTOR

(Mammalian Target of Rapamycin) e ativam enzimas do tipo ciclinas E/CDK2 e D/CDK4 e a proteína retinoblastoma que são essenciais para a passagem das células da fase G1 para a fase S da síntese de DNA (HEICHMAN; ROBERTS, 1994; HALLORAN, 1996).

Embasados neste conhecimento, pode-se dividir as drogas imunossupressoras conforme seu local de ação e seus efeitos nos linfócitos em: 1. Drogas que afetam a estrutura da membrana celular (anticorpos policlonais e monoclonais); 2. Drogas que afetam a síntese das citocinas (glicocorticóides, ciclosporina, tacrolimus) ou bloqueiam sua ação (sirolimus); 3. Drogas que afetam a síntese de nucleotídeos (purinas como azatioprina e micofenolato mofetil; e pirimidinas, como brequinar) (ABBUD FILHO; RAMALHO, 1997).

As drogas imunossupressoras e os regimes de imunossupressão são empregados para evitar a rejeição auto-imune. Os melhores resultados, com maior impacto na rejeição foram observados após a introdução dos inibidores da calcineurina, inicialmente com a ciclosporina e posteriormente o tacrolimus como imunossupressor base. As chamadas terapias adjuvantes demonstraram uma redução ainda maior dos índices de rejeição aguda, com a azatioprina e mais recentemente com o micofenolato mofetil e o sirolimus (SAMPAIO *et al.*, 2008).

### 2.1.1 Tacrolimus

O tacrolimus (FK506 - Prograf) é um macrolídeo produzido pelo fungo *Streptomyces tsukubaensis* com potente atividade imunossupressora, 100 vezes maior que a ciclosporina *in vitro*. Atua inibindo as vias bioquímicas intracelulares dependentes do íon cálcio ( $Ca^{++}$ ) e de suas interações com o receptor citoplasmático, a proteína acopladora do tacrolimus. Inibe então os genes precoces de ativação das células T, bloqueando a expressão do RNA mensageiro de várias citocinas (ABBUD FILHO; RAMALHO, 1997). Pertence ao grupo dos inibidores da calcineurina, assim como a ciclosporina, e compõe a pedra fundamental da terapia imunossupressora *standart* (GASTON, 2006).

Os efeitos colaterais mais importantes são a hipertensão arterial, efeito diabetogênico, nefro e neurotoxicidade. É importante a monitorização sérica dessa droga, tanto para a confirmação da faixa terapêutica quanto para a exclusão da dose tóxica (WINKLER *et al.*, 1995).



### 2.1.2 Micofenolato mofetil

O micofenolato mofetil (MMF - Cellcept), produto do fungo *Penicillium*, originalmente isolado em 1886, impede a proliferação de linfócitos B por uma via inibitória da divisão celular. O principal objetivo para a adição de MMF aos regimes de imunossupressão é reduzir a frequência de rejeição aguda do enxerto renal, tendo sido aprovado pelo FDA para a prevenção de rejeição aguda em transplante renais, em junho de 1995 (MELE; HALLORAN, 2000).

O RS-61443 é a pró-droga semi-sintética éster morfolinoetil, também conhecida como MMF, que ativada por hidrólise transforma-se em ácido micofenólico (MPA). Após administração oral e absorção, a pró-droga é convertida para MPA que posteriormente é metabolizado no fígado para sua forma inativa. A regeneração da forma ativa MPA é feita pela enzima beta-glicuronidase que parece existir em concentrações elevadas em células ativadas T, B e macrófagos, que talvez, por essa razão, sejam bastante sensíveis à ação da droga (KAMAR, 2006).

A droga tem ação na redução da síntese de nucleotídeos, reduzindo a síntese de purinas. O MPA é um potente inibidor da enzima inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH), chave da via da biossíntese das purinas. A inibição na IMPDH bloqueia a síntese de nucleosídeos de guanossina, substratos para a síntese de DNA e RNA, reduzindo, assim, a proliferação celular. Os linfócitos T e B dependem predominantemente dessa via de síntese de purinas para sua proliferação. Desse modo, a ação do MMF resulta numa potente inibição da atividade linfocitária (NORONHA *et al.*, 1997).

O MMF apresenta efeitos colaterais diferentes daqueles dos inibidores da calcineurina. O maior efeito inclui toxicidade da medula óssea e intolerância gastrointestinal, apresentando menor nefro, neuro e hepatotoxicidade (ABBUD FILHO; RAMALHO, 1997).

### 2.1.3 Imunossupressão x transplante renal

No que é pertinente ao transplante renal, a evolução no arsenal de drogas tem proporcionado a utilização de distintos esquemas de imunossupressão, viabilizando

o uso racional das drogas, redução dos efeitos colaterais e otimização de resultados (HARDINGER; KOCH; BRENNAN, 2004; SAMANIEGO; BECKER; DJAMALI, 2006). Atualmente, os inibidores da calcineurina como o tacrolimus e a ciclosporina permanecem sendo os pilares da terapia de imunossupressão. Esses agentes são administrados associados a agentes antiproliferativos, tais como o MMF, sirolimus e azatioprina, com ou sem adição de corticóides.

A prática atual indica que o uso de tacrolimus associado ao MMF é considerado o padrão ouro na maioria dos programas de transplante dos Estados Unidos. Acredita-se que a associação de MMF com inibidores da calcineurina pode diminuir as taxas de rejeição em mais de 50% (GASTON, 2006).

## 2.2 DISFUNÇÃO RENAL PÓS-TRANSPLANTE

A NPC Tx é a maior causa de falha do transplante renal, não apresentando até o momento terapia efetiva (JAIN; BICKNELL; NICHOLSON, 2000). Esta doença apresenta-se clinicamente com deterioração lenta e progressiva da função renal, freqüentemente associada à hipertensão arterial sistêmica e proteinúria (PESTANA; RAMOS; AJZEN, 1992; PAUL, 1995,). Histologicamente caracteriza-se principalmente por estreitamento da luz vascular, secundária à proliferação miointimal, com conseqüente glomerulosclerose, atrofia tubular e fibrose intersticial, sendo que a presença e intensidade destes achados histológicos correlacionam-se com a sobrevida do enxerto (KASISKE, 1991).

### 2.2.1 Disfunção renal pós-transplante x nefrotoxicidade induzida por drogas

Independente do esquema terapêutico, as drogas imunossupressoras possuem efeitos adversos como nefrotoxicidade (NORVATIS PHARMACEUTICALS CORP, 2004; ASTELLAS PHARMA US, 2005), efeitos de ordem cardiovascular (KRÄMER, 2003), diabetes mellitus (KASISKE, 2003), efeitos cosméticos como hirsutismo, hiperplasia gengival, alopecia (NORVATIS PHARMACEUTICALS CORP, 2004; ASTELLAS PHARMA US, 2005) e alteração no processo de cicatrização de feridas (DEAN *et al.*, 2004; EKICI *et al.*, 2007). A nefrotoxicidade é um dos maiores obstáculos clínicos associado à imunossupressão com inibidores da calcineurina e frequentemente responsáveis pela descontinuação do tratamento (GASTON, 2006).

Embora estudos iniciais sugerissem uma nefrotoxicidade limitada do tacrolimus, estudos clínicos e em animais têm indicado efeitos potenciais a curto e longo prazo, com efeitos tóxicos tão acentuados quanto os da ciclosporina (BENNETT *et al.*, 1994; LLOBERAS *et al.*, 2008).

Um marcador precoce da nefrotoxicidade pelo tacrolimus é a vacuolização tubular. Por outro lado, a administração a longo prazo é associada a fibrose intersticial e a hialinose arteriolar, como descrito anteriormente para a ciclosporina (SHIHAB, 1997).

A falta de modelos animais para a avaliação da nefrotoxicidade crônica do tacrolimus tem dificultado e limitado o estudo de sua patogenia. Desta forma, o mecanismo exato do desenvolvimento das alterações histológicas causada pela nefrotoxicidade crônica dessa droga se mantém pouco entendida (SHIHAB, 1997).

#### 2.2.2 Disfunção renal pós-transplante x lesão por isquemia e reperfusão renal

A lesão por isquemia e reperfusão pode ser definida como um quadro de alterações derivadas da privação e reestabelecimento do suprimento sanguíneo à órgãos e tecidos. É um fenômeno complexo que envolve eventos intracelulares e uma resposta inflamatória importante (SILVA JR. *et al.*, 2002).

As conseqüências da isquemia, em diferentes tecidos, depende de sua duração, no entanto muitas das lesões são desenvolvidas durante o estágio de reoxigenação decorrente da reperfusão tecidual (SILVA JR. *et al.*, 2002) . A restauração do fluxo sanguíneo a um órgão isquêmico é essencial para prevenir dano celular, por outro lado a reperfusão de forma isolada pode agravar o dano celular isquêmico. Por exemplo, as alterações histológicas induzidas por três horas de isquemia intestinal, seguidas por uma hora de reperfusão, são mais graves do que as induzidas por quatro horas de isquemia intestinal isolada (SILVA JR. *et al.*, 2002).

Nos órgãos submetidos à isquemia, seguida de reperfusão, ocorre interação complexa entre alterações microvasculares, liberação de mediadores inflamatórios, radicais livres de oxigênio, ativação de neutrófilos, plaquetas, e células endoteliais. A ativação destas células pode levar à liberação de fator de necrose tumoral (TNF), leucotrienos, tromboxanos, prostaglandinas, endotelinas e fator de ativação plaquetária, causando danos à membrana celular, membrana mitocondrial interna e

endotélio com conseqüente distúrbios na microcirculação do órgão. Dependendo do tempo de isquemia e do momento da reperfusão, podem haver desde simples alterações bioquímicas até necrose celular (SILVA, JR. *et al.*, 2002).

As mitocôndrias são alvos importantes dos danos provocados pelos processos de isquemia e reperfusão. Dentro dessa organela há um decréscimo de NADH desidrogenase, do carreador de ADP/ATP e da atividade da ATP sintetase, além de um aumento da atividade da fosfolipase A2. Há também um acúmulo agudo de cálcio e da produção de radicais livres. A associação desses eventos pode provocar um fenômeno transitório de aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna e acarretar injúria e morte celular (SILVA, JR. *et al.*, 2002; MEYER, 2011).

Devido ao fato de as atividades metabólicas nos rins serem predominantemente aeróbicas, o córtex renal é extremamente sensível à isquemia. Imediatamente após à oclusão renal, adenosine trifosfato (ATP) começa a ser quebrado em nucleotídeos monofosfatos, promovendo energia para atividade celular. As fontes de energia rapidamente são depletadas em um ambiente anaeróbico, causando falhas nos mecanismos de transporte da membrana celular, acarretando em influxo de sal e água, e subsequente edema e morte celular (THOMPSON, 2010).

A lesão induzida por isquemia e reperfusão tem sido estudada como fator de risco para o desenvolvimento da disfunção renal pós-transplante. Yilmaz, Paavonen, e Hayry (2004) observaram que ratos submetidos a transplante com maior tempo de isquemia apresentaram alterações vasculares e glomerulares significativamente maiores que animais submetidos a transplante com menor tempo de isquemia. Observaram ainda que, a liberação de citocinas que acompanha a fase de recuperação da lesão isquêmica, pode iniciar cascata de eventos que levariam à rejeição crônica.

### 2.2.3 Efeitos aditivos da nefrotoxicidade por drogas e da lesão por isquemia e reperfusão renal x disfunção renal pós-transplante

Poucos estudos avaliaram o efeito específico da associação imunossupressão e lesão por isquemia e reperfusão renal. Ninova *et al.* (2004), em estudo experimental, verificaram um efeito aditivo da lesão por isquemia e reperfusão à

nefrotoxicidade por drogas. Nesse experimento, ratos submetidos à transplante renal isográficos e tratados com várias dosagens de tacrolimus e sirolimus apresentaram uma maior nefrotoxicidade quando comparados a animais uninefrectomizados não submetidos a transplante renal ou à isquemia e reperfusão renal e submetidos ao mesmo esquema medicamentoso.

### 3 MATERIAL E MÉTODO

A execução deste projeto foi aprovada em 10 de julho de 2009 pelo Comitê de Ética no uso de animais do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) (ANEXO 1). Foram observados os princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as exigências estabelecidas em “Guide for the care and use of experimental animals” (Canadian Council on Animal Care). Utilizou-se para a escrita, as normas para dissertações da UFPR (UFPR. Normas para apresentação de documentos científicos, 2007).

#### 3.1 POPULAÇÃO E AMOSTRA DA PESQUISA

Utilizaram-se 80 ratos albinos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*) procedentes do Biotério Central do Centro Politécnico da UFPR.

##### 3.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos neste estudo ratos machos, com idade média de oito semanas e peso entre 200 e 350 gramas, com bom aspecto geral, ativos e sem evidência de doença à inspeção.

#### 3.2 AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO

Os procedimentos experimentais foram realizados no setor de Anatomia Patológica do Centro Politécnico da UFPR. Os animais foram alocados em caixas de polipropileno, de dimensões padronizadas, com sepilho esterilizado (FIGURA 1). Foi respeitado o número máximo de dois ratos por caixa, sendo individualizados por uma divisória, mantendo, assim, acesso separado para água e alimentação. Os ratos foram mantidos durante todo o período de observação no biotério sob condições padronizadas de laboratório, com ciclo de 12 horas de claridade e 12 horas de escuridão em temperatura entre 20°C e 24°C. Os ratos foram alimentados com ração própria para a espécie (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes S/A, Colombo,

PR, Brasil) e tiveram livre acesso à água durante todo o experimento.

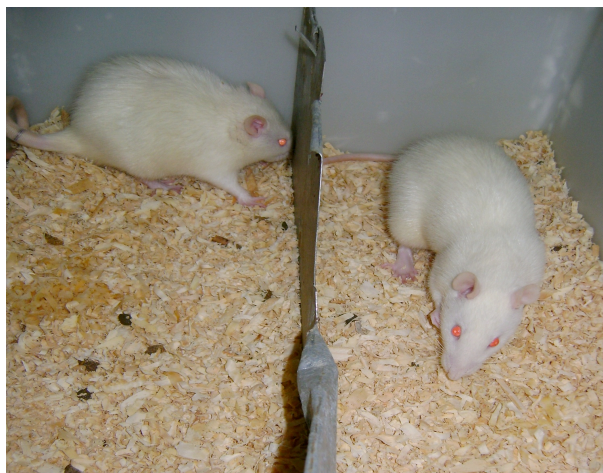


FIGURA 1 - RATOS WISTAR  
FONTE: O AUTOR (2014)

### 3.3 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Foram utilizados 80 ratos machos da raça Wistar, os quais foram divididos aleatoriamente em oito grupos de 10 animais. Ocorreram três óbitos no ato cirúrgico, restando 77 ratos no experimento (QUADRO 1). Um dos grupos denominado Controle (C) não foi operado. Os sete grupos restantes foram operados, seguindo técnica asséptica.

GRUPOS	N	PROCEDIMENTO	MEDICAMENTOS
Controle (C)	10	Não submetido à cirurgia	SF
SHAM	8	Cirurgia	SF
T1	10	Cirurgia	Tacrolimus 1mg/kg/dia
T2	10	Cirurgia	Tacrolimus 0,1mg/kg/dia
T3	9	Cirurgia	Tacrolimus 10mg/kg/dia
M1	10	Cirurgia	MMF 20mg/kg/dia
MT1	10	Cirurgia	MMF 20mg/kg/dia + tacrolimus 1mg/kg/dia
MT2	10	Cirurgia	MMF 20mg/kg/dia + tacrolimus 0,5mg/kg/dia

QUADRO 1 – GRUPOS;

FONTE: O AUTOR (2014)

C: Controle ; SHAM: Simulação; T1: Grupo I; T2: Grupo II; T3: Grupo III; M1: Grupo IV; MT1: Grupo V; MT2: Grupo VI; N: Número de animais; Cirurgia: Laparotomia + nefrectomia direita + isquemia renal esquerda por 20 minutos; SF: Solução fisiológica 0,9%; MMF Micofenolato mofetil

### 3.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

#### 3.4.1 Ato anestésico

Os animais foram mantidos em jejum de oito horas. No início do experimento, todos os ratos foram pesados em balança eletrônica de alta precisão (Ohaus Precision Standard – modelo TS-2KS, Bradford, Inglaterra).

