

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RICARDO CAVALHEIRO CAVALLI

EFEITOS DO TACROLIMUS NA CICATRIZAÇÃO DE BEXIGA EM RATOS

CURITIBA

2013



RICARDO CAVALHEIRO CAVALLI

EFEITOS DO TACROLIMUS NA CICATRIZAÇÃO DE BEXIGA EM RATOS

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

2013



À Carolina, minha esposa, por toda a compreensão, paciência, apoio, dedicação e amor dispensados.

Ao meu filho Eduardo, que durante os 9 meses de uma gestação tranqüila, me proporcionou tantas inspirações e sonhos.

Aos meus pais José e Lourdes, pelo suporte familiar e amor dedicados.

Aos meus irmãos Alexandre, Rafael e José Eduardo, pelo apoio incondicional e, especialmente, ao Alexandre e Rafael pelo auxílio no desenvolvimento desse estudo.



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Orientador, PROF. DR. ROGÉRIO DE FRAGA, pela grande capacidade de formação de boas equipes, pela bela maestria na condução de pesquisas científicas, pela oportunidade e auxílio na conquista do grau de mestre e pela amizade demonstrada.

Ao Co-orientador, PROF. DR. RENATO TAMBARA FILHO, por todos os ensinamentos na graduação e pós graduação, pelo exemplo de pessoa que é e pela forma atenciosa e cordial que me auxiliou na tomada de decisões durante o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Coordenador da Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, PROF. DR. ANTONIO CARLOS LIGOCKI CAMPOS e ao Vice-Coordenador PROF. DR. JORGE EDUARDO FOUTO MATIAS, pela oportunidade de atingir o grau de mestre.

À Patologista DRA REGINA P XAVIER GOMES, pelo tempo dispensado nas análises histológicas e pela paciência e dedicação ao seu trabalho.

À Professora do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, DRA. DJANIRA VERONEZ, pelo tempo dispensado, principalmente por ter passado o período de puerpério auxiliando em análises histológicas e pelos ensinamentos teóricos.

Aos meus colegas MARCELO ALVES ARANHA JÚNIOR, PAULO HENRIQUE GOULART FERNANDES DIAS, CARLOS EDUARDO DE ALCÂNTARA CASTILHO, ANDRÉ WATANABI, pelo companheirismo e auxílio na execução do experimento.

Ao Professor DR EDISON PRISCO, pelos ensinamentos e auxílio nos procedimentos anestésicos dos animais de experimentação.

Aos alunos de iniciação científica, JULIO SLONGO e GABRIEL AUGUSTO OLIVEIRA, pelo auxílio no experimento e dedicação no cuidado dos animais.

Ao estatístico RAFAELLO DI BERNARDI, pelas horas dedicadas com os números e pela objetividade nas explicações.

Ao amigo HERBERT RUBENS KOCH FILHO, pelo estímulo à pesquisa e pelo prazer proporcionado em discussões acaloradas sobre pós graduação.

À todos os professores da Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, que ministraram ótimas aulas, fornecendo o fundamento teórico à metodologia da minha pesquisa.

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

À todos que de forma direta ou indireta contribuíram objetiva ou subjetivamente no processo de pesquisa e elaboração da dissertação.

À DEUS, que é a expressão máxima da fé.



“O Mestre deve ser meio sério, para dar autoridade à lição e meio risonho,  
para obter o perdão da correção.”

Machado de Assis



## RESUMO

**Introdução:** A cicatrização de feridas é dividida em 3 fases: Inflamatória; Proliferativa e Maturacional. Vários fatores podem provocar alterações no processo cicatricial. Drogas imunossupressoras, como o tacrolimus, podem influenciar no reparo de feridas. **Objetivo:** Avaliar histologia de cicatriz vesical e bioquímica sérica de ratos imunossuprimidos com tacrolimus, com rim único submetido à isquemia/reperfusão. **Método:** 50 ratos foram randomizados em 5 grupos. Ocorreram 3 óbitos em cirurgia, ficando 47 ratos nos grupos: Controle (Não Submetido à cirurgia, n=10), Sham (Submetido à cirurgia, sem droga, n=8), T1 (Submetido à cirurgia + tacrolimus 1mg/kg, n=10), T2 (Submetido à cirurgia + tacrolimus 0,1mg/kg, n=10), T3 (Submetido à cirurgia + tacrolimus 10mg/kg, n=9). A cirurgia visava reproduzir aspectos do transplante renal. Realizou-se laparotomia mediana, nefrectomia direita, isquemia/reperfusão renal esquerda, cistotomia seguida de cistorrafia. Após, os ratos receberam a medicação diariamente (Controle e Sham receberam apenas solução fisiológica. T1, T2, T3 receberam tacrolimus nas doses já citadas). No 14º dia, realizamos cistectomia para análise histológica por Hematoxilina-Eosina e dosagens séricas de uréia, creatinina e tacrolimus. **Resultados:** Houve diferença significativa no tacrolimus sérico comparando T3 com outros grupos ( $p < 0,05$ ). Houve aumento na creatinina do T3 e piora da uréia dos grupos com tacrolimus. Houve diferença significativa entre todas as variáveis histológicas comparando os grupos com e sem tacrolimus ( $p < 0,05$ ). **Conclusões:** O tacrolimus associado à isquemia/reperfusão é nefrotóxico, suprime inflamação e parece atrasar a cicatrização de bexiga.

**Palavras Chave:** Cicatriz. Bexiga. Rim. Ratos. Imunossupressão. Tacrolimus.



## ABSTRACT

**Introduction:** Wound healing is divided into three phases: inflammatory, proliferative and maturational. Several factors can cause changes in the healing process. Immunosuppressive drugs such as tacrolimus, may influence wound repair. **Objective:** Evaluate bladder histology in healing and biochemical analysis of rats with a single kidney subjected to ischemia / reperfusion, treated with tacrolimus. **Method:** 50 rats were randomized into 5 groups. 3 rats died in surgery, 47 rats were divided in groups: Control (non-operated, n = 10), Sham (operated without drugs, n = 8), T1 (operated + tacrolimus 1mg/kg, n = 10), T2 (operated + tacrolimus 0.1 mg/kg, n = 10), T3 (operated + tacrolimus 10mg/kg, n = 9). The surgery was the same in all: laparotomy, right nephrectomy, left kidney ischemia / reperfusion, followed by cystotomy and bladder suture. After that, the rats were submitted to gavage daily (Control and Sham with saline solution. T1, T2, T3 with tacrolimus in doses already mentioned). On the 14th day, after death induction, cystectomy was performed and bladder sent to histological analysis by hematoxylin-eosin. The serum urea, creatinine and tacrolimus were analysed too. **Results:** There was difference in serum tacrolimus in T3 compared to the other groups ( $p < 0,05$ ). There was higher doses of creatinine in T3 group and higher urea in groups with tacrolimus. There were significant differences among all histologic variables comparing groups with and without tacrolimus ( $p < 0,05$ ). **Conclusions:** Tacrolimus associated with ischemia / reperfusion is nephrotoxic, suppresses inflammation and seems to delay the healing of the bladder.

**Keywords:** Scar. Bladder. Kidney. Rats. Immunosuppression. Tacrolimus.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADRO 1	–	GRUPOS .....	27
FIGURA 1	–	FASES DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO .....	18
FIGURA 2	–	RATOS WISTAR .....	28
FIGURA 3	–	ANESTÉSICOS .....	29
FIGURA 4	–	TÉCNICA DE ANESTESIA INTRA-PERITONEAL .....	29
FIGURA 5	–	CAMPO CIRÚRGICO .....	29
FIGURA 6	–	LAPAROTOMIA MEDIANA .....	29
FIGURA 7	–	CLAMPEAMENTO RENAL ESQUERDO .....	30
FIGURA 8	–	DISSECÇÃO VESICAL .....	30
FIGURA 9	–	CISTOTOMIA .....	30
FIGURA 10	–	CISTORRAFIA .....	31
FIGURA 11	–	TÉCNICA DA PEGA DO ANIMAL .....	31
FIGURA 12	–	SONDA DE GAVAGEM .....	31
FIGURA 13	–	TÉCNICA DE GAVAGEM .....	32
FIGURA 14	–	MOMENTO DA CISTECTOMIA .....	33
FIGURA 15	–	TECIDO VESICAL PARA ANÁLISE .....	33
FIGURA 16	–	HISTOLOGIA EM HE DEMONSTRANDO EDEMA, VASOS CONGESTOS E NEUTRÓFILOS (100X) .....	35
FIGURA 17	–	HISTOLOGIA COM MUCOSA PRESERVADA E DISCRETA FIBROSE DE LÂMINA PRÓPRIA (40X) .....	35
FIGURA 18	–	HISTOLOGIA COM FIBROSE PRÓXIMA AO MÚSCULO LISO (200X) .....	36
GRÁFICO 1	–	VALORES SÉRICOS DE TACROLIMUS .....	39
GRÁFICO 2	–	VALORES SÉRICOS DE CREATININA .....	40
GRÁFICO 3	–	VALORES SÉRICOS DE URÉIA .....	41



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	–	INTENSIDADE DOS ACHADOS HISTOLÓGICOS .....	37
TABELA 2	–	NEUTRÓFILOS (MÉDIA) .....	42
TABELA 3	–	EDEMA (MÉDIA) .....	42
TABELA 4	–	CONGESTÃO (MÉDIA) .....	43
TABELA 5	–	MMN (MÉDIA) .....	43
TABELA 6	–	TECIDO DE GRANULAÇÃO (MÉDIA) .....	44
TABELA 7	–	FIBROSE (MÉDIA) .....	44
TABELA 8	–	ESCORE DETALHADO .....	45



## LISTA DE SIGLAS

ATP	–	Adenosina trifosfato
COBEA	–	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CEUA	–	Comitê de Ética no Uso de Animais
DNA	–	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	–	Ácido Etilenodiaminotetracético
EGF	–	Fator de crescimento epidérmico
FGF	–	Fator de crescimento de fibroblastos
HLA	–	Antígeno leucocitário humano
IGF-1	–	Fator de crescimento similar à insulina tipo-1
IL-1	–	Interleucina um
IL-2	–	Interleucina dois
IL-6	–	Interleucina seis
INF- $\gamma$	-	Interferon $\gamma$
MTOR	–	Mammalin Target Of Rapamycin (Receptor da Rapamicina)
PDGF	–	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PTKs	–	Proteínas tirosinaquinases
SHAM	–	Simulação em inglês
TCR	–	Receptor da célula T
TGF- $\alpha$	-	Fator de crescimento tipo Alfa
TGF- $\beta$	-	Fator de crescimento tipo Beta
TKs	–	Tirosinaquinases
UFPR	–	Universidade Federal do Paraná
USP	–	Universidade de São Paulo



## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>Ad libitum</i>	–	Expressão em latim de “à vontade”
CR	–	Creatinina
ed.	–	Edition (Edição em inglês)
et al.	–	Et alli (e outros)
HE	–	Hematoxilina-Eosina
MMN	-	Monomorfonucleares
n.	–	Número
p.	–	Página (s)
SF	–	Solução salina isotônica à 0,9%
T.Gran.	–	Tecido de Granulação
UR	–	Uréia
v.	-	Volume
NaCl	–	Cloreto de Sódio



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1 OBJETIVOS .....	16
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
2.1 CICATRIZAÇÃO .....	18
2.2 IMUNOSSUPRESSÃO .....	20
2.2.1 TACROLIMUS .....	22
2.2.2 IMUNOSSUPRESSÃO E CICATRIZAÇÃO .....	22
2.2.3 IMUNOSSUPRESSÃO E FUNÇÃO RENAL .....	23
2.3 ISQUEMIA E REPERFUSÃO .....	23
2.3.1 ISQUEMIA/REPERFUSÃO E IMUNOSSUPRESSÃO .....	24
2.3.2 ISQUEMIA/REPERFUSÃO E CICATRIZAÇÃO .....	24
2.3.3 ISQUEMIA/REPERFUSÃO E FUNÇÃO RENAL .....	25
<b>3 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>27</b>
3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	27
3.2 PADRONIZAÇÃO E NORMAS DO ESTUDO .....	27
3.3 AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO .....	28
3.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO .....	28
3.4.1 PRÉ OPERATÓRIO .....	28
3.4.2 PER OPERATÓRIO .....	29
3.4.3 PÓS OPERATÓRIO .....	31
3.5 COLETA DE AMOSTRAS .....	32
3.6 ANÁLISE DAS AMOSTRAS .....	34
3.6.1 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	34
3.6.2 ANÁLISES HISTOLÓGICAS .....	34
3.6.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	37
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
4.1 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	39
4.1.1 TACROLIMUS SÉRICO .....	39
4.1.2 CREATININA SÉRICA .....	40
4.1.3 URÉIA SÉRICA .....	40
4.2 ANÁLISES HISTOLÓGICAS .....	41