Cerca de 30 minutos antes do procedimento, utilizou-se diazepam intramuscular como pré-anestésico, na dose de 5mg/kg. A anestesia foi obtida com injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina 90mg/kg (Cetamin® - Syntec do Brasil) e xilazina 10mg/kg (Xilazin® - Syntec do Brasil) (Biotério de produção e experimentação da USP, 2010) (FIGURA 2).



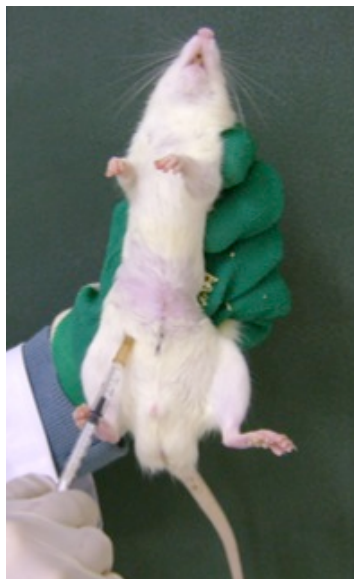


FIGURA 2 - TÉCNICA DE ANESTESIA INTRA-PERITONEAL:  
cloridrato de quetamina 90mg/kg (Cetamin® - Syntec do Brasil)  
e xilazina 10mg/kg (Xilazin® - Syntec do Brasil)  
FONTE: O AUTOR (2014)

### 3.4.2 Preparo e posicionamento dos ratos

Os ratos foram submetidos à tricotomia abdominal e posicionados em decúbito dorsal horizontal numa tábua cirúrgica, com os quatro membros fixos com fita adesiva (FIGURA 3A). Assepsia e antisepsia foram realizadas com solução de polivinilpirrolidona-iodo a 10% e colocação de campo operatório fenestrado estéril (FIGURA 3B).

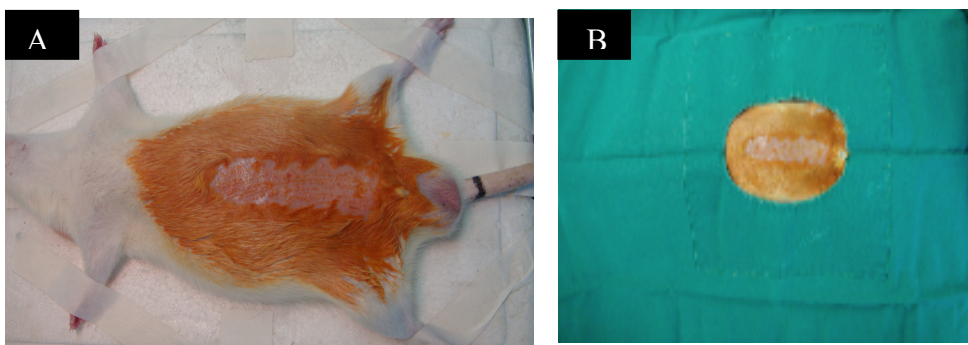


FIGURA 3 – POSICIONAMENTO DOS RATOS  
FONTE: O AUTOR (2014)

### 3.4.3 Técnica cirúrgica

O procedimento consistiu em laparotomia mediana (FIGURA 4), dissecação do rim direito e ligadura dos vasos renais e ureter direito com fio de algodão 4-0, seguido de nefrectomia direita (FIGURA 5).

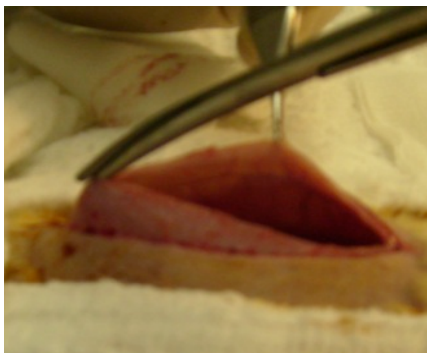


FIGURA 4 - LAPAROTOMIA MEDIANA  
FONTE: O AUTOR (2014)

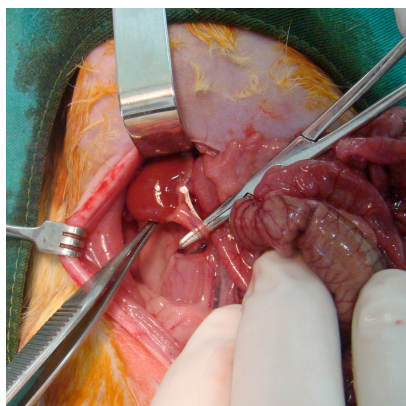


FIGURA 5 - NEFRECTOMIA DIREITA:  
FONTE: O AUTOR (2014)

Posteriormente foi realizada dissecação do pedículo vascular do rim esquerdo remanescente e clampeamento do mesmo utilizando-se de clamp vascular, permanecendo este órgão em isquemia quente por período de 20 minutos (FIGURA 6). Em seguida, o clamp era retirado, ocorrendo a reperfusão renal.

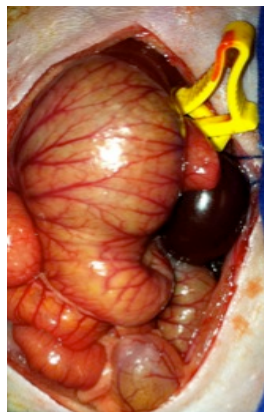


FIGURA 6 - CLAMPEAMENTO RENAL À ESQUERDA:  
dissecção do pedículo vascular do rim esquerdo e clampeamento  
utilizando-se de clamp vascular, por período de 20 minutos  
FONTE: O AUTOR (2014)

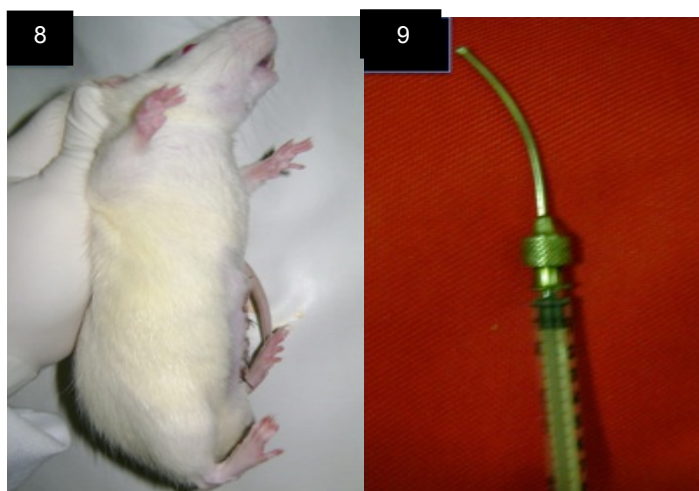
Por fim, foi realizado fechamento da parede abdominal por planos, sendo aponeurose com sutura contínua de fio de nylon 3-0 e pele com sutura contínua de fio de nylon 3-0 (FIGURA 7).



FIGURA 7 - SUTURA DE PAREDE ABDOMINAL  
FONTE: O AUTOR (2014)

#### 3.4.4 Pós-operatório

Todos os animais receberam no primeiro dia de pós-operatório medicação analgésica (dipirona) intramuscular associada à hidratação diária. Cada grupo recebeu, diariamente, um tipo de solução via gavagem, com técnica e sonda de calibre adequados (MAAHS, 2008; ONO, 2009) (FIGURAS 8, 9 e 10).



FIGURAS 8 - TÉCNICA DA PEGA DO ANIMAL;  
FIGURA9 - SONDA DE GAVAGEM  
FONTE: O AUTOR (2014)



FIGURA 10 - TÉCNICA DE GAVAGEM  
FONTE: O AUTOR (2014)

Os animais do grupo Controle e SHAM receberam SF 0,9%. O GRUPO I (T1) recebeu tacrolimus (Prograf®, Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda.) diluído em SF 0,9% na dose de 1 mg/Kg/dia. O GRUPO II (T2) recebeu tacrolimus diluído em SF 0,9% na dose de 0,1 mg/Kg/dia. O GRUPO III (T3) recebeu tacrolimus diluído em SF 0,9% na dose de 10 mg/Kg/dia. A diluição foi feita no momento da administração devido à molécula do tacrolimus permanecer estável por apenas 24 horas quando diluída em SF 0,9%. O GRUPO IV (M1) recebeu MMF (CellCept®, Genentech Roche Groupe), diluído em SF 0,9% na dose de 20 mg/Kg/dia. O GRUPO V (MT1) recebeu MMF diluído em SF 0,9% na dose de 20 mg/Kg/dia + tacrolimus diluído em

SF 0,9% na dose de 1 mg/Kg/dia. O GRUPO VI (MT2) recebeu MMF diluído em SF 0,9% na dose de 20 mg/Kg/dia + tacrolimus diluído em SF 0,9% na dose de 0,5 mg/Kg/dia.

Foram mantidos confinados sob cuidados e então sacrificados no 14<sup>o</sup> dia de experimento, contando como dia zero o dia da cirurgia.

### 3.5 COLETA DE AMOSTRAS

No momento da eutanásia, utilizou-se anestesia profunda com associação de xilazina (10mg/kg) e ketamina (90mg/kg). O animal foi fixado em tábua cirúrgica com fita adesiva e submetido a antissepsia abdominal e torácica. Foi realizado toracotomia mediana e punção cardíaca com agulha 25x8mm, para retirada de amostra de sangue e indução de parada cardio-respiratória por exsanguinação. O sangue coletado foi armazenado em dois frascos, coletando-se cerca de três a quatro mililitros em cada frasco; um frasco foi preparado com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para a dosagem de tacrolimus e outro frasco para dosagens bioquímicas. Em seguida os frascos foram encaminhados ao laboratório de apoio.

Imediatamente após a coleta de sangue, foi realizada nova laparotomia mediana com nefrectomia esquerda e preparação do órgão. Para análise histológica, o órgão foi bipartido longitudinalmente e acondicionado em cassete e em solução de formalina a 10%.

### 3.6 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

#### 3.6.1 Análises bioquímicas

As amostras de sangue foram então analisadas em laboratório de análises clínicas. Os seguintes métodos e unidades foram utilizados:

Dosagem de tacrolimus, pelo método de quimioluminescência (GEISELER; JAMES, 1992). O aparelho utilizado foi Architect I2000, marca Abbott, sendo a unidade de medida nanogramas/ml;

Dosagem de uréia e creatinina, pelo método enzimático colorimétrico (SODRÉ *et al.*, 2007). O aparelho utilizado foi Vitros Versão 5.1 FS, marca Johnson e Johnson, sendo unidade de medida miligramas/dl.

### 3.6.2 Análises histológicas

O rim acondicionado em cassete e embebido em formalina 10% foi submetido à lavagem, diafanização e inclusão em parafina. Após, foram emblocados e submetidos a cortes sucessivos em micrótomo com 4 $\mu$ m de espessura (American Optical, Spencer AO 820). Para obter cortes aleatórios e uniformemente isotrópicos (cortes AUI) foi utilizado o método do *Orientator*. Os cortes foram obtidos a partir da aplicação da técnica aleatória Ortotrip. Posteriormente, as lâminas histológicas foram montadas com quatro cortes de cada amostragem para a execução das técnicas histoquímicas de hematoxilina & eosina (HE), tricrômico de Masson e ácido periódico de Schiff (PAS).

#### COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA & EOSINA (HE):

Para coloração de HE foi utilizado o protocolo clássico com algumas adaptações. As lâminas foram colocadas, por um minuto, em solução de hematoxilina de Harris. Em seguida, foram lavadas em água corrente por 10 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada duas vezes consecutivas. Em seguida, foram impregnadas com eosina-floxina por 45 segundos. Esse material foi imediatamente lavado com água destilada para em seguida serem desparafinado, desidratado e montado (JUNQUEIRA, L.C.; JUNQUEIRA, L.M.M.S, 1983; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

#### COLORAÇÃO DE TRICRÔMICO DE MASSON:

As lâminas histológicas foram coradas, por dois minutos, com hematoxilina de Harris. Em seguida, foram lavadas em água corrente por 10 minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada por duas vezes e em seguida coradas através da fucsina ácida de Ponceau durante um minuto. Posteriormente, as lâminas permaneceram por três minutos em ácido fosfomolibdico. Em seguida as lâminas

ficaram por um minuto em água acética e álcool acético por mais um minuto. Por fim, as lâminas foram desparafinadas e desidratadas em soluções decrescentes de álcoois a partir de 95% até chegar a 10% e montadas (JUNQUEIRA, L.C.; JUNQUEIRA, L.M.M.S, 1983; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

#### COLORAÇÃO ÁCIDO PERIÓDICO DE SCHIFF (PAS):

As lâminas histológicas foram coradas com ácido periódico 0,5% por 15 minutos. Em seguida, foram lavadas em água corrente por cinco minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada por três vezes e, então, coradas através do reativo de Schiff por 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris por cinco segundos e lavadas em água corrente por cinco minutos. Em seguida as lâminas foram desidratadas e montadas em resina (JUNQUEIRA, L.C.; JUNQUEIRA, L.M.M.S, 1983; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

A análise e a interpretação anatomopatológica foram realizadas por microscopia ótica comum, de forma cega pelo patologista, sem conhecimento prévio dos grupos em estudo. O estudo dos parâmetros histológicos foi efetuado por meio de microscopia ótica com auxílio do microscópio Nikon Eclipse E400 (Nikon, Tóquio, Japão). As amostras foram examinadas em aumentos variáveis, de 40 a 200 vezes, em um total de dez campos de grande aumento.

##### 3.6.2.1 Critérios histológicos

Os achados histológicos foram pesquisados em categorias de acordo com a fisiopatologia e local da lesão (ARIAS *et al.*, 2007).

1. Necrose tubular aguda (NTA): Resultado da isquemia é caracterizada pela perda do bordo estriado, necrose coagulativa, apoptose, basofilia citoplasmática, núcleos regenerativos aumentados em volume e interstício expandido com edema. Pode haver infiltrado mononuclear intersticial sem tubulite;

2. Toxicidade tubular aguda (TTA). A toxicidade tubular é caracterizada pela vacuolização do citoplasma dos túbulos proximais. A vacuolização é chamada isométrica, pois produz vacúolos de tamanho semelhante. Pode ser achado focal, acometendo apenas pequeno número de túbulos em uma biópsia. Os núcleos podem ser irregulares;
3. Toxicidade vascular aguda (TVA). Afeta as artérias interlobulares, arteríolas e glomérulos capilares. Há trombose fibrinóide das pequenas artérias, arteríolas e capilares, as vezes com necrose de miócitos. Pode haver mesangiólise, edema endotelial e necrose com eritrócitos dismórficos no tufo glomerular. Edema mucóide intimal pode ser visto nas artérias interlobulares. Nesta categoria foi pesquisado a trombose arteriolar (TA), trombose glomerular (TG) e edema intimal (EI);
4. Toxicidade crônica (TC). A toxicidade crônica acomete compartimentos vascular, túbulo-intersticial e glomerular. As lesões vasculares são caracterizadas pela arteriopatía hialina. As lesões túbulo-intersticiais são representadas por áreas lineares de atrofia tubular e fibrose intersticial. As áreas de fibrose correspondem aos raios medulares, área vulnerável a lesão isquêmica. Pode haver infiltrado intersticial linfocitário, porém, sem tubulite. Nas lesões glomerulares pode ser evidenciado a glomerulosclerose focal e segmentar com hipertrofia dos néfrons remanescentes. Nesta categoria foi pesquisado a arteriopatía hialina (AH), atrofia tubular (AT), fibrose intersticial (FI), hipertrofia glomerular (HG) e esclerose glomerular (EG);
5. Outros achados menos específicos pesquisados foram o infiltrado inflamatório (II) e cilindros hialinos (CI).

Em cada categoria os achados histológicos foram graduados de forma semi-quantitativamente. As variáveis foram classificadas em ausente, discreto, moderado e acentuado de acordo com a intensidade em que foram encontradas; e transformadas em variáveis quantitativas através da atribuição de índice numérico aos achados histológicos. Os possíveis valores e variáveis são melhor demonstrados no QUADRO 2.



QUADRO 2	INTENSIDADE DOS ACHADOS HISTOLÓGICOS			
VARIÁVEIS HISTOLÓGICAS	AUSENTE	DISCRETO	MODERADO	ACENTUADO
	NTA	0	1	2
VC	0	1	2	3
TA	0	1	2	3
TG	0	1	2	3
EI	0	1	2	3
AH	0	1	2	3
AT	0	1	2	3
FI	0	1	2	3
EG	0	1	2	3
HG	0	1	2	3
II	0	1	2	3
CH	0	1	2	3

QUADRO 2 - GRADUAÇÃO DOS ACHADOS HISTOLÓGICOS - NTA: Necrose Tubular Aguda; VC: Vacuolização Citoplasmática; TA: Trombose Arteriolar; TG: Trombose Glomerular; EI: Edema Intimal; AH: Arteriolopatia Hialina; AT: Atrofia Tubular; FI: Fibrose Intersticial; EG: Esclerose Glomerular; HG: Hipertrofia Glomerular; II: Infiltrado Inflamatório; CH: Cilindros Hialinos

Após a atribuição do índice numérico aos achados histológicos, foi realizado a média dos índices de cada grupo, encontrando dessa forma o escore histológico, o qual foi utilizado para comparação entre os grupos.

### 3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os valores séricos de tacrolimus, creatinina e uréia foram analisados separadamente, sendo realizado as médias, desvios padrão e medianas de cada grupo. Para comparação dos valores de tacrolimus sérico e uréia utilizou-se o teste *t de Student*). Para a análise dos valores de creatinina utilizou-se o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* (os grupos SHAM e T1 não apresentaram distribuição normal).

As alterações histológicas foram analisadas utilizando o escore histológico. Para comparação entre os grupos foi utilizado o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*, com alfa 5% (significância  $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

Não houve diferença no tempo cirúrgico e no peso médio dos ratos entre os grupos do estudo. O peso médio dos 80 ratos, no início do experimento, foi de  $294,1\text{g} \pm 26,0\text{g}$ , variando de 238g a 350g.

Três ratos morreram durante o procedimento operatório, sendo excluídos do estudo. Nenhum rato apresentou complicações ou morreu durante o período de observação pós-cirúrgica. Todos os ratos foram mantidos sob os mesmos cuidados durante o período de tempo pré-determinado.

### 4.1 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As amostras de sangue apresentaram quantidade suficiente para as análises em todos os ratos, não havendo perda de amostras durante o processamento do material.

#### 4.1.1 Dosagem de tacrolimus

Houve presença de tacrolimus nas dosagens séricas de todos os grupos que receberam a droga, o que comprova que houve absorção do medicamento administrado. Os valores de tacrolimus demonstraram que a administração de diferentes doses produziu níveis séricos diferentes entre os grupos.

Nos grupos SHAM e controle, não foram detectados níveis séricos da droga. No grupo T1, a média de valores séricos de tacrolimus foi  $0,490 \pm 0,23$  ng/dl. No grupo T2, a média foi de  $0,34 \pm 0,22$  ng/dl. No grupo T3 a média foi  $2,35 \pm 0,67$  ng/dl. No grupo MT1, a média foi  $0,39 \pm 0,20$  ng/dl. No grupo MT2, a média foi  $0,24 \pm 0,14$  ng/dl.

Os níveis séricos de tacrolimus apresentaram valores maiores conforme a dose administrada. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos níveis de tacrolimus sérico do grupo T3 quando comparado aos demais grupos. Apesar de haver diferença nos níveis séricos de tacrolimus entre os grupos T1 e T2 ( $p = 0,084$ ), a diferença não foi significativa (GRÁFICO 1). A associação com MMF não alterou a absorção individual da droga, sendo mantido nível sérico semelhante à

administração isolada. Os grupos MT1 e MT2 apresentaram níveis séricos de tacrolimus estatisticamente similares aos grupos T1 e T2.

Os valores individuais de cada rato estão apresentados no APÊNDICE 1.

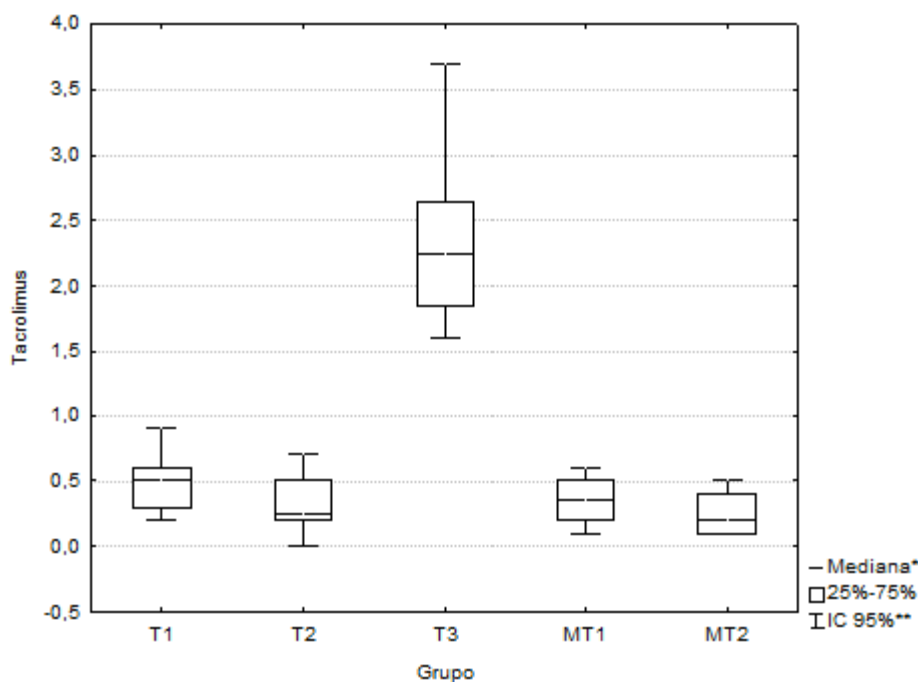


GRÁFICO 1 – MEDIANA E DESVIOS PADRÃO DAS DOSAGENS SÉRICAS DE TACROLIMUS (NG/ML)

Controle (não submetido à cirurgia ou ao uso de drogas); SHAM (submetido à cirurgia, sem uso de drogas imunossupressoras). T1 (cirurgia + tacrolimus 1mg/kg/dia); T2 (cirurgia + tacrolimus 0,1mg/kg/dia); T3 (cirurgia + tacrolimus 10mg/kg/dia); MT1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 1mg/kg/dia); MT2 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 0,5mg/kg/dia). Os grupos controle e SHAM não apresentaram níveis séricos de tacrolimus

#### 4.1.2 Dosagem de uréia

As dosagens de uréia apresentaram as seguintes médias nos grupos: Controle:  $44,90 \pm 2,85$  mg/dl; SHAM:  $53,75 \pm 4,71$  mg/dl; T1:  $72,60 \pm 6,28$  mg/dl; T2:  $71,00 \pm 7,07$  mg/dl; T3:  $94,88 \pm 10,63$  mg/dl; M1:  $58,10 \pm 7,14$  mg/dl; MT1:  $66,60 \pm 5,97$  mg/dl e MT2:  $61,50 \pm 9,96$  mg/dl (GRÁFICO 2). Os valores individuais de cada rato estão apresentados no APÊNDICE 2.

O grupo SHAM apresentou níveis séricos de uréia significativamente maiores que o grupo controle ( $p < 0,05$ ). Da mesma forma, a administração de fármacos elevou significativamente os níveis de uréia quando comparados com os grupos

controle e SHAM, exceto o grupo M1, que não apresentou diferença estatística quando comparado ao SHAM (M1xSHAM:  $p=0,19$ ).

O grupo T3 apresentou incremento significativo da uréia quando comparado com todos os demais grupos ( $p<0,05$ ). Por outro lado, a comparação entre T1 e T2 não apresentou diferença significativa ( $p>0,05$ ).

O grupo em que foi utilizado MMF de forma isolada apresentou significativamente menor taxa de elevação de uréia quando comparado a todos os grupos em que foi utilizado tacrolimus, exceto o grupo MT2 (metade da dose habitual de tacrolimus) (MxMT2:  $p=0,28$ )

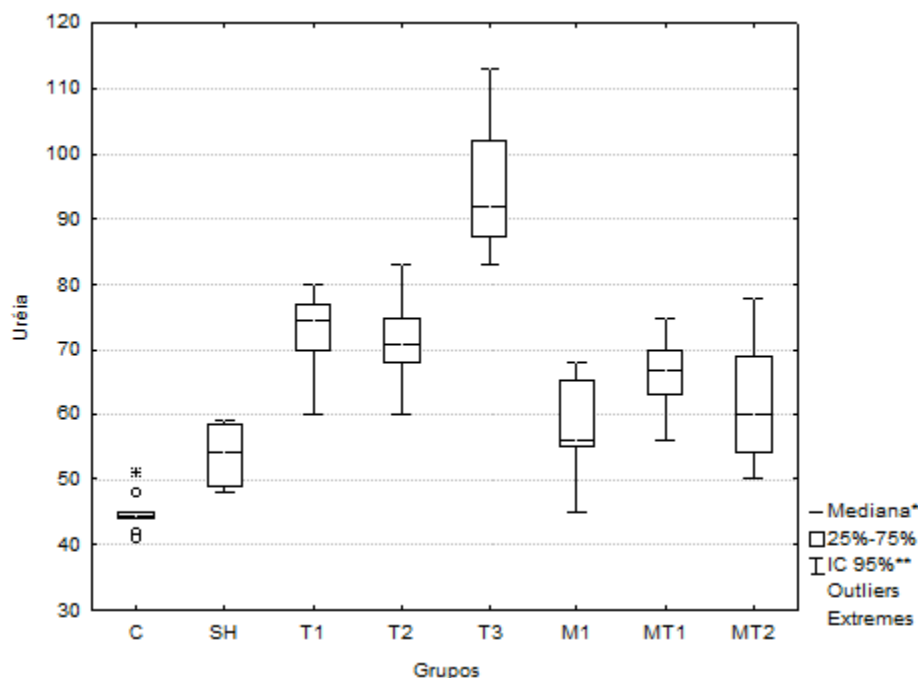


GRÁFICO 2 – MEDIANA E DESVIOS PADRÃO DAS DOSAGENS SÉRICAS DE URÉIA (MG/DL)

Controle (não submetido à cirurgia ou ao uso de drogas); SH: SHAM (submetido à cirurgia, sem uso de drogas imunossupressoras); T1 (cirurgia + tacrolimus 1mg/kg/dia); T2 (cirurgia + tacrolimus 0,1mg/kg/dia); T3 (cirurgia + tacrolimus 10mg/kg/dia); M1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/Kg/dia); MT1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 1mg/kg/dia); MT2 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 0,5mg/kg/dia)

#### 4.1.3 Dosagem de creatinina

As dosagens de creatinina apresentaram as seguintes médias nos grupos:

Controle:  $0,42\pm 0,14$  mg/dl; SHAM:  $0,41\pm 0,04$  mg/dl; T1:  $0,37\pm 0,05$  mg/dl; T2:  $0,34\pm 0,05$  mg/dl; T3:  $0,50\pm 0,05$  mg/dl; M1:  $0,55\pm 0,12$  mg/dl; MT1:  $0,59\pm 0,14$  mg/dl;

MT2:  $0,58 \pm 0,13$  mg/dl (GRÁFICO 3). Os valores individuais de cada rato estão apresentados no APÊNDICE 3.

Não houve diferença estatística quando comparados os grupos controle, SHAM, T1 e T2 entre si. No entanto, houve diferença significativa quando se comparou os valores de creatinina do grupo T3 com os grupos controle, SHAM, T1 e T2.

Os grupos em que foram utilizado MMF ou a associação MMF com tacrolimus, apresentaram níveis séricos de creatinina significativamente maiores quando comparados com todos os demais grupos, exceto com o grupo T3, em que foi utilizado dose maior de tacrolimus ( $p > 0,05$ ).

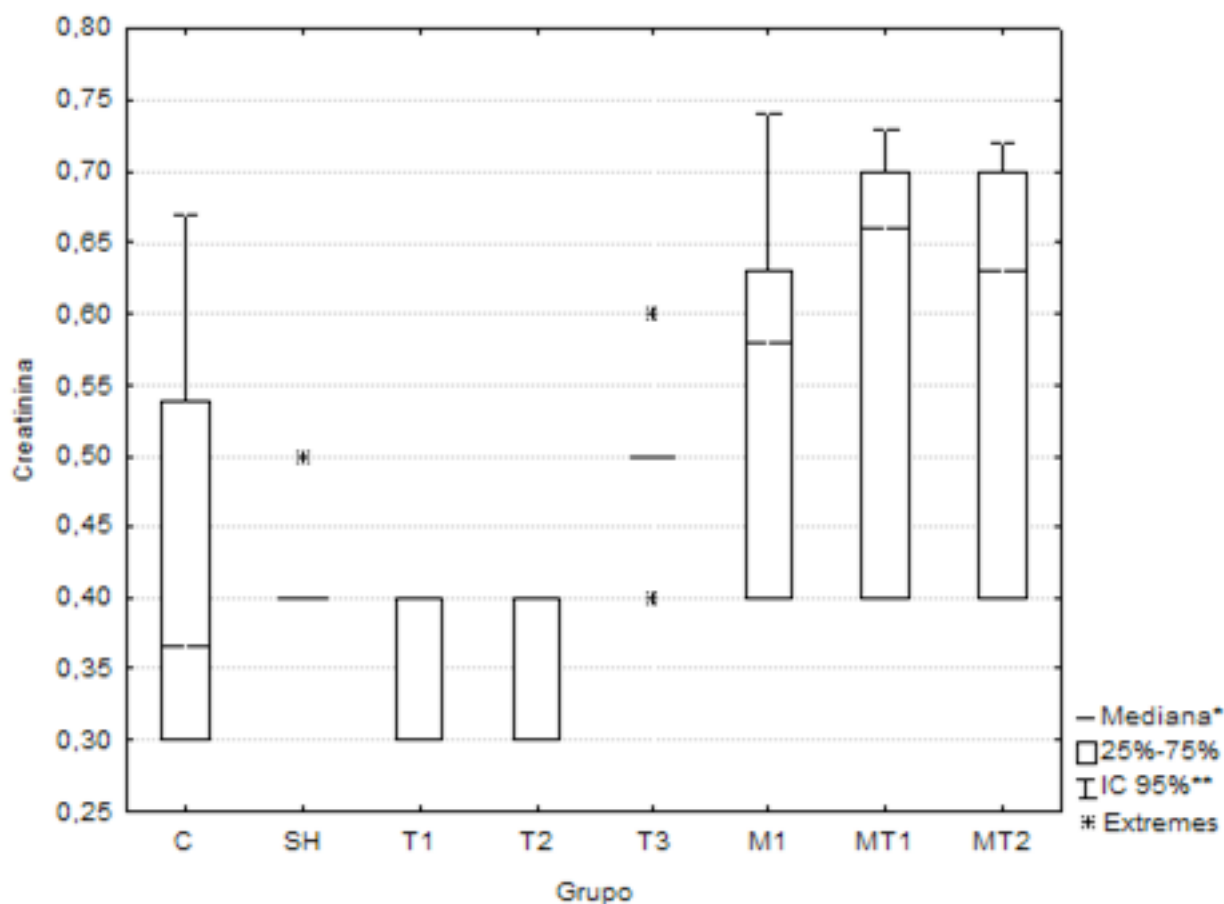


GRÁFICO 3 – MEDIANA E DESVIOS PADRÃO DAS DOSAGENS SÉRICAS DE CREATININA (MG/DL)

Controle (não submetido à cirurgia ou ao uso de drogas); SH: SHAM (submetido à cirurgia, sem uso de drogas imunossupressoras); T1 (cirurgia + tacrolimus 1mg/kg/dia); T2 (cirurgia + tacrolimus 0,1mg/kg/dia); T3 (cirurgia + tacrolimus 10mg/kg/dia); M1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/Kg/dia); MT1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 1mg/kg/dia); MT2 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 0,5mg/kg/dia)

## 4.2 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

As graduações histológicas individuais de cada rato encontram-se nos APÊNDICES 4 a 11.