4.2.1 NEUTRÓFILOS .....	41
4.2.2 EDEMA .....	42
4.2.3 CONGESTÃO .....	42
4.2.4 MONOMORFONUCLEARES .....	43
4.2.5 TECIDO DE GRANULAÇÃO .....	44
4.2.6 FIBROSE .....	44
4.2.7 ESCORE DETALHADO .....	45
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>54</b>
<b>DOCUMENTOS CONSULTADOS .....</b>	<b>58</b>
<b>APÊNDICE 1 – MÉDIAS DE PESO INICIAL E TEMPO CIRÚRGICO POR GRUPO .....</b>	<b>60</b>
<b>APÊNDICE 2 – DOSAGENS SÉRICAS DE TACROLIMUS (NG/ML) .....</b>	<b>61</b>
<b>APÊNDICE 3 – DOSAGENS SÉRICAS DE CREATININA (MG/DL) .....</b>	<b>62</b>
<b>APÊNDICE 4 – DOSAGENS SÉRICAS DE URÉIA (MG/DL) .....</b>	<b>63</b>
<b>APÊNDICE 5 – ESTATÍSTICA COMPARATIVA DOS VALORES DE TACROLIMUS UTILIZANDO TESTE T DE STUDENT .....</b>	<b>64</b>
<b>APÊNDICE 6 – ESTATÍSTICA COMPARATIVA DOS VALORES DE CREATININA COM TESTE DE MANN-WHITNEY .....</b>	<b>65</b>
<b>APÊNDICE 7 – ESTATÍSTICA COMPARATIVA DOS VALORES DE URÉIA UTILIZANDO TESTE T DE STUDENT .....</b>	<b>66</b>
<b>APÊNDICE 8 – INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS INFLAMATÓRIAS DE CADA RATO DO GRUPO CONTROLE E MÉDIAS .....</b>	<b>67</b>
<b>APÊNDICE 9 – INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS INFLAMATÓRIAS DE CADA RATO DO GRUPO SHAM E MÉDIAS .....</b>	<b>68</b>
<b>APÊNDICE 10 – INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS INFLAMATÓRIAS DE CADA RATO DO GRUPO T1 E MÉDIAS .....</b>	<b>69</b>
<b>APÊNDICE 11 – INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS INFLAMATÓRIAS DE CADA RATO DO GRUPO T2 E MÉDIAS .....</b>	<b>70</b>
<b>APÊNDICE 12 – INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS INFLAMATÓRIAS DE CADA RATO DO GRUPO T3 E MÉDIAS .....</b>	<b>71</b>
<b>APÊNDICE 13 – p-VALOR PELO TESTE DE QUI-QUADRADO .....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXO PARECER DO CEUA .....</b>	<b>74</b>



## **01 INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

O processo de reparo das feridas pode ser dividido basicamente em três fases, *inflamatória* que visa limitar a quantidade de lesão e prevenir lesão adicional, *proliferativa* que é o processo reparador com reepitelização, síntese da matriz e neovascularização e, *maturacional* que é o período de contração da cicatriz com ligação cruzada de colágeno, retração e perda do edema (SABISTON, 2004).

Inúmeros fatores estão relacionados à alterações da cicatrização, retardando o processo, à exemplo as infecções, hipóxia, diabetes, radiação ionizante, envelhecimento e desnutrição (SABISTON, 2004). Além disso, estudos tem demonstrado que algumas drogas exógenas inibem a cicatrização. Agentes quimioterápicos como adriamicina, mostarda nitrogenada, metotrexato, doxorubicina inibem a proliferação celular, o número de plaquetas, células inflamatórias e fatores de crescimento. O tamoxifen, um modulador do receptor estrogênico utilizado para neoplasia mamária, além de reduzir a proliferação celular, parece reduzir a resistência à ruptura da ferida. Os glicocorticóides prejudicam a proliferação dos fibroblastos e a síntese de colágeno, além de reduzir a quantidade de tecido de granulação (THOMAS, 1997).

O tacrolimus, pertencente ao grupo dos inibidores da calcineurina, tem o efeito de inibir a transdução de sinais entre os linfócitos T, suprimir a proliferação das células B induzidas pelas células T-Helper e inibir a formação de linfócitos citotóxicos, que são os principais responsáveis pela rejeição de transplante (ASTELLAS PHARMA US, 2005). É um imunossupressor potente, no entanto apresenta possíveis efeitos indesejáveis como diminuição à reação vacinal, leucopenia, trombocitopenia, disfunções renais, sintomas uretrais e da bexiga (ASTELLAS PHARMA US, 2005). Os efeitos citados poderiam estar relacionados com alterações da cicatrização de vias urinárias, o que nos leva a pesquisar mais a fundo esse tema.

A cicatrização e os efeitos de imunossupressores em diversos órgãos, como intestino, pâncreas e fígado tem sido bem descritas por alguns autores em diversas situações. Moreira descreveu que o tacrolimus produz alterações

histológicas como edema, infiltrado inflamatório e atrofia no pâncreas, em vigência de pancreatite aguda induzida, em modelos experimentais (MOREIRA *et al.*, 2011). Gama Filho publicou sobre os efeitos do tacrolimus na regeneração hepática de ratos pós hepatectomia (GAMA FILHO *et al.*, 2010). Vizzotto Junior quantificou a resposta inflamatória em estudo sobre a influência da cisplatina administrada no pré e no pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos (VIZZOTTO JUNIOR *et al.*, 2003)

Poucos são os estudos na literatura que tratam especificamente da cicatrização de bexiga sob a influência da droga tacrolimus. Considerando o fato de que a imunossupressão com tacrolimus e o rim único isquêmico são os estados basais de pacientes transplantados renais, mais estudos para avaliar a cicatrização vesical e a função renal nesse contexto são necessários.

## 1.1 OBJETIVOS

1) Realizar análise das dosagens de tacrolimus, creatinina e uréia dos animais do estudo e comparar os valores entre os grupos.

2) Realizar análise histopatológica, com graduação de neutrófilos, edema, congestão vascular, monomorfonucleares, tecido de granulação e fibrose, no tecido vesical em cicatrização de ratos com rim único submetido à isquemia e reperfusão, imunossuprimidos com tacrolimus.



## **02 REVISÃO DE LITERATURA**

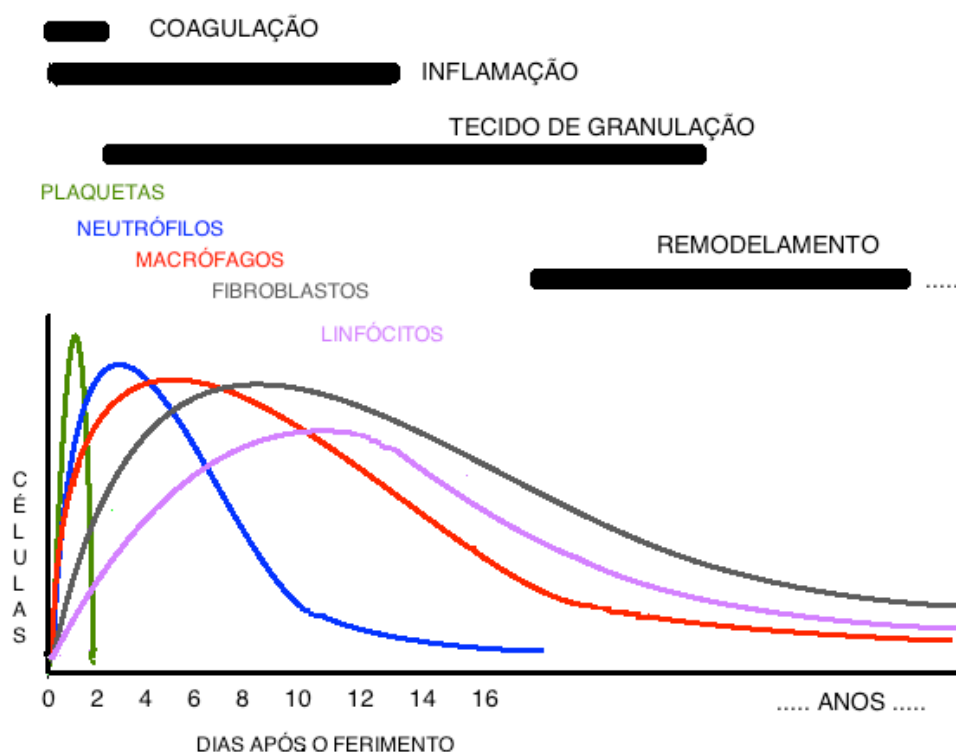


## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CICATRIZAÇÃO

Considerou-se no presente estudo três fases do processo de cicatrização: Inflamação, fase proliferativa (correspondente à formação de tecido de granulação e deposição de matriz extracelular) e maturacional ou de remodelamento (FIGURA 1). A coagulação nem sempre é considerada uma fase da cicatrização.

FIGURA 1: FASES DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO(ADAPTADO DE HATANAKA e CURI, 2007)



Conforme descrito anteriormente, a fase inflamatória do processo de cicatrização inicia-se imediatamente após a injúria local e é marcada basicamente por dois eventos, hemostasia e inflamação. Representa uma tentativa do tecido em limitar a lesão através da cessação do sangramento, selamento da superfície da ferida e remoção de tecido necrótico, resíduos

---

estranhos e bactérias existentes (SABISTON, 2004; HATANAKA e CURI, 2007 ).

Com a lesão tecidual, ocorre exposição de colágeno e plaquetas e, após a vasoconstrição inicial, segue um processo de vasodilatação mediado principalmente por substâncias vasoativas como histamina e serotonina, agregação plaquetária e ,finalmente, formação de coágulo. Inicia-se então um processo de migração celular, com predomínio de neutrófilos, que possuem função fagocitária e antimicrobiana, ocorrendo nas primeiras 24 horas. O segundo grupo de células envolvido no processo inflamatório são os macrófagos, essenciais ao processo, os quais possuem sua quimiotaxia marcada nas primeiras 24 a 48 horas e atuam em diversas frentes, como debridamento da ferida, regulação da síntese da matriz, recrutamento celular e angiogênese. Estes processos são mediados por substância produzidas ou liberadas pelos macrófagos, como fatores de crescimento, (TGF- $\beta$ , EGF, PDGF) citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6), enzimas (colagenase, elastase), fibronectina. Por volta do quinto dia aparecem os linfócitos, que exercem seus efeitos principalmente sobre os fibroblastos através de citocinas estimuladoras e inibidoras, como IL-2, fator ativador do fibroblasto, TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (SABISTON, 2004).

A segunda fase do processo cicatricial, chamada proliferativa, é marcada basicamente por três eventos: Angiogênese; Fibroplasia; e Epitelização. Caracteriza-se pela formação de tecido de granulação, constituído por um leito capilar, fibroblastos, macrófagos, um frouxo arranjo de colágeno, fibronectina e ácido hialurônico. Quanto à angiogênese, seguindo a lesão vascular ocorre uma migração de células endoteliais promovida por fatores como FGF, PDGF E TGF- $\beta$ . A divisão destas células endoteliais migratórias resulta na formação de um túbulo ou luz e, por fim, ocorre a deposição da membrana basal, resultando em maturação capilar. No que diz respeito à fibroplasia, os fibroblastos, diferenciados a partir de células mesenquimatosas, são quimioatraídos para o local inflamatório onde se dividem e produzem os componentes da matriz extracelular. Sua proliferação é estimulada por fatores como TGF- $\beta$ , PDGF, EGF e IGF-1 e estão relacionados com a síntese de colágeno, que é iniciada ainda na fase inflamatória. Transcorre um período, marcado pela diferenciação completa

dos fibroblastos e o aparecimento de colágeno na ferida, que dura de 3 a 5 dias e é chamado de fase de retardo. Após quatro semanas ocorre um declínio da taxa de síntese de colágeno e a ferida entra em uma fase de maturação do colágeno, que pode durar meses ou até mesmo anos. O terceiro evento desta fase consiste na epitelização, onde ocorre a formação de uma rede celular coesa e a coaptação entre epiderme, membrana basal e derme (SABISTON, 2004).

Um conceito importante no processo cicatricial é o de matriz extracelular. Esta consiste em um arcabouço estabilizador da estrutura física dos tecidos, regulando de maneira dinâmica o comportamento das células que fazem contato com a mesma. As células em seu interior produzem constituintes macromoleculares como glicosaminoglicanas, proteoglicanas e proteínas fibrosas, como colágeno, elastina, fibronectina e laminina (ALBERTS B, *et al.*, 2002).

O colágeno é uma molécula rica em glicina e prolina, em forma de tripla hélice, encontrada em todos os animais multicelulares e correspondem a cerca de 25 % da massa protéica dos mamíferos. Existem mais de 20 tipos de colágeno e os principais componentes do tecido conjuntivo são os tipos I, II, III, V e XI (ALBERTS B *et al.*, 2002). Durante o processo de cicatrização há uma dinâmica prevalência do tipo de colágeno. Por exemplo: Inicialmente há prevalência do tipo II, posteriormente tipo I (SABISTON, 2004).

A última etapa do processo cicatricial consiste em um processo de contração da ferida, um movimento centrípeto de toda a estrutura de pele circulante, reduzindo a quantidade de cicatriz desorganizada. Este processo ocorre graças à ação dos miofibroblastos (SABISTON, 2004).

## 2.2 IMUNOSSUPRESSÃO

A imunossupressão clínica foi iniciada nos anos 50 com uso de glicocorticóides associados 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 (ABBUD FILHO e RAMALHO, 1997). A partir dos anos 90 agentes químicos como tacrolimus, micofenolato mofetil, sirolimus, mizoribina, brequinar,

gusperimus e deoxiespergualina passaram a ser utilizados em transplantes de órgãos (ABBUD FILHO e RAMALHO, 1997).

A resposta imunológica contra um órgão transplantado é um processo dependente da célula T, que após encontrar-se com 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 e RAMALHO, 1997). A seqüência que leva à 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, via do inositol trifosfato, calcineurina e diacilglicerol e proteinoquinase. Apenas o primeiro sinal não é o suficiente, portanto 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, por exemplo, CD28 com B71-1. Os dois primeiros sinais ligam os eventos da membrana citoplasmática aos eventos nucleares, acarretando a produção de citocinas, que geram na célula T a passagem da fase G0 para a fase G1. Porém, 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 na síntese de DNA (ABBUD FILHO e RAMALHO, 1997).

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, anticorpos anti-receptor da IL-2), 2. drogas que afetam a síntese das citocinas (glicocorticóides, ciclosporina, tacrolimus, sirolimus e leflunomide) e 3. drogas que afetam a síntese de nucleotídeos

(purinas como azatioprina e micofenolato mefotil e pirimidinas, como brequinar) (ABBUD FILHO e RAMALHO, 1997).

### 2.2.1 TACROLIMUS

O FK 506 (tacrolimus - Prograf®) é um macrolídeo produzido pelo fungo *Streptomyces tsukubaensis* com potente atividade imunossupressora. Atua nas vias bioquímicas intracelulares dependentes de cálcio e de suas interações com o receptor citoplasmático, a proteína acopladora do FK 506. Inibe então os genes precoces de ativação das células T bloqueando a expressão do RNA mensageiro de várias citocinas (ABBUD FILHO e RAMALHO, 1997). Pertence ao grupo dos inibidores da calcineurina, assim como a ciclosporina, e compõe a pedra fundamental da terapia imunossupressora padrão (GASTON, 2006).

### 2.2.2 IMUNOSSUPRESSÃO E CICATRIZAÇÃO

Independente do esquema terapêutico, as drogas imunossupressoras possuem efeitos adversos como nefrotoxicidade (CATANEO-DÁVILLA *et al.*, 2009), efeitos de ordem cardiovascular (KRÄMER *et al.*, 2003), diabetes mellitus (KASISKE BL, *et al.*, 2003), efeitos cosméticos como hirsutismo, hiperplasia gengival, alopecia (MARGREITER *et al.*, 2002; KOHNLE *et al.*, 1999; SHAPIRO *et al.*, 1998). Além destes, pode haver influência no processo de cicatrização e regeneração (GAMA FILHO, *et al.*, 2010; FISHEL *et al.*, 1983; EKICI *et al.*, 2007; DEAN *et al.*, 2004).

Fishel R *et al.*, verificaram um atraso no processo cicatricial em ratos com uso de ciclosporina, através da análise de hidroxiprolina (FISHEL *et al.*, 1983).

Dean PG *et al.*, compararam, através de um estudo prospectivo, os índices de complicações referentes a cicatrização de parede em pacientes submetidos à transplante renal, em uso de tacrolimus versus sirolimus. Verificaram um maior índice de complicações no grupo onde foi empregado sirolimus (DEAN *et al.*, 2004).

Schaffer, em 1998, descreveu de forma pioneira o efeito deletério do tacrolimus na cicatrização. Ele descreveu que o tratamento de ratos com 2mg/kg ao dia de tacrolimus, durante 10 dias, reduziu a concentração de óxido nítrico local e a deposição de colágeno (SCHAFFER *et al.*, 1998).

Schaffer e Fuchs, em 2005, observaram redução na cicatrização da derme de animais tratados com tacrolimus, no entanto, em estudo paralelo sobre cicatrização intestinal, os mesmos autores não encontraram diferença ao uso de tacrolimus (SCHAFFER *et al.*, 2005).

### 2.2.3 IMUNOSSUPRESSÃO E FUNÇÃO RENAL

Quando se trata de 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. Estes esquemas podem consistir, por exemplo, em uma associação de um inibidor da calcineurina à um agente antiproliferativo e um corticóide (SAMANIEGO *et al.*, 2006; HARDINGER *et al.*, 2004; ALBERÚ e URREA, 2005). Entre as drogas muito utilizadas, podemos mencionar o tacrolimus (Prograf®).

Os inibidores da calcineurina, à exemplo o tacrolimus e a ciclosporina, alteram a hemodinâmica glomerular, resultando em diminuição da filtração glomerular (GARCIA *et al.*, 2004).

Avaliando receptores de transplante hepático com insuficiência renal crônica, Ponton, em 2010, relatou que os inibidores da calcineurina são os principais fatores patogênicos para a disfunção renal em receptores de órgãos sólidos (PONTON *et al.*, 2010).

### 2.3 ISQUEMIA E REPERFUSÃO

As lesões de reperfusão são descritas como as alterações funcionais e estruturais que ocorrem durante o restabelecimento do fluxo após um período de isquemia. A restauração do fluxo sanguíneo pode resultar em vários efeitos deletérios, como necrose de células irreversivelmente lesadas,

acentuado edema celular (*cell swelling*) e restauração não uniforme do fluxo para todas as porções do tecido. Esta restauração caótica do fluxo tissular é conhecida como fenômeno do não refluxo (*no reflow phenomenon*), que é o resultado de um círculo vicioso de disfunção endotelial vascular, redução da perfusão local, mais alterações disfuncionais, mais edema, etc (EVORA *et al.*, 1996).

A isquemia provoca lesões pela falha na fosforilação oxidativa e a morte celular é devido à depleção de ATP. O ATP é necessário para o funcionamento da bomba de sódio-potássio, mantendo altos níveis intracelulares de potássio e baixos níveis de sódio. Quando a bomba de sódio-potássio é prejudicada, sódio e água difundem para o interior da célula, causando o fenômeno de edema celular e, por conseqüência, o fenômeno do não refluxo (CAMPBELL-WALSH, 2007)

### 2.3.1 ISQUEMIA/REPERFUSÃO E IMUNOSSUPRESSÃO

Algumas drogas imunossupressoras têm efeito nefrotóxico bem estabelecido. Outras drogas tem efeito inócuo ou até podem melhorar a função renal. Quando um imunossupressor é associado ao fenômeno de isquemia e reperfusão de um órgão, o efeito da droga pode se tornar mais evidente. Cologna, em 2008, estudando a ação da ciclosporina A em rins de ratos submetidos à isquemia normotérmica e reperfusão, concluiu que a droga protegeu a função renal e reduziu a lesão tecidual de rins submetidos a 40 minutos de isquemia e reperfusão subsequente (COLOGNA *et al.*, 2008)

### 2.3.2 ISQUEMIA/REPERFUSÃO E CICATRIZAÇÃO

O órgão que está em processo de reparo de um ferimento pode ser submetido a isquemia antes, durante ou após a reparação tecidual. Alguns autores utilizam essa associação de eventos para o estudo da cicatrização. Miranda, em 2010, demonstrou que o azul de metileno não mostrou efeitos benéficos na cicatrização de anastomoses intestinais submetidas à isquemia e reperfusão em ratos (MIRANDA *et al.*, 2010). Poucos são os estudos que

---

analisam os efeitos da isquemia e reperfusão de um órgão sólido na cicatrização de outro órgão.

### 2.3.3 ISQUEMIA/REPERFUSÃO E FUNÇÃO RENAL

O tempo de isquemia renal está diretamente relacionado à piora da função renal. Thompson, em 2007, estudando sobre o impacto do tempo de isquemia durante cirurgia renal em rim único de humanos, identificou que a isquemia normotérmica durante mais de 20 minutos e isquemia fria durante mais de 35 minutos aumentam o risco de falência renal aguda. Além disso, o mesmo autor comparou grupos com e sem clampeamento vascular renal e encontrou que isquemia normotérmica por mais de 20 minutos aumentou a chance de falência renal crônica (41% x 19%) e diálise permanente (10% x 4%) (THOMPSON *et al.*, 2007)

Meyer, em 2011, também relatou alterações no fluxo de rins murinos submetidos à isquemia e reperfusão. Em seu estudo, os rins submetidos à isquemia durante 30 minutos apresentaram uma restituição maior do fluxo sanguíneo após reperfusão quando comparados à rins submetidos à 60 minutos de isquemia (MEYER *et al.*, 2011).



## **03 MATERIAL E MÉTODO**



### 3 MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Foram utilizados 50 ratos machos da raça Wistar, idade média de 8 semanas, oriundos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, tendo média de pesos iniciais entre 221 à 245,1 gramas (APÊNDICE 1). Foram divididos aleatoriamente em cinco grupos de 10 animais, no entanto ocorreram 3 óbitos no ato cirúrgico, restando 47 ratos no experimento (divididos em grupos – Quadro 1). Um dos grupos (controle) não foi operado. Os 4 grupos restantes foram operados, seguindo técnica asséptica.

Quadro 1: Grupos

Grupos	Nº de Animais	Procedimento
CONTROLE (C)	10	Não Submetido à cirurgia + SF0,9%
SHAM (SH)	8	Submetido à cirurgia + SF0,9%
T 1	10	Submetido à cirurgia + Tacrolimus 1mg/kg
T 2	10	Submetido à cirurgia + Tacrolimus 0,1mg/kg
T 3	9	Submetido à cirurgia + Tacrolimus 10mg/kg

#### 3.2 PADRONIZAÇÃO E NORMAS DO ESTUDO

Este projeto foi aprovado em 10 de julho de 2009 pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da 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 Universidade Federal do Paraná (NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DE DOCUMENTOS CIENTÍFICOS. UFPR. 2007).

### 3.3 AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO

Os animais foram triados para exclusão daqueles com possíveis doenças. Foram alocados em caixas de polipropileno, com sepilho selecionado, substituído diariamente (FIGURA 2). As caixas também eram lavadas diariamente. O fornecimento de água e comida foi *ad libitum*, com ração adequada para a raça Wistar. As salas para manutenção dos animais apresentavam sistema de iluminação para claro e escuro, respeitando-se o ciclo diuturno dos animais, a cada 12 horas.

FIGURA 2: RATOS WISTAR



### 3.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

#### 3.4.1 PRÉ OPERATÓRIO

Os animais foram mantidos em jejum de 8 horas. Todos foram pesados. Cerca de 30 minutos antes do procedimento utilizou-se Diazepam intra-muscular como pré-anestésico, na dose de 5mg/kg (BIOTÉRIO DE PRODUÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO DA FCF E IQ DA USP, 2010).

### 3.4.2 PER OPERATÓRIO

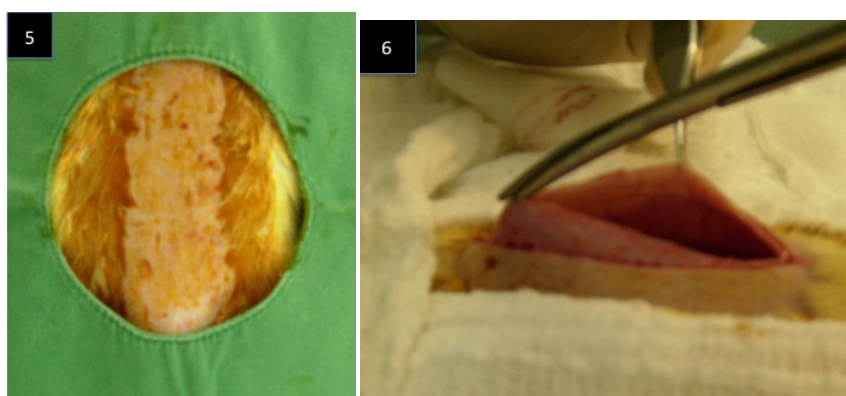
Para a realização do procedimento cirúrgico os animais foram anestesiados com uma associação de Xilazina 10mg/kg (Xilazin® - Syntec do Brasil) e Cetamina 90mg/Kg (Cetamin® - Syntec do Brasil) intraperitoneal (BIOTÉRIO DE PRODUÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO DA FCF E IQ DA USP, 2010) (FIGURAS 3 E 4).