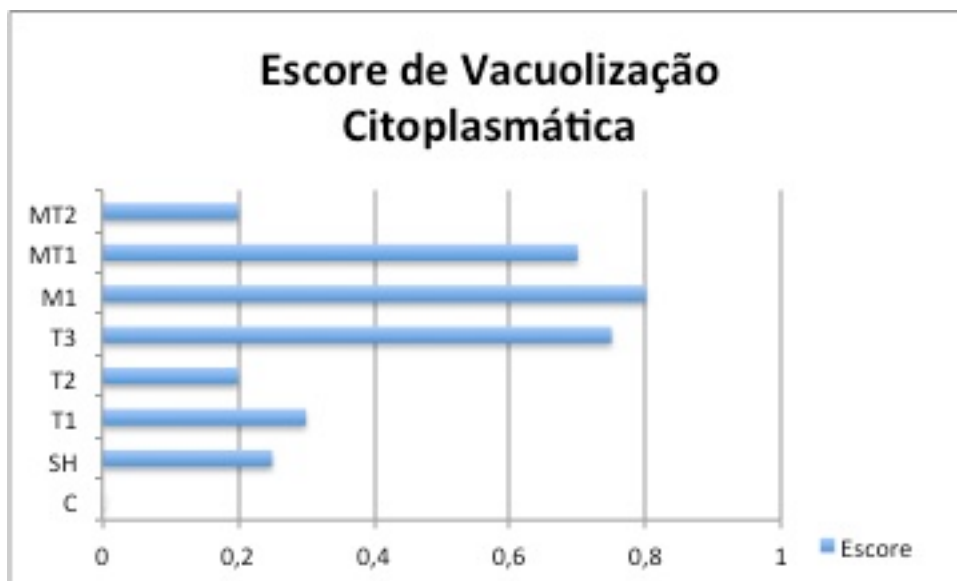
### 4.2.1 Lesão por isquemia (NTA)

Não foi evidenciado qualquer alteração sugestiva de necrose tubular aguda (NTA).

### 4.2.2 Toxicidade tubular aguda (TTA)

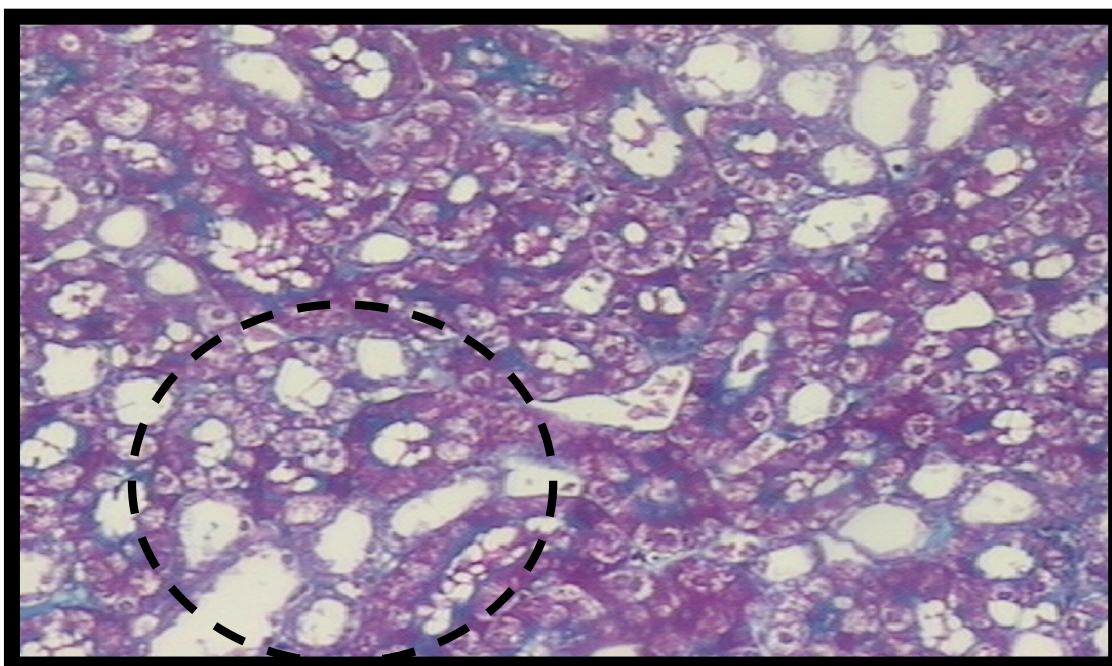
Analisando a vacuolização citoplasmática dos túbulos proximais (FIGURAS 11 e 12), foi evidenciado que, no grupo SHAM, dois ratos apresentaram discreta vacuolização (escore de 0,25), não sendo estatisticamente diferente do grupo controle, o qual não apresentou nenhuma alteração. Da mesma forma, apesar de apresentar variância, não foram evidenciadas alterações significativas quando comparados os grupos T1 e T2 entre si, ou com o grupo controle e SHAM. Já no grupo T3, houve diferença estatística quando comparado ao controle ( $p=0,003$ ) e tendência à significância quando comparado ao SHAM ( $p=0,056$ ).

O MMF, quando administrado isoladamente, apresentou o maior escore para vacuolização citoplasmática (0,8) (GRÁFICO 4), apresentando diferença estatística quando comparado com o grupo controle e com o grupo SHAM. Já o grupo MT1, apesar de ser estatisticamente diferente do grupo controle, não apresentou diferença quando comparado ao grupo SHAM ( $p=0,06$ ). O grupo MT2 apresentou escore baixo (0,20), bastante similar ao grupo SHAM ( $p=0,83$ ) e ao grupo controle (APÊNDICE 12).



**GRÁFICO 4 – ESCORE DE VACUOLIZAÇÃO CITOPLASMÁTICA**

Escore: média da intensidade do achado histológico (0-ausente; 1-discreto; 2-moderado; 3-acentuado); Controle (não submetido à cirurgia ou ao uso de drogas); SH: SHAM (submetido à cirurgia, sem uso de drogas imunossupressoras); T1 (cirurgia + tacrolimus 1mg/kg/dia); T2 (cirurgia + tacrolimus 0,1mg/kg/dia); T3 (cirurgia + tacrolimus 10mg/kg/dia); M1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/Kg/dia); MT1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 1mg/kg/dia); MT2 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 0,5mg/kg/dia)



**FIGURA 11- VACUOLIZAÇÃO CITOPLASMÁTICA: MICROSCOPIA ÓTICA: AUMENTO DE 40X – TRICRÔMICO DE MASSON; RATO 8 , GRUPO III**



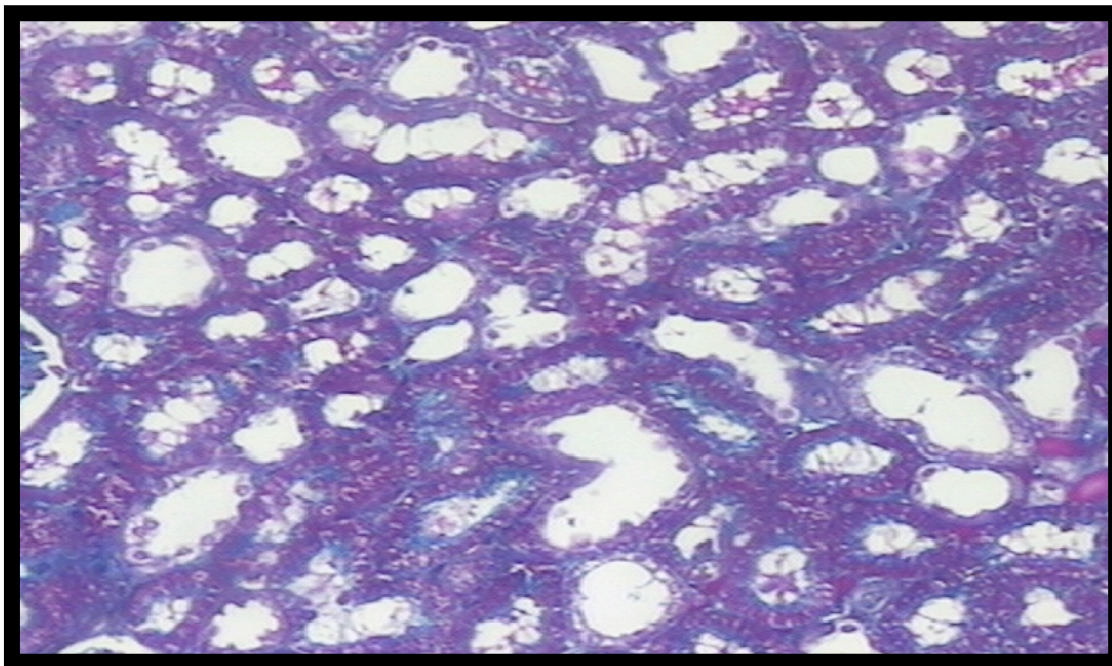


FIGURA 12- VACUOLIZAÇÃO CITOPLASMÁTICA: MICROSCOPIA ÓTICA: AUMENTO DE 100X – TRICRÔMICO DE MASSON; RATO 8 , GRUPO III

#### 4.2.3 Toxicidade vascular aguda (TVA)

Analisando trombose arteriolar, trombose glomerular e edema intimal, foi evidenciada apenas discreta trombose glomerular em um rato do grupo T1. Não havendo, portanto, qualquer diferença estatística entre os grupos (APÊNDICE 13).

#### 4.2.4 Toxicidade crônica (TC)

Foi evidenciada fibrose intersticial (FIGURA 13) em ratos dos grupos T1,T2,T3, M1 e MT2 (GRÁFICO 5), no entanto estes achados foram discretos e não apresentaram diferença estatística entre os grupos ( $p=0,43$ ) (APÊNDICE 14).

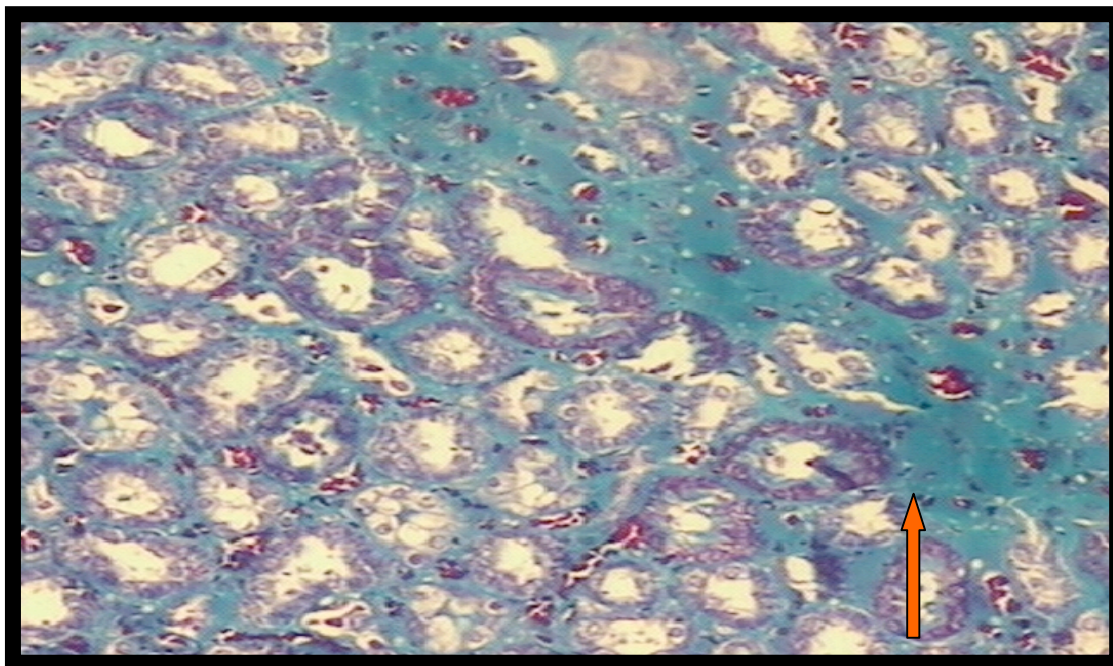


FIGURA 13 - FIBROSE INTERSTICIAL – MICROSCOPIA ÓPTICA: AUMENTO DE 100X – COLORAÇÃO DE TRICRÔMICO DE MASSON. RATO 6 DO GRUPO I. O TECIDO CONJUNTIVO APARECE EM VERDE

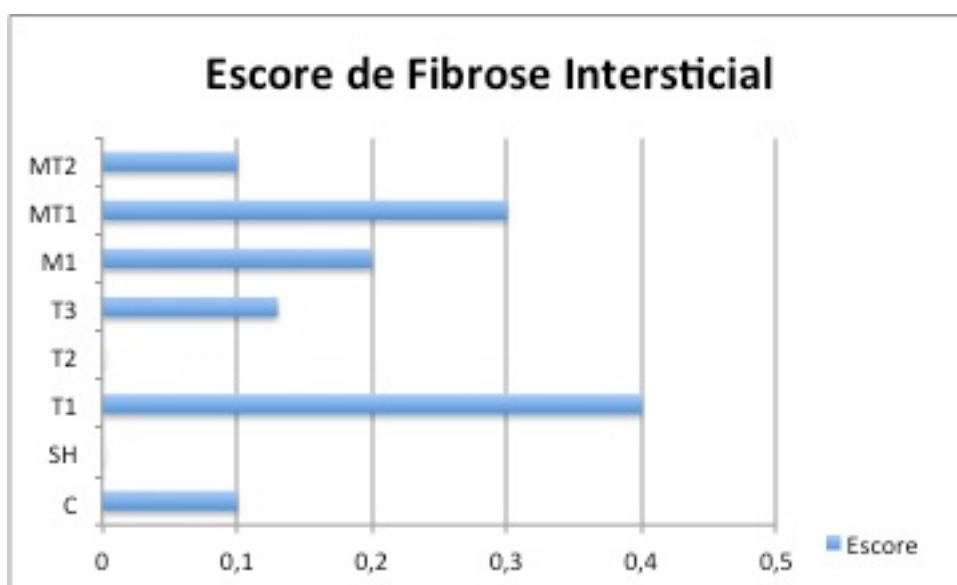


GRÁFICO 5 – ESCORE DE FIBROSE INTERSTICIAL

Escore: média da intensidade do achado histológico (0-ausente; 1-discreto; 2-moderado; 3-acentuado); Controle (não submetido à cirurgia ou ao uso de drogas); SH: SHAM (submetido à cirurgia, sem uso de drogas imunossupressoras); T1 (cirurgia + tacrolimus 1mg/kg/dia); T2 (cirurgia + tacrolimus 0,1mg/kg/dia); T3 (cirurgia + tacrolimus 10mg/kg/dia); M1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/Kg/dia); MT1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 1mg/kg/dia); MT2 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 0,5mg/kg/dia)

Ao analisar arteriopatía, esclerose glomerular e hipertrofia glomerular, nenhuma alteração foi evidenciada. Não apresentando qualquer variação entre os grupos.