FIGURAS: 3) ANESTÉSICOS;  
4) TÉCNICA DE ANESTESIA INTRA-PERITONEAL.

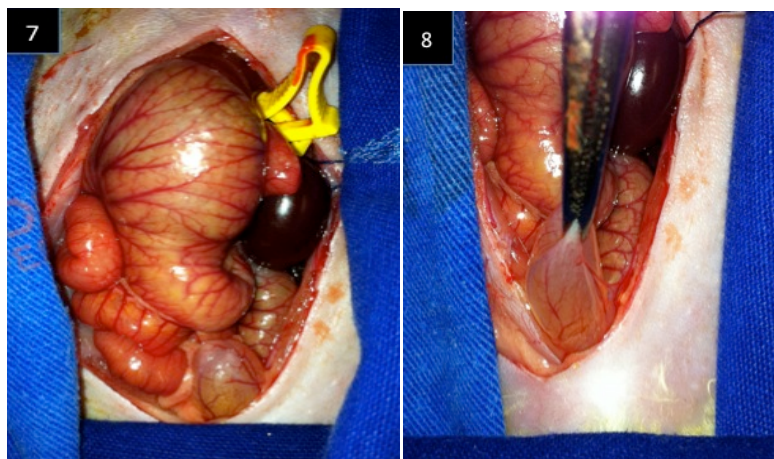


O procedimento consistiu em laparotomia mediana de 5cm (FIGURAS 5 E 6), nefrectomia direita, clampeamento vascular renal à esquerda por 20 minutos e reperfusão subsequente (FIGURA 7), seguido de dissecação vesical (FIGURA 8).

FIGURAS: 5)CAMPO CIRÚRGICO; 6) LAPAROTOMIA MEDIANA



FIGURAS: 7) CLAMPEAMENTO RENAL ESQUERDO;  
8) DISSECÇÃO VESICAL



Foi realizada uma cistotomia longitudinal de um centímetro em linha média (FIGURA 9). A parede vesical foi aproximada em 2 planos ( primeiro plano com pontos contínuos e segundo com pontos separados), utilizando fio monofilamentar absorvível sintético poliglecaprone 4.0 (Monocryl® - Ethicon) (FIGURA 10).

FIGURA 9: CISTOTOMIA

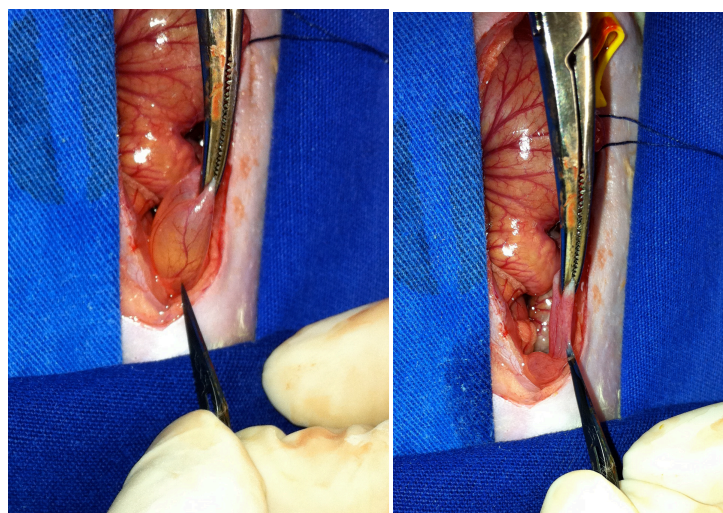
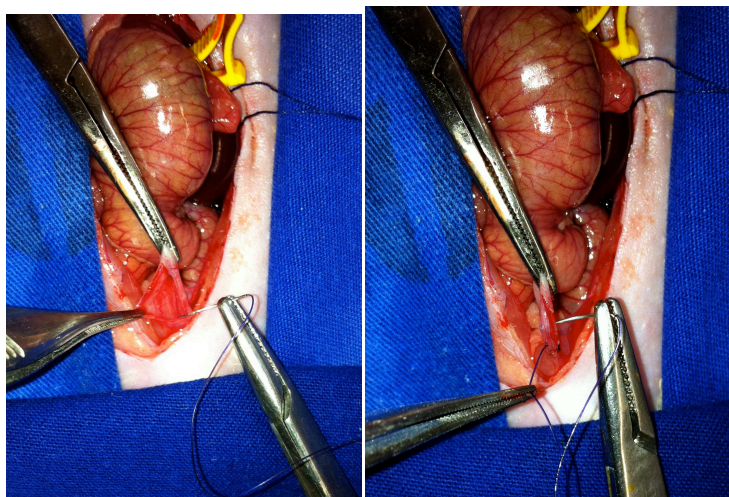


FIGURA 10: CISTORRAFIA



Por fim, fechamento da parede abdominal em 2 planos, ambos com pontos contínuos, utilizando fio de nylon 3.0 (Mononylon® - Ethicon). Durante todo o procedimento, os ratos foram mantidos sob anestesia.

### 3.4.3 PÓS OPERATÓRIO

Todos os animais receberam no primeiro dia de Pós-Operatório medicação analgésica (dipirona) intramuscular associada à hidratação diária. Receberam dose diária de 0,5ml de solução (cada grupo recebeu um tipo de solução descrita na sequência) via gavagem com técnica e sonda de calibre adequados (MAAHS, 2008; CLOSS ONO, 2009) (FIGURAS 11, 12 E 13).

FIGURAS: 11) TÉCNICA DA PEGA DO ANIMAL; 12) SONDA DE GAVAGEM

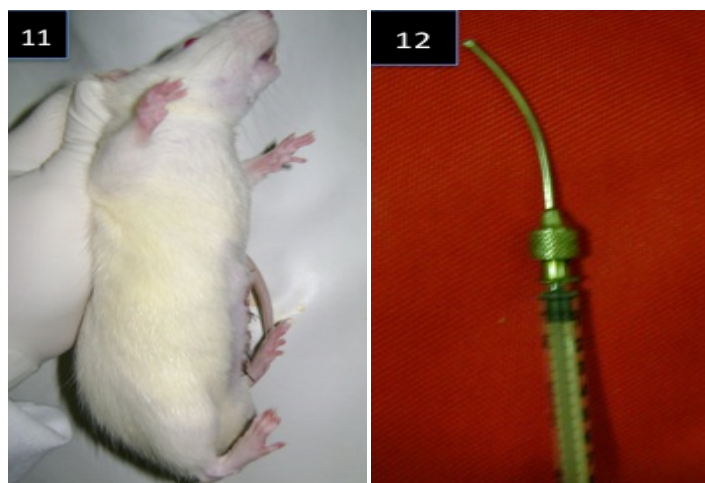


FIGURA 13: TÉCNICA DE GAVAGEM



Os animais dos grupos CONTROLE e SHAM receberam solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%, o T1 recebeu tacrolimus (Prograf®, Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda.) diluído na solução fisiológica 0,9% na dose de 1mg/Kg/dia, o T2 recebeu tacrolimus diluído na solução fisiológica 0,9% na dose de 0,1mg/Kg/dia e o T3 recebeu tacrolimus diluído na solução fisiológica 0,9% na dose de 10mg/Kg/dia. A diluição foi feita no momento da administração devido à molécula do tacrolimus permanecer estável por apenas 24 horas quando diluída em solução de NaCl. Foram mantidos confinados, alimentados diariamente com ração própria para a espécie (Nuvilab®) e então sacrificados no 14º dia de experimento, contando como dia zero o dia da cirurgia.

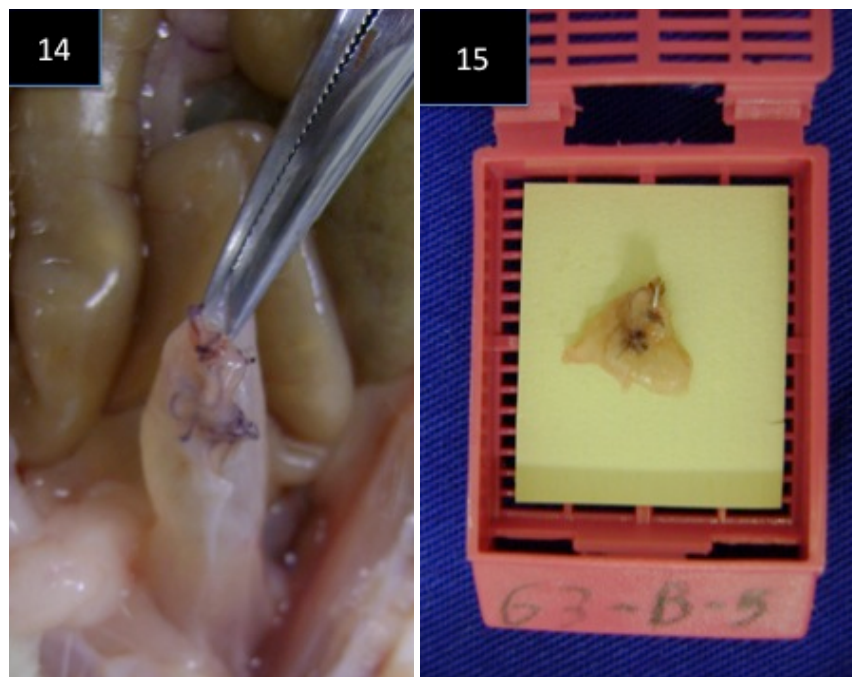
### 3.5 COLETA DE AMOSTRAS

No momento da eutanásia, utilizou-se anestesia profunda com associação de Xilazina (10mg/kg) e Cetamina (90mg/kg). Realizada então fixação do animal em tábua cirúrgica com fita adesiva, antissepsia abdominal e torácica, toracotomia mediana, punção cardíaca com seringa de 10ml, agulha 25x8mm, para retirada de amostra de sangue e indução de parada cardio-respiratória por exsanguinação. O sangue coletado, cerca de 6 a 8ml

por rato, foi armazenado em 2 frascos, coletando-se cerca de 3 a 4ml em cada frasco; 1 frasco 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 análise macroscópica do sitio cirúrgico, identificação e delicado isolamento cirúrgico da bexiga (FIGURA 14). Realizou-se então cistectomia com secção vesical ao nível do trígono, abertura longitudinal posterior da bexiga até a cúpula, evitando-se a manipulação da cicatriz na região anterior. A peça foi preparada com a mucosa em contato com o papel filtro, a cicatriz da cistorrafia em sentido longitudinal, o material foi colocado em cassete plástico e a fixação feita em formalina 10% (FIGURA 15). O material fixado em formalina foi enviado ao laboratório de patologia para o restante dos preparos e análises.

FIGURAS: 14) MOMENTO DA CISTECTOMIA  
15) TECIDO VESICAL PARA ANÁLISE



### 3.6 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

#### 3.6.1 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As amostras de sangue foram transportadas em ambiente sob temperatura controlada, e estavam devidamente identificadas. Foram entregues ao bioquímico responsável em laboratório de análises clínicas. Os seguintes métodos e unidades foram utilizados:

- Dosagem de tacrolimus, pelo método de quimioluminescência (GEISELER, 1992). O aparelho utilizado foi: Architect I2000, marca Abbott. A unidade de medida foi nanogramas/dl;

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

#### 3.6.2 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

No laboratório de patologia, de maneira ordenada, o material que estava em formalina 10% foi submetido à lavagem, diafanização e inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram para microtomia, cortes de 4 $\mu$ m de espessura, e preparados em lâminas, coradas através da técnica de Hematoxilina-Eosina, para análise por microscopia ótica comum. A patologista não sabia à quais grupos pertenciam cada lâmina (estudo cego). Na microscopia, realizou-se análise e quantificação das seguintes variáveis inflamatórias: Neutrófilos, Edema, Congestão, Monomorfonucleares, Tecido de Granulação e Fibrose (FIGURAS 16, 17 E 18).