Discreta atrofia tubular foi evidenciada em ratos do grupo T1, T3 e MT1 (GRÁFICO 6). Apesar de variância entre os grupos, não foi evidenciada diferença estatística entre os mesmos (APÊNDICE 15).

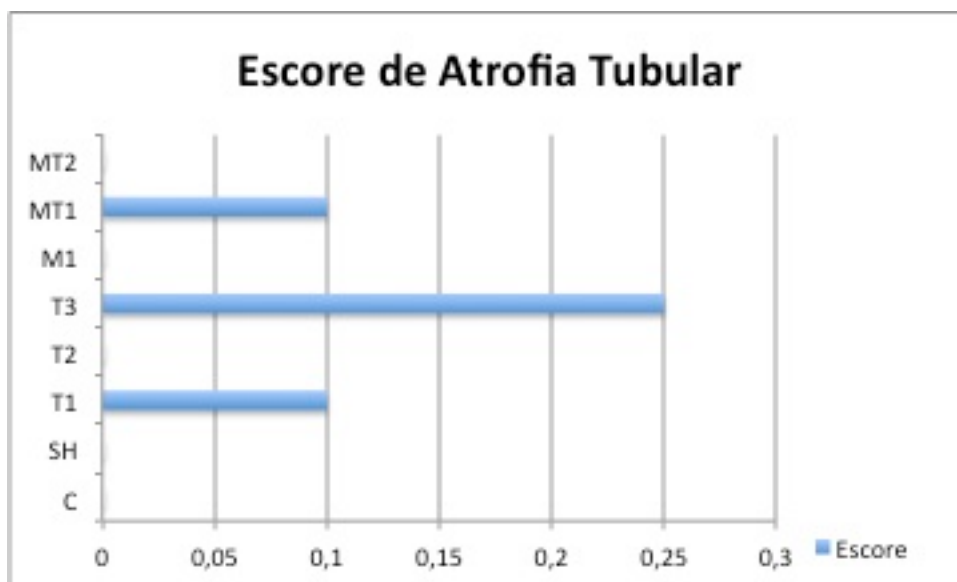


GRÁFICO 6 – ESCORE DE ATROFIA TUBULAR

Escore: média da intensidade do achado histológico (0-ausente; 1-discreto; 2-moderado; 3-acentuado); Controle (não submetido à cirurgia ou ao uso de drogas); SH: SHAM (submetido à cirurgia, sem uso de drogas imunossupressoras); T1 (cirurgia + tacrolimus 1mg/kg/dia); T2 (cirurgia + tacrolimus 0,1mg/kg/dia); T3 (cirurgia + tacrolimus 10mg/kg/dia); M1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/Kg/dia); MT1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 1mg/kg/dia); MT2 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 0,5mg/kg/dia)

#### 4.2.5 Outros achados

Com relação a presença de infiltrado inflamatório, não houve diferença estatística entre os grupos ( $p=0,71$ )(APÊNDICE 16).

Por outro lado, foi evidenciada diferença estatística, quanto à presença de cilindros hialinos ( $p=0,01$ ), em que o grupo T3 diferiu de todos os demais grupos. Somente ratos do grupo T3 apresentaram essas alterações histológicas (FIGURA 14) (APÊNDICE 17).

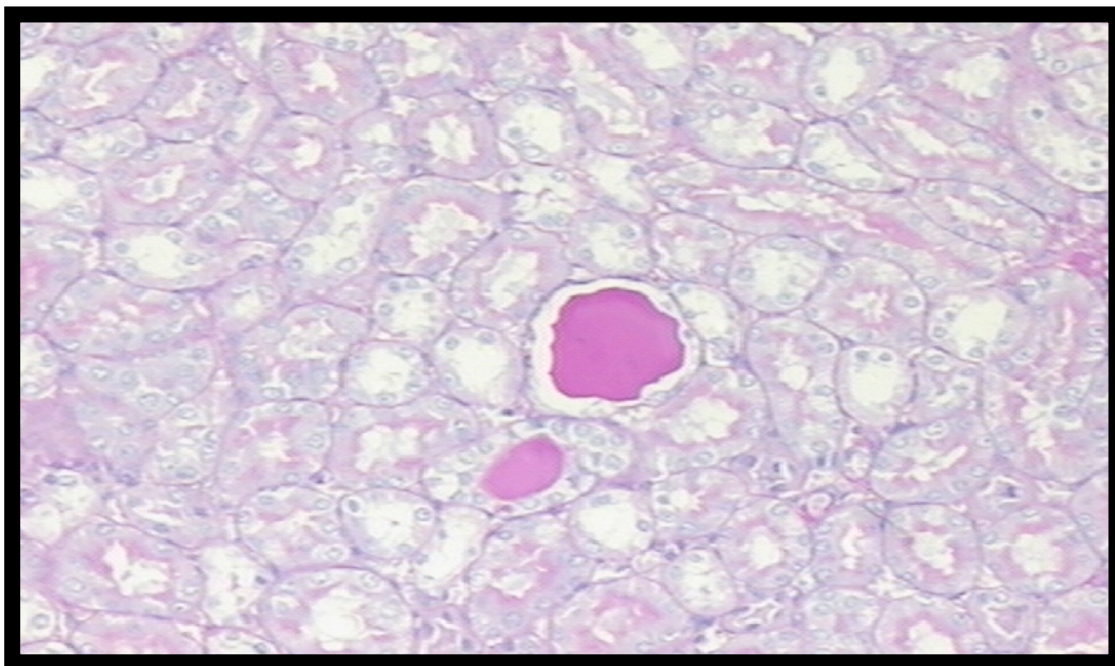


FIGURA 14 – CILINDROS HIALINOS – MICROSCOPIA ÓPTICA: AUMENTO DE 100X –  
COLORAÇÃO DE PAS. RATO 5 DO GRUPO III

## 5 DISCUSSÃO

Novas drogas estão sendo desenvolvidas e muito tem sido estudado a respeito de qual seria o melhor esquema de imunossupressão para o transplante renal. Conseguindo cada vez menores taxas de rejeição com diferentes combinações de drogas imunossupressoras, a importância da segurança e da tolerabilidade tem se tornado cada vez mais relevante, especialmente com relação à preservação da função e sobrevida do enxerto e do paciente (ABBUD FILHO; RAMALHO, 1997).

Em protocolos internacionais de imunossupressão, como o *South West Transplant Centre* (SWTC) observa-se que não há consenso em um regime de imunossupressão perfeito, enfatizando a grande variação nos protocolos de imunossupressão entre diferentes centros na Europa e nos Estados Unidos. Estudos têm comparado o tacrolimus e a ciclosporina, concluindo não haver diferença estatística na sobrevida do paciente, nem na sobrevida do enxerto. Porém, esses mesmos trabalhos mostram uma tendência à maior sobrevida dos pacientes com tacrolimus. O SWTC também refere que a combinação tacrolimus e MMF é particularmente potente pela biodisponibilidade do MMF ser maior com o tacrolimus comparado à ciclosporina (SOUTH WEST TRANSPLANT CENTRE - SWTC, 2006).

De uma maneira geral, o uso do tacrolimus e do MMF está aumentando, o uso da ciclosporina está decaindo, e a azatioprina não é mais usada nos Estados Unidos. O sirolimus é muito utilizado na Europa, porém seu uso nos Estados Unidos aparece em declínio sendo utilizado em menos de 10% dos casos (SOUTH WEST TRANSPLANT CENTRE - SWTC, 2006).

Diante desse contexto e do fato de vários serviços brasileiros de transplantes renais utilizarem a associação de MMF e tacrolimus, o presente experimento estudou esses fármacos de forma isolada e em associação, além de realizar uma estratificação das doses dos mesmos.

O modelo de lesão por isquemia e reperfusão e o método de administração de drogas por gavagem utilizados nesse experimento, já haviam sido descritos previamente. Jain, Bicknell e Nicholson (2000), estudando os efeitos do tacrolimus e da ciclosporina, submetem ratos Wistar à clampeamento renal à direita, associado à nefrectomia à esquerda. Nesse estudo, os animais receberam ciclosporina (10mg/kg/dia) ou tacrolimus (0-2mg/kg/dia). As drogas foram administradas de forma



oral por gavagem, sendo que o tacrolimus foi dissolvido em água para uma concentração de 0-1mg/ml e administrado uma vez ao dia em uma dose de 0-2mg/kg. No presente estudo, ao contrário de Jain, Bicknell e Nicholson (2000), foi realizado a nefrectomia direita e clampeamento renal à esquerda, devido ao fato de os vasos do hilo renal esquerdo serem mais longos, facilitando assim, o clampeamento dos mesmos.

Segundo Shihab *et al.* (1997), altas doses de tacrolimus (0,5-2,0 mg/kg/dia) são necessárias em transplantes de roedores para evitar a rejeição do enxerto e, portanto, a taxa tóxico-terapêutica entre eficácia e efeitos adversos parece ser similar ao dos humanos. Obviamente, a simples transposição da dose-resposta entre roedores e humanos é impossível. Neste trabalho, foram utilizadas doses entre 0,1mg/kg e 10mg/kg, com o objetivo de observar os efeitos da medicação desde uma sub-dose até doses acentuadas.

Pesquisas em modelos animais têm demonstrado que as consequências da isquemia e reperfusão dependem da duração. Thompson *et al.* (2010), em um estudo retrospectivo em humanos, avaliaram o impacto do tempo de isquemia em pacientes com rim único submetidos à nefrectomia aberta. Eles concluíram que a isquemia durante a nefrectomia parcial é associada a um aumento nas taxas de insuficiência renal aguda e doença crônica do rim. Além disso, verificaram que o tempo máximo tolerado respectivamente para isquemia quente e fria é de 20 e 35 minutos. No entanto, não há consenso na literatura sobre o período máximo de isquemia para evitar lesão renal irreversível (MEYER *et al.*, 2011). No presente experimento, utilizamos um período de isquemia de 20 minutos, devido ao fato de a isquemia por um período mais prolongado poder trazer dano renal muito acentuado e até mesmo ocasionar óbito precoce de animais. O efeito isolado da isquemia e reperfusão foi observado no grupo SHAM, em que os animais foram submetidos à isquemia renal, mas não foram tratados com fármacos. Nesse grupo, não foi verificado, ao final do estudo, alterações nos níveis de creatinina ou alterações histológicas características da isquemia (necrose tubular aguda) quando comparados com o grupo controle. Por outro lado, ao analisar os níveis séricos de uréia, o grupo SHAM apresentou discreta, porém significativa, elevação quando comparada ao grupo controle, sugerindo um possível dano renal causado exclusivamente pela isquemia e reperfusão.

O modelo de escore, calculado pela média da graduação dos achados histológicos, utilizado neste experimento, já havia sido descrito. Nielsen *et al.* (2003) realizaram estudo experimental com objetivo de avaliar a função glomerular e as alterações morfológicas renais em ratos submetidos a tratamento com agentes imunossupressores por um período de duas semanas. Durante este tempo, foram administrados ciclosporina e tacrolimus através de gavagem e sirolimus por via intraperitoneal. Ao término do período de estudo, foi avaliado o clearance de creatinina e realizado análise morfológica dos rins. Esta foi verificada através de um sistema de escore semi-quantitativo em que foi avaliado o grau de fibrose subcapsular e de basofilia tubular. A análise morfológica evidenciou que o escore de basofilia tubular variou discretamente nos grupos de tratamento, por outro lado, os escores de fibrose apresentaram mínima variância. Shihab *et al.* (1997) também utilizaram o esquema de escore para análise histológica. Realizaram modelo experimental de ratos submetidos à dieta com baixa quantidade de sal e tratado com tacrolimus subcutâneo (1mg/kg/dia) ou a doses equivalentes de placebo, sacrificando os animais com sete ou 28 dias. As alterações histológicas foram analisadas por escore semi-quantitativo de cada alteração (injúria tubular, fibrose tubulo-intersticial e hialinose das arteríolas aferentes). Nesse modelo, ao sétimo dia, encontraram somente injúria tubular (vacuolização). Entretanto nenhuma alteração histológica foi observada de forma significativa ( $p < 0,05$ ). As lesões típicas de nefrotoxicidade crônica pelo tacrolimus, como fibrose intersticial e arteriopatias, foram observadas somente com 28 dias.

No que é pertinente às alterações histológicas, o presente estudo apresentou discretas alterações. O tempo de estudo de 14 dias pode ter sido determinante para a não evidência de lesões típicas de nefrotoxicidade crônica, como foi demonstrado no experimento de Shihab *et al.* (1997), em que estas lesões não foram evidenciadas com sete dias, mas somente com 28 dias de estudo. Da mesma forma, Nielsen *et al.* (2003), como descrito anteriormente, em período de estudo de 14 dias, evidenciou variância mínima nos escores de fibrose.

De acordo com Shihab *et al.* (1997), um marcador precoce da nefrotoxicidade pelo tacrolimus é a vacuolização tubular. Por outro lado, a administração a longo prazo é associada a fibrose intersticial e a hialinose arteriolar. Os achados histológicos mais marcantes evidenciados no presente estudo foram referentes à pesquisa de cilindros hialinos e vacuolização citoplasmática dos túbulos

proximais, características de nefrotoxicidade precoce. Os primeiros foram evidenciados somente no grupo com elevadas doses de tacrolimus. Já a vacuolização citoplasmática foi identificada em maior escore nos grupos de tacrolimus em altas doses e no grupo em que foi utilizado MMF de forma isolada. A associação MMF com tacrolimus em dose habitual não potencializou o escore de vacuolização, no entanto, quando associado com metade da dose habitual de tacrolimus, o escore de vacuolização apresentou-se baixo, similar ao grupo SHAM e estatisticamente inferior ao grupo T3 e M1. Este resultado sugere um possível efeito protetor da associação das drogas.

Vários trabalhos estudaram o impacto do uso de drogas imunossupressoras na função renal. Nielsen *et al.* (2003) verificaram que o uso de ciclosporina, tacrolimus e sirolimus apresentou diminuição significativa do clearance de creatinina. Por sua vez, Shihab *et al.* (1997) evidenciaram que o tacrolimus induziu um aumento significativo na creatinina sérica após 28 dias de tratamento. O clearance de creatinina já mostrou um decréscimo, no grupo sacrificado com sete dias, intensificando esta redução e tornando-se significativo no grupo com 28 dias. Sampaio *et al.* (2008) publicaram um estudo prospectivo e randomizado comparando esquemas de imunossupressão baseados no tacrolimus, usado em associação com o MMF ou com o sirolimus. Evidenciaram que a associação de MMF e tacrolimus é caracterizada por uma melhora da função renal do enxerto e menor fator de risco cardiovascular, além de prevenir e reduzir a deteriorização da função do enxerto por nefropatia crônica.

A função renal apresentou alterações peculiares no presente estudo. A administração de tacrolimus de forma isolada elevou significativamente os níveis de uréia quando comparados com os grupos controle e SHAM, apresentando inclusive alterações dose-dependentes. O grupo em que foi utilizado MMF de forma isolada apresentou significativamente menor taxa de elevação de uréia quando comparado a todos os grupos em que foi utilizado tacrolimus, exceto o grupo MT2 (metade da dose habitual de tacrolimus), em que os níveis séricos de uréia encontrados também foram baixos. Estas evidências sugerem um efeito nefrotóxico do tacrolimus e um possível efeito protetor da associação desse fármaco com o MMF, concordando com Sampaio *et al.* (2008). Da mesma forma, Paul (2011), estudando cicatrização de bexiga em ratos sob uso de tacrolimus associado ao MMF, sugeriu



possível efeito protetor do uso associado do tacrolimus com MMF na função renal após 15 dias de tratamento.

Neste trabalho, tacrolimus em altas doses elevou significativamente os níveis séricos de creatinina quando comparados com o grupo controle e o grupo SHAM. No entanto, quando administradas doses menores de tacrolimus, não foram evidenciadas alterações significativas. Estes achados podem ser decorrentes do fato de apenas o grupo T3 ter apresentado nível sérico de tacrolimus próximo à faixa terapêutica do fármaco. Apesar das dosagens séricas de tacrolimus comprovarem que houve absorção do medicamento administrado a todos os grupos que receberam a droga e que a administração de diferentes doses produziu níveis séricos diferentes entre os grupos, estes não atingiram a faixa terapêutica do fármaco. Portanto os possíveis efeitos adversos esperados pelo medicamento podem ter sido apresentados de forma atenuada.

O nível sérico ideal do tacrolimus já é bem estabelecido. Os resultados de um estudo multicêntrico em transplante renal, revelaram uma associação entre baixos níveis séricos de tacrolimus e uma incidência maior de rejeição aguda, sendo estratificado três grupos de risco: baixo (5–14 ng/ml), médio (15–25 ng/ml), e alto (26–40 ng/ml). Da mesma forma, estudos em transplante hepático também evidenciaram risco aumentado de rejeição em pacientes com concentrações séricas abaixo de 5 ng/ml (RINGE *et al.*, 1998). A correlação entre toxicidade do tacrolimus e a concentração sérica do mesmo parece ser ainda mais forte que a da rejeição aguda. Os resultados de ensaios clínicos referentes a transplantes renais e hepáticos demonstram relação entre toxicidade e nível sérico de tacrolimus. Estudos referentes a transplantes renais sugerem que um nível sérico de cinco a 15 ng/ml parece otimizar a eficiência e minimizar os efeitos adversos (LASKOW, 1996; OELLERICH *et al.*, 1998).

A razão para não se ter atingido os níveis séricos considerados terapêuticos, mesmo tendo sido administradas altas doses de tacrolimus, parece estar relacionada à biodisponibilidade do fármaco. Shihab *et al.* (1997), evidenciaram que a administração oral do tacrolimus tem uma biodisponibilidade baixa. Com o objetivo de aumentar a biodisponibilidade da droga, eles administraram tacrolimus de forma subcutânea em dose de 1mg/kg, alcançando os níveis séricos da janela terapêutica para humanos. Nesse estudo, embora a dose diária de tacrolimus tenha sido cinco vezes maior que o usado em transplantes

humanos, os níveis séricos de tacrolimus foram similares aos observados clinicamente. Isso pode ser explicado por um elevado clearance de tacrolimus e um maior volume de distribuição em ratos (2,0L/hr/kg e 20,2L/kg, respectivamente) quando comparado com a farmacocinética em humanos (0,1L/hr/kg e 1L/Kg, respectivamente). Desta forma, o presente estudo, apesar de seguir parâmetros de forma de administração e dosagens já utilizadas em outros estudos (JAIN; BICKNELL; NICHOLSON, 2000), reforça a necessidade de uso de doses mais elevadas de tacrolimus administradas por gavagem, ou mesmo a administração por via subcutânea, que apresenta uma maior biodisponibilidade. Uma vez atingidos os níveis terapêuticos da droga, mais fidedigno seria o estudo de sua toxicidade.

Ao contrário do previsto, no presente estudo, os grupos em que foram utilizados MMF ou a associação MMF com tacrolimus, apresentaram níveis séricos de creatinina significativamente maiores quando comparados com todos os demais grupos, exceto com o grupo T3, em que foi utilizado dose maior de tacrolimus ( $p > 0,05$ ). Estes achados podem decorrer de uma sub-dose de tacrolimus nos grupos T1, T2, MT1 e MT2. Como enfatizado anteriormente, apenas o grupo T3 apresentou nível sérico de tacrolimus próximo à faixa terapêutica do fármaco. Outra questão importante é que as médias dos valores de creatinina, encontradas nos grupos M1, MT1 e MT2 foram respectivamente 0,55; 0,59 e 0,58, estando esses valores dentro dos padrões normais de referência de creatinina para ratos. A avaliação de uréia e creatinina em ratos Wistar apresenta parâmetros bem estabelecidos em condições normais. Santos (2010), estudando ratos da linhagem Wistar, com peso entre 230 a 260 gramas, estabeleceu parâmetros bioquímicos de uréia em  $35,2 \pm 1,31$  mg/dl e de creatinina em  $0,6 \pm 0,02$  mg/dl. O Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP usa como parâmetros normais a uréia entre 41 e 44,6 mg/dl e a creatinina entre 0,3 e 0,6 mg/dl (Centro de bioterismo da FMUSP, 2010).

Modelos animais alternativos têm sido desenvolvidos para potencializar o efeito nefrotóxico das drogas imunossupressoras e, desta forma, demonstrar de forma experimental, bioquímica e histologicamente os efeitos tóxicos do uso desses fármacos. Um modelo de nefrotoxicidade pelo tacrolimus foi estabelecido em ratos com depleção de sódio apresentando lesões funcionais e intersticiais semelhantes a dos humanos (ANDOH *et. al.*, 1994; ANDOH *et. al.*, 1995; SHIHAB *et al.*, 1997). Andoh *et. al.* (1995) avaliaram a nefrotoxicidade aguda e crônica do tacrolimus em ratos, sendo reportado uma piora em termos estruturais e funcionais em ratos

submetidos à depleção de sódio na dieta. Por outro lado, animais submetidos à dieta normal não desenvolveram lesões histológicas significantes até 42 dias. A depleção de sódio é um fator de risco conhecido para o desenvolvimento de insuficiência renal aguda associada a várias condições clínicas e experimentais, além de potencializar os efeitos de várias nefrotoxinas. Como em ratos, a depleção de sódio acelera o desenvolvimento da nefropatia crônica por ciclosporina e tacrolimus, esta prática poderia aprimorar o estudo dos efeitos tóxicos desses fármacos (ANDOH *et al.*, 1994; ANDOH *et al.*, 1995; SHIHAB *et al.*, 1997).

## 6 CONCLUSÃO

Ao término do estudo pode-se concluir que:

Do ponto de vista histológico, a associação de lesão por isquemia e reperfusão com o uso de tacrolimus ou micofenolato mofetil de forma isolada apresentou uma maior taxa de alterações renais características de nefrotoxicidade precoce.

Do ponto de vista laboratorial, através da dosagem sérica de uréia e creatinina, a associação de lesão por isquemia e reperfusão com tacrolimus em doses mais elevadas mostrou-se nefrotóxica.

## REFERÊNCIAS

ABBUD FILHO, M. Bases moleculares dos mecanismos de rejeição dos transplantes. In: CRUZ, J. *et al.* (Ed.). **Atualidades em nefrologia**. 3.ed. São Paulo: Sarvier, p.226-234, 1994.

ABBUD FILHO M.; RAMALHO H.J. Revisão / atualização em transplante renal. Novos agentes imunossupressores. **J. Bras. Nefrol.**, São Paulo, v.19, p.215-223, 1997.

ALBERÚ, J.; URREA, E.M. Immunosuppression for kidney transplant recipients: current strategies. **Rev. Invest. Clin.**, Mexico, v.57, n.2, p.213-224, 2005.

ANDOH, T.F. *et al.* Enhancement of FK506 nephrotoxicity by sodium depletion in an experimental rat model. **Transplantation**, Baltimore, v.57, n.4, p.483-489, 1994.

ANDOH, T.F. *et al.* Functional and structural characteristics of experimental FK 506 nephrotoxicity. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, Oxford, v.22, p.646-654, 1995.

ARIAS, L.F. *et al.* Histologic assessment of donor kidneys and graft outcome: multivariate analyses. **Transplant. Proc.**, New York, v.39, p.1368-1370, 2007.

ASTELLAS PHARMA. Prograf Package Insert. Deerfield, IL, Astellas Pharma US Inc, 2005.

BENNETT, W.M. *et al.* Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs. **Nephrol. Dial. Transplant.**, Oxford, v.9, p.141, 1994.

BIA, M.J. Nonimmunologic causes of late renal graft loss. **Kidney Int.**, New York, v.47, p.1470-1480, 1995.

CECKA, J.M. The UNOS Scientific Renal Transplant Registry - Ten years of kidney transplants, In: CECKA J.M.; TERASAKI, P.I. (Ed.). **Clinical transplants 1997**. Los Angeles, California, UCLA, Tissue Typing Laboratory, cap.1, p.1-14, 1998.

CENTRO DE BIOTERISMO DA FMUSP. Parâmetros bioquímicos de ratos do centro de bioterismo da FMUSP, 2008. Disponível em: [http://www.biot.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tip=RATO&id\\_ani=17&parametros=sim](http://www.biot.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tip=RATO&id_ani=17&parametros=sim). Acessado em 22/08/2013.

CTS - COLLABORATIVE TRANSPLANT STUDY. Disponível em: <http://cts.med.uni-heidelberg.de>., 1999 Ref Type: Internet Communication Acesso em: 22/08/2013.

DEAN, P.G. *et al.* Wound-healing complications after kidney transplantation: a prospective, randomized comparison of sirolimus and tacrolimus. **Transplantation**, Baltimore, v.77, p.1555-1561, 2004.

EKICI, Y. *et al.* Effect of rapamycin on wound healing: an experimental study. **Transplant. Proc.**. New York, v.39, p.1201-1203, 2007.

GASTON, R.S. Current and evolving immunosuppressive regimens in kidney transplantation. **Am. J. Kidney Dis.**, New York, v.47, n.4, supl. 2, p. S3-S21, 2006.

GEISELER, D.; JAMES, W. Innovation of Immunoassays: chemiluminescence. **Rev. Bras. Anal. Clin.** Rio de Janeiro, v.24, n.3, p.61-64, 1992.

GJERTSON, D.W. Survival trends in long-term first cadaver-donor kidney transplants. In: TERASAKI, P.I.; CECKA, J. M. (Ed.). **Clinical transplants**. Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory, cap. 21, p. 225-235, 1991.

HALLORAN, P. *et al.* The molecular immunology of acute rejection; an overview. **Transplant. Immunol.**, Dunto Green, v.1, p.3-27, 1993.

HALLORAN, P.F. Rethinking immunosuppression in terms of the redundant and nonredundant steps in the immune response. **Transplant. Proc.**, New York, v.28, n.6, supl.1, p.11-18, 1996.

HARDINGER, K.L.; KOCH, M.J.; BRENNAN, D.C. Current and future immunosuppressive strategies in renal transplantation. **Pharmacotherapy**, Carlisle, v.24, n.9, p.1159-1176, 2004.

HEICHMAN, K.A.; ROBERTS, J.M. Rules to replicate. **Cell**, Cambridge, v.79, p.557-562, 1994.

HUMAR, A. *et al.* Graft and quality of life outcomes in older recipients of a kidney transplant. **Exp. Clin. Transplant.**, Ankara, v.1, n.2, p.69-72. 2003.

JAIN, S.; BICKNELL, G.R.; NICHOLSON, M.L. Tacrolimus has less fibrogenic potential than cyclosporin A in a model of renal ischemia-reperfusion injury. **Br. J. Surg.**, Oxford, v.87, p.1563-1568, 2000.

JOHNSON, C.P. *et al.* Pre-transplant identification of risk factors that adversely affect length of stay and charges for renal transplantation. **Clin. Transplant.**, Copenhagen, v.13, n.2, p.168-175, 1999.

JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

JUNQUEIRA, L.C; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, 1983.

KAMAR, N. *et al.* Renal function and histology in kidney transplant patients receiving tacrolimus and sirolimus or mycophenolate mofetil. **Exp. Clin. Transplant.** Ankara, v.4, p.532-536, 2006.

KASISKE, B.L., *et al.* Histopathologic findings associated with a chronic, progressive decline in renal allograft function. **Kidney Int., New York**, v.40, p.514-524, 1991.

KASISKE, B.L. *et al.* Diabetes mellitus after kidney transplantation in the United States. **Am. J. Transplant.**, Copenhagen, v.3, p.178-185, 2003.

KLINTMALM, G.B.; GONWA, T.A. Nephrotoxicity associated with cyclosporine and FK506. **Liver Transpl.Surg.**, Philadelphia, v.1, p.11-19, 1995.

KRÄMER, B.K. The European Tacrolimus vs Cyclosporine Microemulsion Renal Transplantation Group: Cardiovascular risk factors and estimated risk for CAD in a randomized trial comparing calcineurin inhibitors in renal transplantation. **Am. J. Transplant.**, Copenhagen, v.3, p.982-987, 2003.

LASKOW, D.A. An open-label, concentration-ranging trial of FK506 in primary kidney transplantation: a report of the United States Multicenter FK506 Kidney Transplant Group Transplantation. **Transplantation**, Baltimore, v.62, p.900-905, 1996.

LLOBERAS, N. *et al.* Different renal toxicity profiles in the association of cyclosporine and tacrolimus with sirolimus in rats. **Nephrol. Dial. Transplant.**, Oxford, v.23, p.3111-3119, 2008.

MAAHS, M.A.P. **Associação entre o uso de bisfosfonatos e osteonecrose dos maxilares: estudo em ratos.** Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

MCCAULEY, J. The nephrotoxicity of FK506 as compared with cyclosporine. **Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.**, Philadelphia, v.2, p.662-669, 1993.

MELE, T.S.; HALLORAN, P.F. The use of mycophenolate mofetil in transplant recipients. **Immunopharmacology**. Amsterdam, v.47, n.2/3, p.215-245, 2000.

MEYER, F. *et al.* Análise histológica e do fluxo sanguíneo em rins submetidos a períodos distintos de isquemia/ reperfusão. **Acta Cir. Brasil.**, São Paulo, v.26, n.6, 451-455, 2011.

NIELSEN, F. T. *et al.* Kidney function and morphology after short-term combination therapy with cyclosporine A, tacrolimus and sirolimus in the rat. **Nephrol Dial Transplant.**, Oxford, v.18: 491-496, 2003.

NINOVA, D. *et al.* Acute Nephrotoxicity of tacrolimus and sirolimus in renal isografts: differential intragraft expression of transforming growth factor-[beta]1 and [alpha]-smooth muscle actin. **Transplantation**, Baltimore, v.78, p.338-344, 2004.

NORONHA, I.L. *et al.* Micofenolato mofetil (MMF) em transplante de órgãos, **J. Bras. Nefrol.**, São Paulo, v.19, n.4, p. 398-406, 1997.

NOVARTIS PHARMACEUTICALS. Neoral Package Insert. East Hanover, NJ, Novartis Pharmaceuticals Corp, 2004.

OELLERICH, M. *et al.* Therapeutic drug monitoring of cyclosporine and tacrolimus. Update on Lake Louise Consensus Conference on cyclosporin and tacrolimus. **Clin. Biochem.**, Toronto, v.31, p.309–316, 1998.

ONO, M.C.C. **Influência de dieta imunomoduladora na cicatrização cutânea em ratos**. Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

PAUL, L. C. Chronic renal transplant loss. **Kidney Int.**, New York, v.47, n.6, p.1491-1499. 1995.

PAUL, L.C. Chronic allograft nephropathy: an update. **Kidney Int.**, New York, v.56, p.783-793, 1999.

PAUL, G.M. et al. Análise qualitativa do depósito de colágeno em sutura de bexiga de ratos tratados com a associação tacrolimus e micofenolato-mofetil. Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

PEREIRA, L. *et al.* Qualidade de vida relacionada à saúde em paciente transplantado renal. **J. Bras. Nefrol.**, São Paulo, v.25, n.1, p.10-16. 2003.