FIGURA 16: HISTOLOGIA EM HE DEMONSTRANDO EDEMA (ÁREAS MAIS CLARAS), VASOS CONGESTOS (\*) E NEUTRÓFILOS (SETA). (AUMENTO 100X)

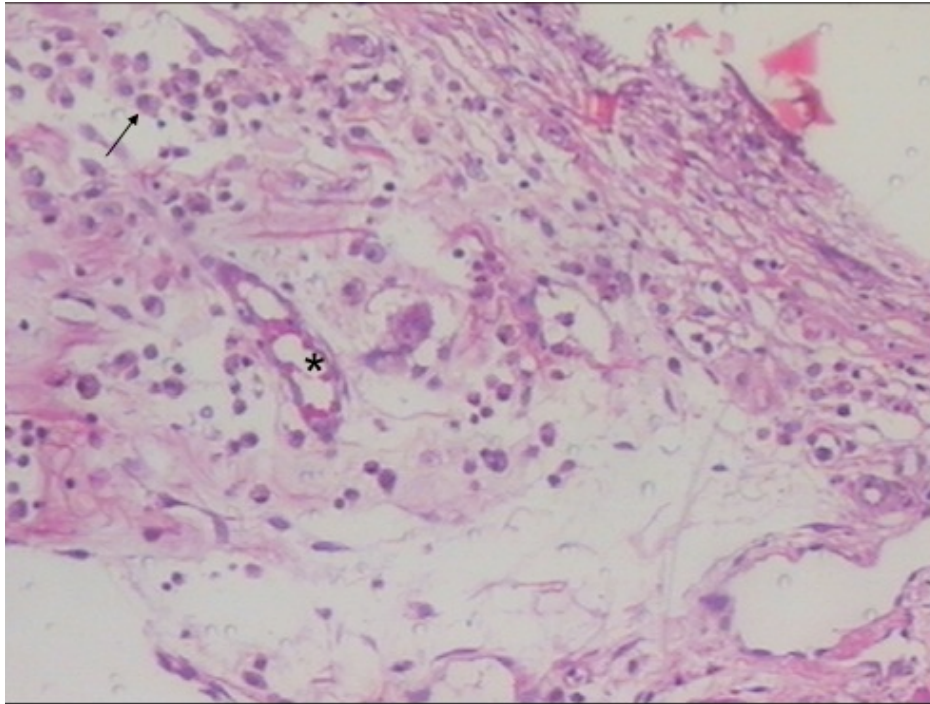


FIGURA 17: HISTOLOGIA COM MUCOSA PRESERVADA E DISCRETA FIBROSE EM LÂMINA PRÓPRIA (SETAS). (AUMENTO 40X)

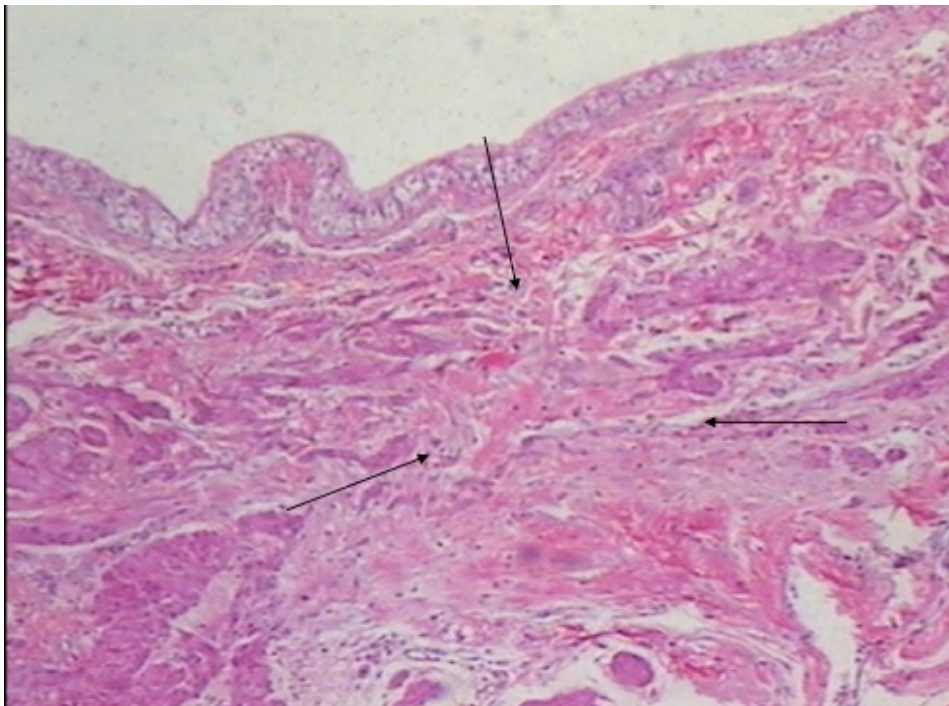
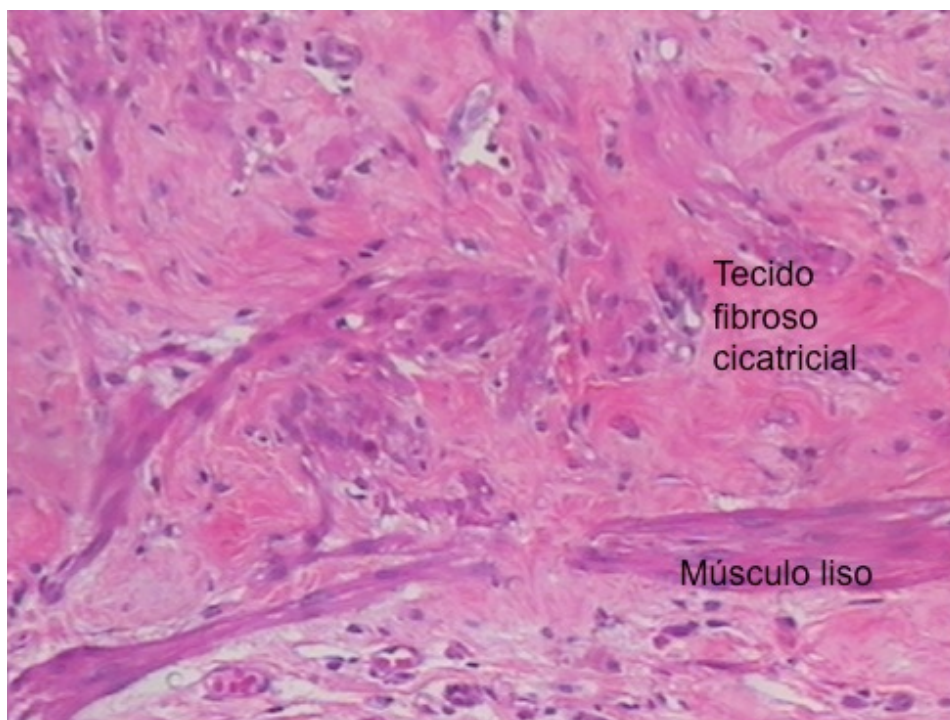


FIGURA 18: HISTOLOGIA COM FIBROSE PRÓXIMA AO MUSCULO LISO  
(AUMENTO 200X)



As variáveis inflamatórias foram classificadas em acentuado, moderado, discreto e ausente, de acordo com a intensidade em que foram encontradas; e transformadas em variáveis quantitativas através da atribuição de índice numérico aos achados histológicos. O edema, a congestão e os neutrófilos foram considerados indicativos de inflamação aguda, sendo à essas variáveis atribuído sinal negativo. As células mononucleares, o tecido de granulação e a fibrose foram os indicativos de inflamação crônica, sendo atribuído sinal positivo. Os possíveis valores e variáveis são melhor demonstrados na TABELA 1.

<b>Tabela 1</b>	<b>Intensidade dos Achados Histológicos</b>			
Variáveis Inflamatórias	Acentuada	Moderada	Discreta	Ausente
Neutrófilos	-3	-2	-1	0
Edema	-3	-2	-1	0
Congestão	-3	-2	-1	0
MMN	3	2	1	0
T Granulação	3	2	1	0
Fibrose	3	2	1	0

Após a atribuição do índice numérico aos achados histológicos, realizamos a somatória dos índices representantes de inflamação aguda com os índices representantes de inflamação crônica em cada rato, encontrando dessa forma o Escore Histológico Detalhado. Esse Escore fornece uma estimativa da fase do processo inflamatório em que se encontra a cicatriz de cada animal. Realizando-se a média dos Escores de cada grupo, pôde-se comparar os grupos entre si. Também realizamos a comparação de cada achado histológico individualmente entre os grupos.

### 3.6.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foram aferidas as médias, desvios padrão e medianas das variáveis inflamatórias, dos valores de tacrolimus sérico, creatinina e uréia. Para comparação das variáveis inflamatórias entre os grupos foi utilizado o teste não paramétrico de Qui-quadrado, com alfa 5% (significância  $p < 0,05$ ). Para comparação dos valores de tacrolimus sérico e uréia utilizou-se o teste T de Student (essas variáveis tiveram distribuição normal, na curva de Gauss). Para a análise dos valores de creatinina utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney (os grupos SH e T1 não apresentaram distribuição normal).



## **04 RESULTADOS**



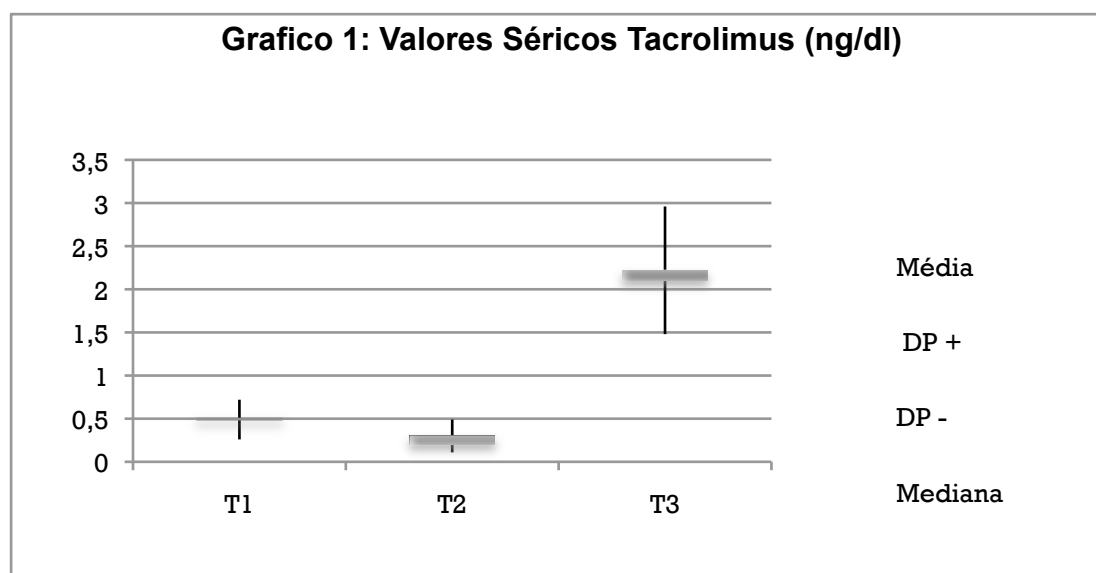
## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As amostras apresentaram quantidade suficiente para as análises em todos os ratos. Houve presença de tacrolimus nas dosagens séricas dos grupos que receberam a droga, o que comprova que houve absorção do medicamento administrado. Não houve perda de amostras no processamento do sangue analisado.

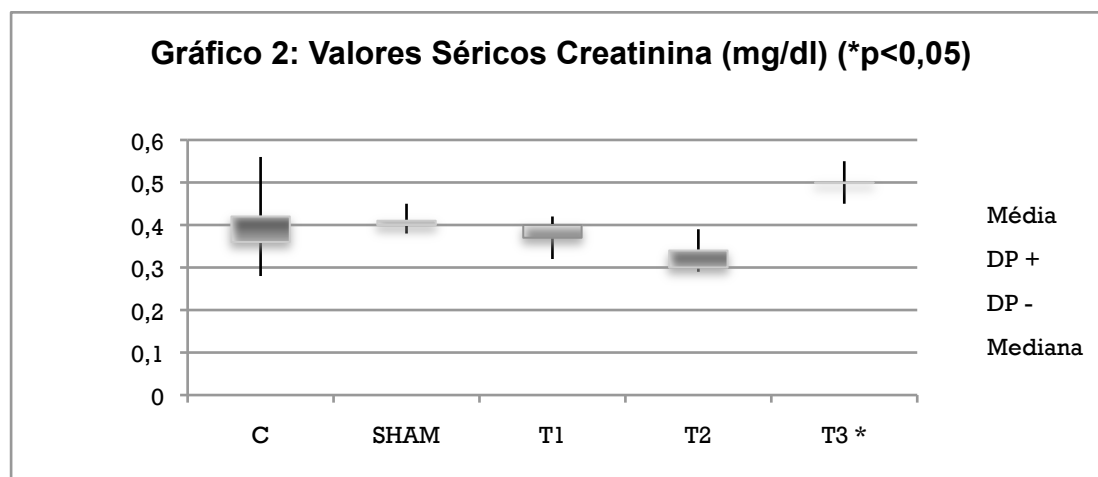
#### 4.1.1 TACROLIMUS SÉRICO

Os valores de tacrolimus mostraram que a administração de diferentes doses produziu níveis séricos diferentes entre os grupos. No grupo C e SHAM as dosagens de tacrolimus foram zero. No grupo T1 a média de valores séricos de tacrolimus foi  $0,490 \pm 0,228$  ng/dl. No grupo T2 a média foi de  $0,301 \pm 0,191$  ng/dl. No grupo T3 a média foi  $2,222 \pm 0,738$  ng/dl. Houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) nas doses de tacrolimus sérico entre os grupos T1 x T3 ( $p = 0,00008$ ) e T2 x T3 ( $p = 0,00003$ ). Não houve diferença significativa nas doses de tacrolimus entre os grupos T1 x T2 ( $p = 0,0667$ ) (GRÁFICO 1). Os valores individuais de cada rato estão apresentados no apêndice 2.



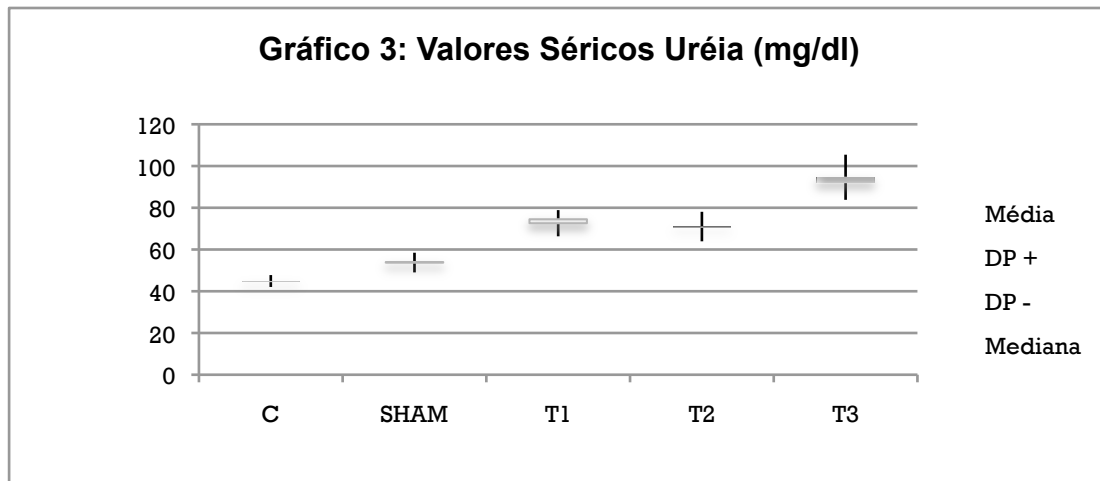
#### 4.1.2 CREATININA SÉRICA

As dosagens de creatinina dos grupos foram: C com média de  $0,42 \pm 0,14$  mg/dl; SHAM com média de  $0,41 \pm 0,03$  mg/dl; T1 de  $0,37 \pm 0,05$  mg/dl; T2 de  $0,34 \pm 0,05$  mg/dl e T3 de  $0,50 \pm 0,05$  mg/dl. Não houve diferença estatística quando comparados os grupos C, SHAM, T1 e T2 entre si. No entanto, houve diferença significativamente estatística quando se comparou os valores de Creatinina dos grupos SH, T1 e T2 com o grupo T3 (GRÁFICO 2). Os valores individuais de cada rato estão apresentados no apêndice 3.



#### 4.1.3 URÉIA SÉRICA

As dosagens de uréia nos grupos foram: C com média de  $44,90 \pm 2,85$  mg/dl; SHAM com média de  $53,75 \pm 4,71$  mg/dl; T1 de  $72,60 \pm 6,27$  mg/dl; T2 de  $71,00 \pm 7,07$  mg/dl e T3 de  $94,62 \pm 10,81$  mg/dl. Apenas a comparação T1 x T2 não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Todos os outros grupos comparados entre si apresentaram  $p < 0,05$  (GRÁFICO 3). Os valores individuais de cada rato estão apresentados no apêndice 4.



## 4.2 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Para apresentação dos achados histológicos foram utilizadas as médias das graduações histológicas. O sinal negativo apenas representa quais são as variáveis de fase aguda, não significando que os valores mais negativos são menores. As graduações histológicas individuais de cada rato encontram-se nos apêndices 8, 9, 10, 11 e 12.

### 4.2.1 NEUTRÓFILOS

O grupo Controle não apresentou infiltrado neutrofílico (Ausente = 0). O grupo SHAM apresentou a maior média de neutrófilos, ou seja -0,375. Todos os grupos submetidos ao uso de tacrolimus (T1, T2 e T3) apresentaram menor graduação do infiltrado neutrofílico se comparados ao grupo SHAM ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatística quando comparados entre si os grupos com uso da droga. Os valores médios da graduação do infiltrado neutrofílico se encontram na TABELA 2.

<b>Tabela 2: Neutrófilos (Média)</b>	<b>C</b>	<b>SHAM</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>
Graduação do achado microscópico	0	-0,375	-0,1	-0,1	0
p valor (comparações)		xT1 (p=0,0137) xT2 (p=0,0137) xT3 (p=0,0075)	xT2 (p=0,9262) xT3 (p=0,2996)	xT3 (p=0,2996)	

#### 4.2.2 EDEMA

O grupo C teve uma baixa graduação de edema, ou seja -0,2. O grupo SHAM apresentou valor médio de -0,625 na graduação do edema. Todos os grupos com uso de tacrolimus apresentaram menor graduação de edema se comparados ao grupo SHAM ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatística na comparação dos grupos com uso da droga entre si. Os valores médios da graduação do edema se encontram na TABELA 3.

<b>Tabela 3: Edema (Média)</b>	<b>C</b>	<b>SHAM</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>
Graduação do achado microscópico	-0,2	-0,625	-0,2	-0,2	-0,111
p valor (comparações)		xT1 (p=0,0150) xT2 (p=0,0150) xT3 (p=0,0094)	xT2 (p=0,5704) xT3 (p=0,2845)	xT3 (p=0,2845)	

#### 4.2.3 CONGESTÃO

O grupo C apresentou congestão vascular ausente. O SHAM novamente apresentou o maior valor de variável de fase aguda, sendo a

graduação média da congestão vascular de -0,75. Os grupos T1, T2 e T3 apresentaram graduações de congestão vascular significativamente menores se comparados ao SHAM ( $p < 0,05$ ), no entanto não houve diferença estatística se comparados entre si.

<b>Tabela 4: Congestão (Média)</b>	<b>C</b>	<b>SHAM</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>
Graduação do achado microscópico	0	-0,75	-0,3	-0,2	-0,444
p valor (comparações)		xT1 ( $p=0,0088$ ) xT2 ( $p=0,0062$ ) xT3 ( $p=0,0125$ )	xT2 ( $p=0,4129$ ) xT3 ( $p=0,4141$ )	xT3 ( $p=0,2535$ )	

#### 4.2.4 MONOMORFONUCLEARES

O grupo C apresentou infiltrado monomorfonuclear ausente (graduação = 0). O grupo SHAM apresentou graduação do infiltrado monomorfonuclear de 1,25. Os grupos T1, T2 e T3 apresentaram graduações menores de monomorfonucleares, quando comparados ao grupo SHAM ( $p < 0,05$ ). Os valores encontram-se na TABELA 5.

<b>Tabela 5: MMN (Média)</b>	<b>C</b>	<b>SHAM</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>
Graduação do achado microscópico	0	1,25	1	0,8	0,778
p valor (comparações)		xT1 ( $p=0,0091$ ) xT2 ( $p=0,0125$ ) xT3 ( $p=0,0154$ )	xT2 ( $p=0,1438$ ) xT3 ( $p=0,1765$ )	xT3 ( $p=0,2414$ )	

#### 4.2.5 TECIDO DE GRANULAÇÃO

Houve ausência de Tecido de Granulação no Controle. Todos os grupos apresentaram baixa quantidade de Tecido de Granulação, mas o SHAM novamente apresentou maior média (0,875), com  $p < 0,05$  se comparado aos grupos com uso de droga. Valores na TABELA 6.

<b>Tabela 6: Tecido de Granulação (Média)</b>	<b>C</b>	<b>SHAM</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>
Graduação do achado microscópico	0	0,875	0,4	0,1	0,444
p valor (comparações)		xT1 ( $p=0,0105$ ) xT2 ( $p=0,0154$ ) xT3 ( $p=0,0209$ )	xT2 ( $p=0,1760$ ) xT3 ( $p=0,2388$ )	xT3 ( $p=0,3488$ )	

#### 4.2.6 FIBROSE

O grupo Controle apresentou média de graduação da fibrose quase ausente (graduação = 0,3). O grupo SHAM apresentou graduação de 1,25. Todos os grupos com uso de tacrolimus apresentaram taxas significativamente maiores de fibrose se comparados ao grupo SHAM. Os valores encontram-se na TABELA 7.

<b>Tabela 7: Fibrose (Média)</b>	<b>C</b>	<b>SHAM</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>
Graduação do achado microscópico	0,3	1,25	1,7	2,5	2
p valor (comparações)		xT1 ( $p=0,0466$ ) xT2 ( $p=0,0015$ ) xT3 ( $p=0,0451$ )	xT2 ( $p=0,0090$ ) xT3 ( $p=0,2368$ )	xT3 ( $p=0,0087$ )	

#### 4.2.7 ESCORE DETALHADO

O Escore Detalhado, ou seja, valor resultante da somatória dos achados de variáveis de fase aguda com os de fase crônica, foi estabelecido em cada grupo. Quanto mais positivo o valor se apresenta, infere-se que a cicatriz encontra-se mais próxima da fase crônica da cicatrização. O grupo Controle apresentou Escore Detalhado muito próximo de zero (0,1). O grupo SHAM apresentou Escore 1,625. Todos os grupos com uso de Tacrolimus apresentaram Escores maiores, mais positivos. Houve pouca diferença no valor dos escores entre os grupos. Não foi realizada análise estatística desse Escore por ele não apresentar uma linearidade nos valores, ser apenas uma inferência à fase da cicatrização.

<b>Tabela 8: Escore Detalhado</b>	<b>C</b>	<b>SHAM</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>
AGUDA + CRÔNICA	0,1	1,625	2,5	2,9	2,666

## **05 DISCUSSÃO**

## 5 DISCUSSÃO

Os efeitos histológicos e bioquímicos do tacrolimus têm sido demonstrados em vários órgãos, em diversos estudos animais (MOREIRA, 2011; GAMA FILHO, 2010; INÁCIO, 2010). A avaliação de creatinina e uréia em ratos Wistar apresenta parâmetros bem estabelecidos em condições normais. Santos, estudando ratos da linhagem Wistar, com peso entre 230 a 260 gramas, no Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe, estabeleceu parâmetros bioquímicos de uréia em  $35,2 \pm 1,31$  mg/dl e de creatinina em  $0,6 \pm 0,02$  mg/dl (SANTOS, 2010). O Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP usa como parâmetros normais a uréia entre 41 - 44,6 mg/dl e a creatinina entre 0,3 - 0,6 mg/dl (CENTRO DE BIOTERISMO DA FMUSP, 2010). Os valores de creatinina encontrados nos grupos do presente estudo estão dentro dessas faixas normais citadas, no entanto o grupo T3 apresentou um valor significativamente maior que os outros grupos ( $p < 0,05$ ), sugerindo que a droga provoque uma piora da creatinina. Além disso, os valores de uréia de todos os grupos operados foram maiores que os valores de referência citados, com uma piora significativa nos grupos com droga, o que comprova a piora da uréia com o uso do tacrolimus.

Alguns estudos animais têm demonstrado análises e alterações de função renal sob diversos aspectos. Santos, em 2005, realizou nefrectomia unilateral em ratos e testou os efeitos no rim remanescente de 2 e 4 horas de pneumoperitônio. Descreveu que a função e a morfologia renal desses ratos não são alteradas significativamente (SANTOS, 2005). Cologna estudou os efeitos da Ciclosporina em modelos de isquemia e reperfusão renal. Concluiu que a Ciclosporina A teve efeito protetor na função renal e reduziu a severidade das lesões teciduais em rins submetidos a isquemia normotérmica de 40 minutos e posterior reperfusão (COLOGNA, 2008). Inácio estudou os efeitos nefrotóxicos do tacrolimus em modelos experimentais de tumor (carcinossarcoma 256 de Walker inoculado em rins murinos). Encontrou dosagens de creatinina significativamente maiores nos grupos com tumor submetidos ao uso de tacrolimus, quando comparados à

grupos que usaram apenas tacrolimus ( $1,01 \pm 0,30 \times 0,71 \pm 0,16$ ) e à grupos que apresentavam apenas tumor ( $1,01 \pm 0,30 \times 0,56 \pm 0,03$ ) (INACIO, 2010).