PESTANA, J.O.; RAMOS, O.L.; AJZEN, H. Guia clínico para o transplante renal. **J. Bras. Nefrol.**, São Paulo, v.4, p.66-86, 1992.

RECOBRA. Registro Colaborativo Brasileiro de Transplante Renal. Disponível em: <http://gamba.epm.br>, 1999. Ref Type: Internet Communication. Acesso em: 12/10/2013.

RINGE, B. *et al.* Tacrolimus and mycophenolate mofetil in clinical liver transplantation: experience with a steroid-sparing concept **Transplant. Proc.**, New York, v. 30, p.1415–1416, 1998.

SALVATIERRA, O. *et al.* Superior outcomes in pediatric renal transplantation. **Arch.Surg.**, Chicago, v.132, p.842-847, 1997.

SAMANIEGO, M.; BECKER, B.N.; DJAMALI, A. Drug insight: maintenance immunosuppression in kidney transplant recipients. **Natl. Clin. Pract. Nephrol.**, v.2, n.12, p.688-699, 2006.

SAMPAIO, E.L. *et al.* Mycophenolate mofetil vs. sirolimus in kidney transplant recipients receiving tacrolimus-based immunosuppressive regimen. **Clin. Transpl.**, Copenhagen, v. 22, p. 141-149, 2008.

SANTOS, M.R.V. et al. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Sergipe. **Scientia Plena**. Aracajú, v.6, n.10, p.1-6, 2010.

SESSO, R.; GORDAN, P. Dados disponíveis sobre a doença renal crônica no Brasil. **J. Bras. Nefrol.**, São Paulo, v.29, supl.1, p.9-12, 2007.



SHIHAB, F.S. *et al.* Mechanism of fibrosis in experimental tacrolimus nephrotoxicity. **Transplantation**, Baltimore, v.64, p. 1829-1837, 1997.

SILVA, JR. O. C. *et al.* Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cir. Brasil.**, São Paulo, v.17, supl.3, p.96-100, 2002.

SODRÉ, F.L. *et al.* Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v.43, n.5, p.329-337, 2007.

SOUTH WEST TRANSPLANT CENTRE – SWTC. Immunosuppression protocols July 2006. Disponível em:  
<<http://www.swtransplant.com/pdf/Immunosuppression%20protocols.pdf>> Acesso em: 09/10/2010.

SUTHANTHIRAM. M.; STROM, T.B. Renal transplantation. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.331, p.365-376, 1994.

THOMPSON, H.R.A. *et al.* Blute comparison of warm ischemia versus no ischemia during partial nephrectomy on a solitary kidney. **Eur. Urol.**, Basel, v.58, p.331-336, 2010.

TULLIUS, S.G.; TILNEY, N.L. Both alloantigen-dependent and -independent factors influence chronic allograft rejection. **Transplantation**, Baltimore, v.59, n.3, p.313-318, 1995.

UNOS. Kidney transplantantation. Disponível em: <http://www.unos.org>, 1999. Ref Type: Internet Communication. Acesso em: 12/10/2013.

WINKLER, M. *et al.* Comparison of plasma vs whole blood as matrix for FK 506 drug level monitoring. **Transplant. Proc.**, New York, v.27, p.822-825, 1995.

YILMAZ, S.; PAAVONEN, T.; HAYRY, P. Chronic rejection of rat renal allografts. II. The impact of prolonged ischemia time on transplant histology. **Transplantation**, Baltimore, v.78, p.823-8215 Aug. 2004.

**APÊNDICE 1**  
**DOSAGENS SÉRICAS DE TACROLIMUS (NANOGRAMAS/ML)**

Ratos	T1	T2	T3	MT1	MT2
1	0,50	0,20	2,80	0,60	0,20
2	0,90	0,50	3,70	0,20	0,20
3	0,30	0,70	2,40	0,10	0,10
4	0,50	0,30	Indefinido	0,20	0,40
5	0,30	0,20	1,60	0,60	0,10
6	0,60	0,01	2,10	0,20	0,20
7	0,20	0,20	1,80	0,40	0,50
8	0,80	0,50	1,90	0,50	0,10
9	0,30	0,20	2,50	0,50	0,40
10	0,50	0,60		0,60	0,20
<b>Média</b>	<b>0,49</b>	<b>0,34</b>	<b>2,35</b>	<b>0,38</b>	<b>0,24</b>
<b>Mediana</b>	<b>0,50</b>	<b>0,25</b>	<b>2,25</b>	<b>0,40</b>	<b>0,20</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,23</b>	<b>0,22</b>	<b>0,67</b>	<b>0,19</b>	<b>0,14</b>

**Tracolumus**

Grupo	T1	T2	T3	MT1	MT2
n	10	10	9	10	10
Média	0,49	0,34	2,35	0,39	0,24
Mediana	0,50	0,25	2,25	0,45	0,20
Desvio Padrão	0,23	0,22	0,67	0,20	0,14
<b>Valor de p comparação entre os grupos</b>					
T1		0,844123	0,000131	0,898641	0,436524
T2	0,844123		0,000131	0,999939	0,957108
T3	0,000131	0,000131		0,000131	0,000131
MT1	0,898641	0,999939	0,000131		0,922227
MT2	0,436524	0,957108	0,000131	0,922227	

n: Número de ratos; T1 (cirurgia + tacrolimus 1mg/kg); T2 (cirurgia + tacrolimus 0,1mg/kg/dia); T3 (cirurgia + tacrolimus 10mg/kg/dia); MT1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 1mg/kg/dia); MT2 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 0,5mg/kg/dia)

**APÊNDICE 2**  
**DOSAGENS SÉRICAS DE URÉIA (MG/DL)**

Ratos	C	SH	T1	T2	T3	M1	MT1	MT2
1	42	59	75	83	86	55	63	54
2	45	55	80	75	113	45	75	78
3	44	48	70	60	89	55	56	66
4	44	58	75	68	Indefinido	56	64	50
5	41	53	60	68	83	53	74	51
6	48	48	74	62	95	68	70	58
7	51	59	71	68	89	67	62	59
8	45	50	77	74	108	65	70	69
9	44		79	75	96	56	63	69
10	45		65	77		61	69	61
<b>Média</b>	<b>44,90</b>	<b>53,75</b>	<b>72,60</b>	<b>71,00</b>	<b>94,88</b>	<b>58,10</b>	<b>66,64</b>	<b>61,50</b>
<b>Mediana</b>	<b>44,50</b>	<b>54,00</b>	<b>74,50</b>	<b>71,00</b>	<b>92,00</b>	<b>56,00</b>	<b>67,00</b>	<b>60,00</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>2,85</b>	<b>4,71</b>	<b>6,28</b>	<b>7,07</b>	<b>10,63</b>	<b>7,14</b>	<b>5,66</b>	<b>8,96</b>

**Uréia**

Grupo	C	SH	T1	T2	T3	M1	MT1	MT2
n	10	8	10	10	9	10	10	10
Média	44,90	53,75	72,60	71,00	94,88	58,10	66,60	61,50
Mediana	44,50	54,00	74,50	71,00	92,00	56,00	66,50	60,00
Desvio Padrão	2,85	4,71	6,28	7,07	10,63	7,14	5,97	8,96
Valor de p comparação entre os grupos								
C	-	0,009532	0,000001	0,000001	0,000001	0,000074	0,000001	0,000001
SH	0,009532	-	0,000001	0,000002	0,000001	0,194143	0,000243	0,022428
T1	0,000001	0,000001	-	0,610587	0,000001	0,000017	0,059246	0,000706
T2	0,000001	0,000002	0,610587	-	0,000001	0,000103	0,164009	0,00338
T3	0,000001	0,000001	0,000001	0,000001	-	0,000001	0,000001	0,000001
M1	0,000074	0,194143	0,000017	0,000103	0,000001	-	0,008328	0,280807
MT1	0,000001	0,000243	0,059246	0,164009	0,000001	0,008328	-	0,10757
MT2	0,000001	0,022428	0,000706	0,00338	0,000001	0,280807	0,10757	-

n: Número de ratos; C: Controle (não submetido à cirurgia ou ao uso de drogas); SH: SHAM (submetido à cirurgia, sem uso de drogas imunossupressoras). T1 (cirurgia + tacrolimus 1mg/kg/dia); T2 (cirurgia + tacrolimus 0,1mg/kg/dia); T3 (cirurgia + tacrolimus 10mg/kg/dia); M1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/Kg/dia); MT1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 1mg/kg/dia); MT2 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 0,5mg/kg/dia)

### APÊNDICE 3

#### DOSAGENS SÉRICAS DE CREATININA (MG/DL)

Ratos	C	SH	T1	T2	T3	M1	MT1	MT2
1	0,30	0,40	0,40	0,40	0,50	0,56	0,70	0,70
2	0,30	0,50	0,40	0,30	0,50	0,64	0,71	0,67
3	0,30	0,40	0,30	0,30	0,50	0,60	0,66	0,70
4	0,30	0,40	0,40	0,30	Indefinido	0,63	0,66	0,60
5	0,30	0,40	0,40	0,40	0,40	0,61	0,73	0,57
6	0,54	0,40	0,40	0,30	0,50	0,74	0,70	0,66
7	0,57	0,40	0,40	0,30	0,60	0,50	0,56	0,72
8	0,67	0,40	0,40	0,40	0,50	0,40	0,40	0,40
9	0,43		0,30	0,30	0,50	0,40	0,40	0,40
10	0,49		0,30	0,40		0,40	0,40	0,40
<b>Média</b>	<b>0,42</b>	<b>0,41</b>	<b>0,37</b>	<b>0,34</b>	<b>0,50</b>	<b>0,55</b>	<b>0,57</b>	<b>0,58</b>
<b>Mediana</b>	<b>0,37</b>	<b>0,40</b>	<b>0,40</b>	<b>0,30</b>	<b>0,50</b>	<b>0,58</b>	<b>0,66</b>	<b>0,63</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,14</b>	<b>0,04</b>	<b>0,05</b>	<b>0,05</b>	<b>0,05</b>	<b>0,12</b>	<b>0,15</b>	<b>0,13</b>

#### Creatinina

Grupo	C	SH	T1	T2	T3	M1	MT1	MT2
n	10	8	10	10	9	10	10	10
Média	0,42	0,41	0,37	0,34	0,50	0,55	0,59	0,58
Mediana	0,37	0,40	0,40	0,30	0,50	0,58	0,66	0,63
Desvio Padrão	0,14	0,04	0,05	0,05	0,05	0,12	0,14	0,13
Valor de p comparação entre os grupos								
C	-	0,877881	0,085507	0,104549	0,006796	0,000366	0,000742	0,877881
SH	0,877881	-	0,385194	0,140601	0,010082	0,006899	0,000446	0,000864
T1	0,085507	0,385194	-	0,515084	0,009393	0,000236	0,000008	0,000017
T2	0,104549	0,140601	0,515084	-	0,001588	0,000024	0,000001	0,000001
T3	0,006796	0,092371	0,009393	0,001588	-	0,32709	0,062756	0,09632
M1	0,000366	0,006899	0,000236	0,000024	0,32709	-	0,340589	0,460875
MT1	0,000742	0,000446	0,000008	0,000001	0,062756	0,340589	-	0,827988
MT2	0,877881	0,000864	0,000017	0,000001	0,09632	0,460875	0,827988	-

n: Número de ratos; C: Controle (não submetido à cirurgia ou ao uso de drogas); SH: SHAM (submetido à cirurgia, sem uso de drogas imunossupressoras). T1 (cirurgia + tacrolimus 1mg/kg/dia); T2 (cirurgia + tacrolimus 0,1mg/kg/dia); T3 (cirurgia + tacrolimus 10mg/kg/dia); M1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/Kg/dia); MT1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 1mg/kg/dia); MT2 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 0,5mg/kg/dia)

**APÊNDICE 4**  
**INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS HISTOLÓGICAS DE CADA RATO DO GRUPO**  
**CONTROLE E MÉDIAS**

CONTROLE

L.H.	L. I.	TTA	TVA			TC					OUTROS	
	NTA		VC	T A	TG	EI	AH	AT	FI	EG	HG	II
RATO 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
RATO 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MÉDIA	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0,1	0

L.H.: Lesão Histológica; LI: Lesão Isquêmica; TTA: Toxicidade Tubular Aguda; TVA.: Toxicidade Vascular Aguda; TC: Toxicidade Crônica; NTA: Necrose Tubular Aguda; (VC) Vacuolização Citoplasmática; TA: Trombose Arteriolar; TG: Trombose Glomerular; EI: Edema Intimal; AH: Arteriopatia Hialina; AT: Atrofia Tubular; FI: Fibrose Intersticial; EG: Esclerose Glomerular; HG : Hipertrofia Glomerular; II: Infiltrado Inflamatório; CH: Cilindros Hialinos

**APÊNDICE 5**  
**INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS HISTOLÓGICAS DE CADA RATO DO GRUPO**  
**SHAM E MÉDIAS**

SHAM												
L.H.	L. I.	TTA	TVA			TC					OUTROS	
	NTA	VC	T A	TG	EI	AH	AT	FI	EG	HG	II	CH
RATO 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MÉDIA	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

L.H.: Lesão Histológica; LI: Lesão Isquêmica; TTA: Toxicidade Tubular Aguda; TVA.: Toxicidade Vascular Aguda; TC: Toxicidade Crônica; NTA: Necrose Tubular Aguda; (VC) Vacuolização Citoplasmática; TA: Trombose Arteriolar; TG: Trombose Glomerular; EI: Edema Intimal; AH: Arteriopatia Hialina; AT: Atrofia Tubular; FI: Fibrose Intersticial; EG: Esclerose Glomerular; HG : Hipertrofia Glomerular; II: Infiltrado Inflamatorio; CH: Cilindros Hialinos

**APÊNDICE 6**  
**INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS HISTOLÓGICAS DE CADA RATO DO GRUPO**  
**T1 E MÉDIAS**

T1												
L.H.	L. I.	TTA	TVA			TC					OUTROS	
	NTA	VC	TA	TG	EI	AH	AT	FI	EG	HG	II	CH
RATO 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 6	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
RATO 7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 8	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
RATO 9	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
RATO 10	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MÉDIA	0	0,3	0	0,1	0	0	0,1	0,4	0	0	0,1	0

L.H.: Lesão Histológica; LI: Lesão Isquêmica; TTA: Toxicidade Tubular Aguda; TVA.: Toxicidade Vascular Aguda; TC: Toxicidade Crônica; NTA: Necrose Tubular Aguda; (VC) Vacuolização Citoplasmática; TA: Trombose Arteriolar; TG: Trombose Glomerular; EI: Edema Intimal; AH: Arteriopatia Hialina; AT: Atrofia Tubular; FI: Fibrose Intersticial; EG: Esclerose Glomerular; HG : Hipertrofia Glomerular; II: Infiltrado Inflamatório; CH: Cilindros Hialinos

**APÊNDICE 7**  
**INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS HISTOLÓGICAS DE CADA RATO DO GRUPO**  
**T2 E MÉDIAS**

T2												
L.H.	L. I.	TTA	TVA			TC					OUTROS	
	NTA	VC	TA	TG	EI	AH	AT	FI	EG	HG	II	CH
RATO 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MÉDIA	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

L.H.: Lesão Histológica; LI: Lesão Isquêmica; TTA: Toxicidade Tubular Aguda; TVA.: Toxicidade Vascular Aguda; TC: Toxicidade Crônica; NTA: Necrose Tubular Aguda; (VC) Vacuolização Citoplasmática; TA: Trombose Arteriolar; TG: Trombose Glomerular; EI: Edema Intimal; AH: Arteriopatia Hialina; AT: Atrofia Tubular; FI: Fibrose Intersticial; EG: Esclerose Glomerular; HG : Hipertrofia Glomerular; II: Infiltrado Inflamatorio; CH: Cilindros Hialinos



**APÊNDICE 8**  
**INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS HISTOLÓGICAS DE CADA RATO DO GRUPO**  
**T3 E MÉDIAS**

T3												
L.H.	L. I.	TTA	TVA			TC					OUTROS	
	NTA	VC	TA	TG	EI	AH	AT	FI	EG	HG	II	CH
RATO 1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
RATO 2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 4	Ind.	Ind.	Ind.	Ind.	Ind.	Ind.	Ind.	Ind.	Ind.	Ind.	Ind.	Ind.
RATO 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
RATO 6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
RATO 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 8	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
RATO 9	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MÉDIA	0	0,75	0	0	0	0	0,3	0,1	0	0	0	0,3

L.H.: Lesão Histológica; LI: Lesão Isquêmica; TTA: Toxicidade Tubular Aguda; TVA.: Toxicidade Vascular Aguda; TC: Toxicidade Crônica; NTA: Necrose Tubular Aguda; (VC) Vacuolização Citoplasmática; TA: Trombose Arteriolar; TG: Trombose Glomerular; EI: Edema Intimal; AH: Arteriopatia Hialina; AT: Atrofia Tubular; FI: Fibrose Intersticial; EG: Esclerose Glomerular; HG : Hipertrofia Glomerular; II: Infiltrado Inflamatorio; CH: Cilindros Hialinos

**APÊNDICE 9**  
**INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS HISTOLÓGICAS DE CADA RATO DO GRUPO**  
**M1 E MÉDIAS**

M1												
L.H.	L. I.	TTA	TVA			TC					OUTROS	
	NTA	VC	TA	TG	EI	AH	AT	FI	EG	HG	II	CH
RATO 1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 4	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
RATO 5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
RATO 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 8	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 9	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
RATO 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MÉDIA	0	0,8	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0,1	0

L.H.: Lesão Histológica; LI: Lesão Isquêmica; TTA: Toxicidade Tubular Aguda; TVA.: Toxicidade Vascular Aguda; TC: Toxicidade Crônica; NTA: Necrose Tubular Aguda; (VC) Vacuolização Citoplasmática; TA: Trombose Arteriolar; TG: Trombose Glomerular; EI: Edema Intimal; AH: Arteriolopatia Hialina; AT: Atrofia Tubular; FI: Fibrose Intersticial; EG: Esclerose Glomerular; HG : Hipertrofia Glomerular; II: Infiltrado Inflamatorio; CH: Cilindros Hialinos

**APÊNDICE 10**  
**INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS HISTOLÓGICAS DE CADA RATO DO GRUPO**  
**MT1 E MÉDIAS**

MT1												
L.H.	L. I.	TTA	TVA			TC					OUTROS	
	NTA	VC	T A	TG	EI	AH	AT	FI	EG	HG	II	CH
RATO 1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 3	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
RATO 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 5	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
RATO 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 7	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 9	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 10	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MÉDIA	0	0,7	0	0	0	0	0,1	0,3	0	0	0	0

L.H.: Lesão Histológica; LI: Lesão Isquêmica; TTA: Toxicidade Tubular Aguda; TVA.: Toxicidade Vascular Aguda; TC: Toxicidade Crônica; NTA: Necrose Tubular Aguda; (VC) Vacuolização Citoplasmática; TA: Trombose Arteriolar; TG: Trombose Glomerular; EI: Edema Intimal; AH: Arteriopatía Hialina; AT: Atrofia Tubular; FI: Fibrose Intersticial; EG: Esclerose Glomerular; HG : Hipertrofia Glomerular; II: Infiltrado Inflamatorio; CH: Cilindros Hialinos

**APÊNDICE 11**  
**INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS HISTOLÓGICAS DE CADA RATO DO GRUPO**  
**MT2 E MÉDIAS**

MT2

L.H.	L. I.		TVA			TC					OUTROS	
	NTA	VC	TA	TG	EI	AH	AT	FI	EG	HG	II	CH
RATO 1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
RATO 6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RATO 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MÉDIA	0	0,2	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0

L.H.: Lesão Histológica; LI: Lesão Isquêmica; TTA: Toxicidade Tubular Aguda; TVA.: Toxicidade Vascular Aguda; TC: Toxicidade Crônica; NTA: Necrose Tubular Aguda; (VC) Vacuolização Citoplasmática; TA: Trombose Arteriolar; TG: Trombose Glomerular; EI: Edema Intimal; AH: Arteriopatia Hialina; AT: Atrofia Tubular; FI: Fibrose Intersticial; EG: Esclerose Glomerular; HG : Hipertrofia Glomerular; II: Infiltrado Inflamatorio; CH: Cilindros Hialinos

**APÊNDICE 12**  
**COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DA VACUOLIZAÇÃO CITOPASMÁTICA**

<b>TTA (VACUOLIZAÇÃO CITOPASMÁTICA)</b>								
<b>GRUPO</b>	<b>C</b>	<b>SH</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>M1</b>	<b>MT1</b>	<b>MT2</b>
N	10	8	10	10	8	10	10	10
Média	0,00	0,25	0,30	0,20	0,75	0,80	0,70	0,20
Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Máximo	0,00	1,00	1,00	1,00	2,00	2,00	2,00	1,00
Desvio Padrão	0,00	0,46	0,48	0,42	0,71	0,63	0,67	0,42
<b>VALOR DE p COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS</b>								
C		0,309280	0,196685	0,387781	0,003046	0,000889	0,003335	0,387781
SH	0,309280		0,838279	0,838279	0,056077	0,027445	0,069554	0,838279
T1	0,196685	0,838279		0,665219	0,069554	0,033263	0,086657	0,665219
T2	0,387781	0,838279	0,665219		0,027445	0,011196	0,033263	1,000000
T3	0,003046	0,056077	0,069554	0,027445		0,838279	0,838279	0,027445
M1	0,000889	0,027445	0,033263	0,011196	0,838279		0,665219	0,011196
MT1	0,003335	0,069554	0,086657	0,033263	0,838279	0,665219		0,033263
MT2	0,387781	0,838279	0,665219	1,000000	0,027445	0,011196	0,033263	

TTA: Toxicidade Tubular Aguda; n: Número de ratos; C: Controle (não submetido à cirurgia ou ao uso de drogas); SH: SHAM (submetido à cirurgia, sem uso de drogas imunossupressoras); T1 (cirurgia + tacrolimus 1mg/kg/dia); T2 (cirurgia + tacrolimus 0,1mg/kg/dia); T3 (cirurgia + tacrolimus 10mg/kg/dia); M1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/Kg/dia); MT1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 1mg/kg/dia); MT2 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 0,5mg/kg/dia)

**APÊNDICE 13**  
**COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DA TROMBOSE GLOMERULAR**

<b>TVA (TROMBOSE GLOMERULAR)</b>								
<b>Grupo</b>	<b>C</b>	<b>SH</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>M1</b>	<b>MT1</b>	<b>MT2</b>
N	10	8	10	10	8	10	10	10
Média	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Máximo	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Desvio Padrão	0,00	0,00	0,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>VALOR DE p COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS</b>								
C		1,000000	0,056077	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
SH	1,000000		0,071257	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
T1	0,056077	0,071257		0,056077	0,071257	0,056077	0,056077	0,056077
T2	1,000000	1,000000	0,056077		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
T3	1,000000	1,000000	0,071257	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
M1	1,000000	1,000000	0,056077	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
MT1	1,000000	1,000000	0,056077	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
MT2	1,000000	1,000000	0,056077	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

TVA: Toxicidade Vascular Aguda; n: Número de ratos; C: Controle (não submetido à cirurgia ou ao uso de drogas); SH: SHAM (submetido à cirurgia, sem uso de drogas imunossupressoras); T1 (cirurgia + tacrolimus 1mg/kg/dia); T2 (cirurgia + tacrolimus 0,1mg/kg/dia); T3 (cirurgia + tacrolimus 10mg/kg/dia); M1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/Kg/dia); MT1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 1mg/kg/dia); MT2 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 0,5mg/kg/dia)

**APÊNDICE 14**  
**COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DA FIBROSE INTERSTICIAL**

<b>TC (FIBROSE INTERSTICIAL)</b>								
<b>GRUPO</b>	<b>C</b>	<b>SH</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>M1</b>	<b>MT1</b>	<b>MT2</b>
N	10	8	10	10	8	10	10	10
Média	0,10	0,00	0,40	0,00	0,13	0,20	0,30	0,10
Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Máximo	1,00	0,00	2,00	0,00	1,00	1,00	2,00	1,00
Desvio Padrão	0,32	0,00	0,70	0,00	0,35	0,42	0,67	0,32
<b>VALOR DE p COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS</b>								
C		0,999712	0,778824	0,999575	1,000000	0,999575	0,967877	1,000000
SH	0,999712		0,525477	1,000000	0,999089	0,976843	0,825873	0,999712
T1	0,778824	0,525477		0,448520	0,881137	0,967877	0,999575	0,778824
T2	0,999575	1,000000	0,448520		0,998709	0,967877	0,778824	0,999575
T3	1,000000	0,999089	0,881137	0,998709		0,999958	0,989291	1,000000
M1	0,999575	0,976843	0,967877	0,967877	0,999958		0,999575	0,999575
MT1	0,967877	0,825873	0,999575	0,778824	0,989291	0,999575		0,967877
MT2	1,000000	0,999712	0,778824	0,999575	1,000000	0,999575	0,967877	

TC: Toxicidade Crônica n: Número de ratos; C: Controle (não submetido à cirurgia ou ao uso de drogas); SH: SHAM (submetido à cirurgia, sem uso de drogas imunossupressoras); T1 (cirurgia + tacrolimus 1mg/kg/dia); T2 (cirurgia + tacrolimus 0,1mg/kg/dia); T3 (cirurgia + tacrolimus 10mg/kg/dia); M1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/Kg/dia); MT1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 1mg/kg/dia); MT2 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 0,5mg/kg/dia)

**APÊNDICE 15**  
**COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DA ATROFIA TUBULAR**

<b>TC (ATROFIA TUBULAR)</b>								
<b>Grupo</b>	<b>C</b>	<b>SH</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>M1</b>	<b>MT1</b>	<b>MT2</b>
N	10	8	10	10	8	10	10	10
Média	0,00	0,00	0,10	0,00	0,25	0,00	0,10	0,00
Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Máximo	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
Desvio Padrão	0,00	0,00	0,32	0,00	0,46	0,00	0,32	0,00
<b>VALOR DE p COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS</b>								
C		1,000000	0,970643	1,000000	0,261836	1,000000	0,970643	1,000000
SH	1,000000		0,978881	1,000000	0,325308	1,000000	0,978881	1,000000
T1	0,970643	0,978881		0,970643	0,837530	0,970643	1,000000	0,970643
T2	1,000000	1,000000	0,970643		0,261836	1,000000	0,970643	1,000000
T3	0,261836	0,325308	0,837530	0,261836		0,261836	0,837530	0,261836
M1	1,000000	1,000000	0,970643	1,000000	0,261836		0,970643	1,000000
MT1	0,970643	0,978881	1,000000	0,970643	0,837530	0,970643		0,970643
MT2	1,000000	1,000000	0,970643	1,000000	0,261836	1,000000	0,970643	

TC: Toxicidade Crônica; n: Número de ratos; C: Controle (não submetido à cirurgia ou ao uso de drogas); SH: SHAM (submetido à cirurgia, sem uso de drogas imunossupressoras); T1 (cirurgia + tacrolimus 1mg/kg/dia); T2 (cirurgia + tacrolimus 0,1mg/kg/dia); T3 (cirurgia + tacrolimus 10mg/kg/dia); M1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/Kg/dia); MT1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 1mg/kg/dia); MT2 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 0,5mg/kg/dia)



**APÊNDICE 16**  
**COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO**

<b>OUTROS (INFILTRADO INFLAMATÓRIO)</b>								
<b>GRUPO</b>	<b>C</b>	<b>SH</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>M1</b>	<b>MT1</b>	<b>MT2</b>
N	10	8	10	10	8	10	10	10
Média	0,10	0,00	0,10	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00
Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Máximo	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00
Desvio Padrão	0,32	0,00	0,32	0,00	0,00	0,32	0,00	0,00
<b>VALOR DE p COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS</b>								
C		0,963203	1,000000	0,949729	0,963203	1,000000	0,949729	0,949729
SH	0,963203		0,963203	1,000000	1,000000	0,963203	1,000000	1,000000
T1	1,000000	0,963203		0,949729	0,963203	1,000000	0,949729	0,949729
T2	0,949729	1,000000	0,949729		1,000000	0,949729	1,000000	1,000000
T3	0,963203	1,000000	0,963203	1,000000		0,963203	1,000000	1,000000
M1	1,000000	0,963203	1,000000	0,949729	0,963203		0,949729	0,949729
MT1	0,949729	1,000000	0,949729	1,000000	1,000000	0,949729		1,000000
MT2	0,949729	1,000000	0,949729	1,000000	1,000000	0,949729	1,000000	

n: Número de ratos; C: Controle (não submetido à cirurgia ou ao uso de drogas); SH: SHAM (submetido à cirurgia, sem uso de drogas imunossupressoras). T1 (cirurgia + tacrolimus 1mg/kg/dia); T2 (cirurgia + tacrolimus 0,1mg/kg/dia); T3 (cirurgia + tacrolimus 10mg/kg/dia); M1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/Kg/dia); MT1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 1mg/kg/dia); MT2 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 0,5mg/kg/dia)

**APÊNDICE 17**  
**COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DOS CILINDROS HIALINOS**

<b>OUTROS (CILINDROS HIALINOS)</b>								
<b>Grupo</b>	<b>C</b>	<b>SH</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>M1</b>	<b>MT1</b>	<b>MT2</b>
N	10	8	10	10	8	10	10	10
Média	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00	0,00
Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Máximo	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
Desvio Padrão	0,00	0,00	0,00	0,00	0,46	0,00	0,00	0,00
<b>VALOR DE p COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS</b>								
C		1,000000	1,000000	1,000000	0,015473	1,000000	1,000000	1,000000
SH	1,000000		1,000000	1,000000	0,026141	1,000000	1,000000	1,000000
T1	1,000000	1,000000		1,000000	0,015473	1,000000	1,000000	1,000000
T2	1,000000	1,000000	1,000000		0,015473	1,000000	1,000000	1,000000
T3	0,015473	0,026141	0,015473	0,015473		0,015473	0,015473	0,015473
M1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,015473		1,000000	1,000000
MT1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,015473	1,000000		1,000000
MT2	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,015473	1,000000	1,000000	

n: Número de ratos; C: Controle (não submetido à cirurgia ou ao uso de drogas); SH: SHAM (submetido à cirurgia, sem uso de drogas imunossupressoras). T1 (cirurgia + tacrolimus 1mg/kg/dia); T2 (cirurgia + tacrolimus 0,1mg/kg/dia); T3 (cirurgia + tacrolimus 10mg/kg/dia); M1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/Kg/dia); MT1 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 1mg/kg/dia); MT2 (cirurgia + micofenolato mofetil 20mg/kg/dia + tacrolimus 0,5mg/kg/dia)

## ANEXO

## PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética no Uso de Animais  
(CEUA)



Nº 386 b

## CERTIFICADO

O Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

## CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

**PROCESSO:** 23075.066966/2009-88


**APROVADO:** 10/07/2009 – R.O. 06/2009

Aprovado alteração de procedimento  
em 05/04/2011 – R.O. 03/2011

**TÍTULO:** Estudo experimental da cicatrização vesical em ratos submetidos à imunossupressão

**AUTORES:** Rogério de Fraga, Renato Tambara, Júlio Slongo, Marcelo Aranha, Eduardo Ramos, Alexandre Cavalli

DEPARTAMENTO: Anatomia

  
Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio  
Coordenador do CEUA