Paul, em dissertação apresentada em 2011, estudando cicatrização de bexiga em ratos sob uso de tacrolimus associado ao micofenolato - mofetil, não encontrou alteração de uréia e creatinina após 15 dias de tratamento com as drogas. Inclusive, sugeriu possível efeito protetor do micofenolato de mofetila na função renal (PAUL, 2011).

No presente estudo, o tacrolimus mostrou efeito de piora na função renal, com elevação das dosagens séricas de creatinina e uréia, nos ratos com rim único submetido à isquemia e reperfusão, quando comparados aos ratos que não usaram a droga. A nefrotoxicidade também parece ser dose-dependente, com piora progressiva da uréia conforme o aumento da dose de tacrolimus nos grupos (Gráfico 3).

Apesar da presença de aspectos importantes similares a um transplante renal como a isquemia/reperfusão renal e cicatrização vesical, no presente estudo não houve o fator antigenicidade (gerado por um enxerto). A antigenicidade é o principal motivo da utilização de um imunossupressor no transplante renal, no entanto, quando um imunossupressor, como o tacrolimus, é utilizada sem o fator antigenicidade, pode-se avaliar os seus efeitos benéficos e colaterais com maior precisão. Outra questão importante é a escolha da dose de tacrolimus para experimentos. Ochiai, em 1987, estudando alotransplantes cardíacos heterotópicos em ratos tratados com FK506 (tacrolimus), relatou que a dose mínima oral diária para prolongar a sobrevida do enxerto foi de 1 mg/kg/dia (OCHIAI, 1987). Tacrolimus nas doses de 1, 2 e 4 mg/kg/dia foi usado por Ramos, em 2008, para testar toxicidade no desenvolvimento embrionário de ratas durante o período de trânsito tubário. Não houve efeitos tóxicos maternos ou embrionários nas doses testadas (RAMOS, 2008). Na presente pesquisa utilizou-se a dose padrão de 1mg/kg/dia no grupo T1 para que a dose testada no grupo T3 (dose 10 vezes maior) não se tornasse muito tóxica e houvesse perda precoce de animais, o que inviabilizaria o estudo de dose-dependência.

Em um estudo cohort em 2010, com 32 pacientes transplantados renais com potencial risco de efeitos adversos, Hon relatou que a dose alvo

(dose sérica padrão) de tacrolimus deve estar entre 5 e 12 ng/ml, o equivalente a 0,5 e 1,2 ng/dl (HON, 2010). No presente estudo encontrou-se dose sérica muito próxima no grupo T1 (média de 0,49; GRÁFICO 1). Desta forma pode-se considerar o grupo T2 como tendo sub-dose e o grupo T3 como dose tóxica.

Existem métodos e parâmetros bem estabelecidos para avaliação da cicatrização, como a resistência mecânica da cicatriz, a taxa de colágeno e o estudo histológico (GONÇALVES-FILHO, 2006). Como em outros estudos, à exemplo de Gonçalves-Filho, optamos por não utilizar a análise da resistência mecânica para evitar perda de material e por dificuldades técnicas na manipulação da bexiga murina. Estudo como o de Paul, em 2011, quantificou a porcentagem de colágeno maduro e imaturo em cicatriz de bexiga sob uso de imunossuppressores tacrolimus e micofenolato-mofetil, demonstrando predomínio de colágeno imaturo nos grupos imunossuprimidos, sem alterar a quantidade de colágeno total (PAUL, 2011). O autor confirma que o estudo do colágeno é uma boa opção na avaliação de cicatrização. Em nosso estudo, a quantificação do colágeno fez parte de outro segmento da pesquisa. Portanto, optamos pelo estudo histológico, com análise de variáveis inflamatórias de fase aguda e crônica.

Na cascata de cicatrização existe a participação de células com papel fundamental. Dentre essas, os neutrófilos são destaque (uma das variáveis de fase aguda no presente estudo). São células polimorfonucleares que possuem núcleo bilobulado, trilobulado ou pentalobulado. São os neutrófilos os mais numerosos no sangue, fazendo parte de aproximadamente 65% dos leucócitos do sangue. São os principais fagócitos do sangue e participam da reação inflamatória, sendo sensíveis a agentes quimiotáticos liberados pelos mastócitos e basófilos. Agentes quimiotáticos são substâncias que atraem os neutrófilos até o local, ajudando no movimento em direção ao agente agressor (JUNQUEIRA, 2005). Pelo fato de estarem presentes em todo o organismo e em grande número, os neutrófilos frequentemente sofrem influência de drogas externas e por isso têm grande importância no decorrer da cicatrização. Aqui, os neutrófilos da cicatriz, assim como as outras variáveis inflamatórias, foram suprimidos nos grupos que utilizaram tacrolimus.

O tipo de fio utilizado para a sutura vesical, o poliglecaprone 25 (Monocryl®), um material absorvível sintético, monofilamentar, foi o mesmo escolhido para análise histológica de cicatriz vesical em estudo de Simões, em 1998. Esta comparou o poliglecaprone 25 ao catgut cromado em suturas de bexigas de ratos e concluiu que o comportamento tecidual é similar para os 2 fios, no entanto no grupo do catgut observou-se matriz calcúlosa em 46,15% das bexigas após 50 dias de cirurgia. Já no grupo do poliglecaprone não se observou litíase no mesmo período de tempo (SIMÕES M.L.P.B., 1998).

Em relação ao método histológico, outros autores o utilizaram para análise da evolução cicatricial de forma eficaz. Vizzoto Júnior sugeriu que a Cisplatina, droga quimioterápica, provoca uma lentificação na cicatrização de anastomoses colônicas. Utilizou o método de graduação de índices histológicos e as mesmas variáveis inflamatórias aqui utilizadas (neutrófilos, edema, congestão, MMN, tecido de granulação e fibrose). Encontrou infiltrado neutrofílico e edema significativamente maiores nos grupos em que usou cisplatina antes da cirurgia colônica. Também utilizou escore de somatória de variáveis de fase aguda com as de fase crônica e classificou os grupos conforme o período de evolução da cicatriz. Dessa forma relatou que os grupos que usaram a cisplatina obtiveram escore diferente dos que não usaram. Concluiu que a cisplatina provoca lentificação da cicatrização (VIZZOTO JÚNIOR, 2003). O Escore Detalhado utilizado em nosso estudo, onde a cicatrização de bexiga nos grupos com uso de tacrolimus teve uma tendência à cronicidade, foi o mesmo escore utilizado por Vizzoto Júnior para estimar a fase do processo inflamatório, embora Vizzoto tenha calculado esse escore para cicatrização colônica e com uso de quimioterápico.

Fumagalli, avaliando o quimioterápico mitomicina na cicatrização colônica de ratos, encontrou persistência dos achados histológicos de processo inflamatório agudo nos animais que usaram a droga. Propôs que haveria persistência da fase proliferativa na cicatriz (FUMAGALLI, 1991). Similar à esses achados, mas utilizando um imunossupressor e avaliando cicatriz vesical, também tivemos índices histológicos sugestivos de persistência da fase proliferativa nos grupos com tacrolimus.

Ekici, em 2007, estudando os efeitos do imunossupressor Sirolimus na

cicatrização de bexiga em ratos, concluiu que o Sirolimus afeta todas as etapas da cicatrização vesical, com diminuição do número de células inflamatórias, angiogênese e proliferação de miofibroblastos, adiando o processo de cicatrização (EKICI ET AL, 2007).

Myers, em 1961, apresentou uma forma, que atualmente é bem conhecida, de graduação de escores de feridas em cicatrização. Da mesma forma, ele considera inflamação aguda, inflamação crônica, tecido de granulação e colágeno como parâmetros, no entanto, em seu escore, ele também associa outros fatores como abscesso, crosta, regeneração epitelial e fibroblastos (MYERS, 1961). Similar à Myers, utilizou-se no presente estudo sinal negativo e positivo para os escores de inflamação aguda e crônica respectivamente.

Magalhães, em tese apresentada na Universidade Federal do Ceará em 2007, avaliando o efeito do Dersani® e da água de coco liofilizada em cicatrização cutânea de ratos Wistar, encontrou evidências macroscópicas de maior taxa de reparação tecidual no período compreendido entre 7 e 12 dias pós lesão, em todos os grupos testados. Na análise microscópica, a autora encontrou, no 12º dia do experimento, aumento na quantidade de colágeno nas feridas de grupos em que usou água de coco amorfa e cristalina como tratamento na cicatrização por segunda intenção. Também encontrou, no 12º dia, aumento da densidade vascular das feridas tratadas com triglicérido sobre a cicatriz, no entanto não encontrou diferença estatística na quantificação de neutrófilos e inflamação crônica em nenhum grupo testado (SONIA FELICIO MAGALHÃES, 2007), Esse estudo reafirma a eficácia do método histológico para avaliação da cicatrização.

O laboratório fabricante do tacrolimus descreve como reações adversas possíveis a leucopenia (ASTELLAS PHARMA US, 2005). Isso pode ter reflexos na cicatrização. Em concordância com essa reação adversa, encontramos uma significativa diminuição do infiltrado neutrofílico e monomorfonuclear, embora esse achado tenha sido na cicatriz de bexiga.

## **06 CONCLUSÕES**

## 6 CONCLUSÕES

A isquemia por 20 minutos e reperfusão subsequente mostrou-se nociva para a função renal, provocando uma piora significativa na uréia dos ratos em relação ao controle não operado. O tacrolimus também apresentou-se nefrotóxico, com piora da função renal se mostrando dose dependente.

O tacrolimus provocou um atraso na cicatrização de bexiga, com persistência de taxas elevadas de fibrose no 14º dia de pós operatório. Apresentou também diminuição significativa do infiltrado neutrofílico, da congestão vascular, do edema, do infiltrado monomorfonuclear e do tecido de granulação nos grupos com uso da droga.

## REFERÊNCIAS

ABBUD FILHO M., RAMALHO H.J., Revisão / atualização em transplante renal. Novos agentes imunossuppressores. **J. Bras. Nefrol.** São José do Rio Preto, v.19, n.2, p.215-223, 1997.

ALBERTS B, *et al.* **Cell junctions. Cell adhesion, and the extracellular matrix.** In **The Molecular Biology of the Cell**, 4<sup>th</sup> ed. New York, Garland, p.1091-1114, 2002.

ALBERÚ J, URREA EM. Immunosuppression for kidney transplant recipients: current strategies. **Rev Invest Clin.** México DF, v.57, n.2, p. 213-224, 2005.

ASTELLAS PHARMA US. **Prograf.** Deerfield. Prograf package insert. 2005.

BIOTÉRIO DE PRODUÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO DA FCF E IQ DA USP. Procedimentos experimentais / Técnicas anestésicas, 2010. Disponível em: <http://www.usp.br/bioterio/Artigos/Procedimentos%20experimentais/Tecnicas%20anestésicas.pdf>. Acessado em 15/07/2011.

CAMPBELL M.F.; WALSH P.C.. **Campbell-Walsh Urology.** Philadelphia, Saunders Company, 9<sup>th</sup> ed., v.2, 2007.

CATANEO-DÁVILLA A, *et al.* Renal function outcomes in kidney transplant recipients after conversion to everolimus-based immunosuppression regimen with CNI reduction or elimination. **Transplant Proc.** México City, v.41, n.10, p. 4138-4146, 2009.

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 12/05/2010.

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

COLOGNA AJ, *et al.* Cyclosporine action on kidneys of rats submitted to normothermic ischaemia and reperfusion. **Acta Cir Bras.** Ribeirão Preto, v.23, n.1, p.36-41, 2008.

DEAN PG, *et al.* Wound-healing complications after kidney transplantation: a prospective, randomized comparison of sirolimus and tacrolimus. **Transplantation.** Rochester, v.77, n.10, p.1555-1561, 2004.

EKICI Y, *et al.* Effect of Rapamycin on Wound Healing: An Experimental Study. **Transplat. Proc.** New York, v.39, n.4, p.1201-1203, 2007.

EVORA P.R.B., *et al.*. Lesão de Isquemia-Reperusão. Aspectos Fisiopatológicos e a Importância da Função Endotelial. **Arq Bras Cardiol.** Ribeirão Preto / Rochester, v.66, n.4, p.239-245, 1996.

FISHEL R, *et al.* Cyclosporine A impairs wound healing in rats. **J Surg Res.** Aachen, v.34, n.6, p.572-575, 1983.

FUMAGALLI U, *et al.* Effect of intraperitoneal chemotherapy on anastomotic healing in the rat. **J. Surg. Res.** Milan, v.50, p.82-87, 1991.

GAMA FILHO O, *et al.* Imunossupressão com tacrolimus favorece a regeneração hepática induzida por hepatectomia ampla em ratos. **Rev Col Bras Cir.** Curitiba, v.37, n.3, p.218-225, 2010.

GARCIA S.C., *et al.* Ciclosporina A e tacrolimus: uma revisão. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v.40, n.6, p. 393-401, 2004.

GASTON R.S. Current and Evolving Immunosuppressive Regimens in Kidney Transplantation. **Am. Journ. of Kid. Dis.** Birmingham, v.47;4, n.2, p.S3-S21, 2006.

GEISELER D, JAMES W. Inovation of Immunoassays: Chemiluminescence. **Rev Bras Anal Clin.** Recife, v.24, n.3, p.61-64, 1992.

GONÇALVES-FILHO A., *et al.* Efeito do extrato de *Passiflora edulis* (maracujá) na cicatrização de bexiga em ratos: estudo morfológico. **Acta Cir Bras.** São Luís, v.21, n.2, p.03-08, 2006.

HARDINGER K.L., *et al.* Current and future immunosuppressive strategies in renal transplantation. **Pharmacotherapy.** Saint Louis, v.24, n.9, p.1159-1176, 2004.

HATANAKA E., CURI R.. Fatty acids and wound healing: A review. **Rev Bras Farm.** v.88, n.2, p.53-58, 2007.

HON Y.Y., *et al.* Evaluation of tacrolimus abbreviated area-under-the-curve monitoring in renal transplant patients who are potentially at risk for adverse events. **Clin Transplant.** Bethesda, v.24, n.4, p.557-563, 2010.

INÁCIO C.M., *et al.* Action of Tacrolimus on Wistar rat kidneys implanted with Walker 256. **Acta Cir Bras.** Curitiba, v.25, n.1, p. 98-104, 2010.

JUNQUEIRA L. C. U. **Biologia Estrutural dos Tecidos – Histologia.** Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.37-48, 2005.

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

KOHNLE M., *et al.* Conversion from cyclosporine to tacrolimus in renal transplant recipients with gum hyperplasia. **Transplant Proc.** Essen, v.31, n.7A, p.S44-S45, 1999.

KRÄMER B.K., *et al.*, and 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.** Regensburg, v.3, n.8, p.982-987, 2003.

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.

MAGALHÃES M.S.F.. **Avaliação do efeito do Dersani® e da água de coco liofilizada no modelo cutâneo de cicatrização por segunda intenção em ratos Wistar.** Tese (Doutorado) – Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

MARGREITER R., *et al.* Large European study of the switch to tacrolimus for cyclosporine-related side effects. **Am J Transplant.** v.2, n.3, 2002.

MEYER F., *et al.* Histological analysis and the blood flux in kidneys submitted to different periods of ischemia/reperfusion. **Acta Cir Bras.** Curitiba, v.26, n.6, p.451-455, 2011.

MIRANDA E.F., *et al.* The influence of methylene blue on the healing of intestinal anastomoses subjected to ischemia and reperfusion in rats. **Acta Cir Bras.** Curitiba, v.25, n.1, p.63-70, 2010.

MOREIRA M., *et al.* Ação do tacrolimus na pancreatite aguda experimental induzida pela arginina. **Rev Col Bras Cir.** Curitiba, v.38, n.4, p.260-265, 2011.

MYERS A.H., *et al.* Histologic grading of experimental healing wound. **Arch Surg.** v. 83, p.147-150, 1961.

OCHIAI T., *et al.* Studies of the induction and maintenance of long-term graft acceptance by treatment with FK506 in heterotopic cardiac allotransplantation in rats. **Transplantation.** Chiba, v.44, n.6, p.734-738, 1987.

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.

PONTON C., *et al.* Improvement of renal function after conversion to mycophenolate mofetil combined with low-level calcineurin inhibitor in liver

transplant recipients with chronic renal dysfunction. **Transpl. Proc.**, New York, v.42, n.2, p. 656-659, 2010.

RAMOS A.F.L.H., *et al.*. Desenvolvimento embrionário em ratas tratadas com tacrolimus durante a fase de pré-implantação. **Rev Bras Ginecol Obstet.** Juiz de Fora, v.30, n.5, p.219-223, 2008.

SABISTON, D.C., **The Biological Basis of Modern Surgical Practice.** Philadelphia, Saunders Company, 17<sup>th</sup> ed. 2004.

SAMANIEGO M, *et al.* Drug insight: maintenance immunosuppression in kidney transplant recipients. **Nat Clin Pract Nephrol.** Madison, v.2, n.12, p.688-699, 2006.

SANTOS LS, *et al.* Effects of the pneumoperitoneum in rats submitted to a unilateral nephrectomy: morphologic and functional study on the remnant kidney. **Acta Cir Bras.** Curitiba, v.20, n.3, p.195-199, 2005.

SANTOS MRV, *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.

SCHÄFFER M., *et al.*. Differential effect of tacrolimus on dermal and intestinal wound healing. **J. Invest.Surg.**, New York, v.18, n.2, p.71-79, 2005.

SCHAFFER M.R., *et al.*. Tacrolimus impairs wound healing, **Transplantation**, Baltimore, v.65, n.6, p. 813-818, 1998.

SHAPIRO R., *et al.* Alopecia as a consequence of tacrolimus therapy. **Transplantation.** Pittsburgh, v.65, p.1284, 1998.

SIMÕES M.L.P.B., *et al.* Behavior of chromed catgut and polyglecaprone 25 sutures in the urinary bladder of rats, with special reference to stone formation. **Acta Cir Bras.** Curitiba, v.13, n.1, p.26-29, 1998.

SODRÉ FL, *et al.* Avaliação da função e da lesão renal: Um desafio laboratorial. **J Bras Patol Med Lab.** Salvador, v.43, n.5, p.329-337, 2007.

THOMAS D.R. Specific nutritional factors in wound healing. **Adv Wound Care**, Birmingham, v.10, n.4, p.40-43, 1997.

THOMPSON R.H., *et al.*. The impact of ischemia time during open nephron sparing surgery on solitary kidneys: a multi-institutional study. **J Urol.** Rochester, v.177, n.2, p.471-476, 2007.

VIZZOTTO JUNIOR AO, *et al.* Influência da cisplatina administrada no pré e no pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. **J Bras. Patol Med Lab.** Curitiba, v.39, n.2, p.143-149, 2003.

## DOCUMENTOS CONSULTADOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Normas para apresentação de documentos científicos**. 2. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007.

PUBMED: a service of the National Library of Medicine and the National Institutes of Health. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Último acesso em: 28/10/2013.

SCIELO: Scientific Electronic Library Online. SciELO site is an integral part of the FAPESP/BIREME/CNPq Project. Disponível em [www.scielo.br](http://www.scielo.br). Último acesso em 28/10/13.

DeCS-BVS: Descritores em Ciências da Saúde – Biblioteca Virtual em Saúde. Disponível em: <<http://decs.bvs.br/>>. Último acesso em: 11/11/2013.

## **APÊNDICES**

**APÊNDICE 1**  
**MÉDIAS DE PESO INICIAL E TEMPO CIRÚRGICO POR GRUPO**

	<b>Média de pesos (gramas)</b>	<b>Média de tempo cirúrgico (minutos)</b>
<b>CONTROLE</b>	230	---
<b>SHAM</b>	221	29
<b>T1</b>	245,1	38
<b>T2</b>	234,9	34
<b>T3</b>	229,3	37

**APÊNDICE 2**  
**DOSAGENS SÉRICAS DE TACROLIMUS (NANOGRAMAS/ML)**

<b>Ratos</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>
1	0,5	0,2	2,8
2	0,9	0,5	3,7
3	0,3	0,3	2,4
4	0,5	0,3	1,2
5	0,3	0,2	1,6
6	0,6	0,01	2,1
7	0,2	0,2	1,8
8	0,8	0,5	1,9
9	0,3	0,2	2,5
10	0,5	0,6	
<b>Média</b>	<b>0,49</b>	<b>0,3011</b>	<b>2,2222</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,2283</b>	<b>0,1917</b>	<b>0,7378</b>
<b>Mediana</b>	<b>0,5</b>	<b>0,2</b>	<b>2,1</b>

**APÊNDICE 3**  
**DOSAGENS SÉRICAS DE CREATININA (MG/DL)**

<b>Ratos</b>	<b>C</b>	<b>SHAM</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>
1	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5
2	0,3	0,5	0,4	0,3	0,5
3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,5
4	0,3	0,4	0,4	0,3	Indefinido
5	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4
6	0,54	0,4	0,4	0,3	0,5
7	0,57	0,4	0,4	0,3	0,6
8	0,67	0,4	0,4	0,4	0,5
9	0,43		0,3	0,3	0,5
10	0,49		0,3	0,4	
<b>Média</b>	<b>0,42</b>	<b>0,4125</b>	<b>0,37</b>	<b>0,34</b>	<b>0,5</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,14</b>	<b>0,0353</b>	<b>0,0483</b>	<b>0,0516</b>	<b>0,0535</b>
<b>Mediana</b>	<b>0,365</b>	<b>0,4</b>	<b>0,4</b>	<b>0,3</b>	<b>0,5</b>

**APÊNDICE 4**  
**DOSAGENS SÉRICAS DE URÉIA (MG/DL)**

<b>Ratos</b>	<b>C</b>	<b>SHAM</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>
1	42	59	75	83	86
2	45	55	80	75	113
3	44	48	70	60	89
4	44	58	75	68	Indefinido
5	41	53	60	68	83
6	48	48	74	62	95
7	51	59	71	68	87
8	45	50	77	74	108
9	44		79	75	96
10	45		65	77	
<b>Média</b>	<b>44,9</b>	<b>53,75</b>	<b>72,6</b>	<b>71</b>	<b>94,62</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>2,8460</b>	<b>4,7132</b>	<b>6,2751</b>	<b>7,0710</b>	<b>10,8092</b>
<b>Mediana</b>	<b>44,5</b>	<b>54</b>	<b>74,5</b>	<b>71</b>	<b>92</b>

**APÊNDICE 5**  
**ESTATÍSTICA COMPARATIVA DOS VALORES DE TACROLIMUS**  
**UTILIZANDO TESTE T DE STUDENT (p-valor)**

<b>Comparações</b>	<b>p-valor</b>
<b>T1 x T2</b>	<b>0,0667</b>
<b>T1 x T3</b>	<b>0,00008</b>
<b>T2 x T3</b>	<b>0,00003</b>

**APÊNDICE 6**  
**ESTATÍSTICA COMPARATIVA DOS VALORES DE CREATININA COM**  
**TESTE DE MANN-WHITNEY (p-valor)**

<b>Comparações</b>	<b>p-valor</b>
<b>C x SHAM</b>	0,8589
<b>C x T1</b>	1,0000
<b>C x T2</b>	1,0000
<b>C x T3</b>	0,1551
<b>SHAM x T1</b>	0,4239
<b>SHAM x T2</b>	0,2863
<b>SHAM x T3</b>	<b>0,0011</b>
<b>T1 x T2</b>	0,5453
<b>T1 x T3</b>	<b>0,0003</b>
<b>T2 x T3</b>	<b>0,0003</b>

**APÊNDICE 7**  
**ESTATÍSTICA COMPARATIVA DOS VALORES DE URÉIA UTILIZANDO**  
**TESTE T DE STUDENT (p-valor)**

<b>Comparações</b>	<b>p-valor</b>
<b>C x SHAM</b>	<b>0,0006</b>
<b>C x T1</b>	<b>0,0001</b>
<b>C x T2</b>	<b>0,0001</b>
<b>C x T3</b>	<b>0,0001</b>
<b>SHAM x T1</b>	<b>0,0001</b>
<b>SHAM x T2</b>	<b>0,0001</b>
<b>SHAM x T3</b>	<b>0,0001</b>
<b>T1 x T2</b>	<b>0,5990</b>
<b>T1 x T3</b>	<b>0,0003</b>
<b>T2 x T3</b>	<b>0,0001</b>

**APÊNDICE 8**  
**INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS INFLAMATÓRIAS DE CADA RATO DO**  
**GRUPO CONTROLE E MÉDIAS**

<b>Ratos</b> <b>C</b>	<b>Netrof.</b>	<b>Edema</b>	<b>Congestão</b>	<b>MMN</b>	<b>T Gran</b>	<b>Fibrose</b>	<b>Escore</b> <b>Detalh.</b>
<b>1</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>2</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>3</b>	0	0	0	0	0	1	1
<b>4</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>5</b>	0	-1	0	0	0	0	-1
<b>6</b>	0	-1	0	0	0	1	0
<b>7</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>8</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>9</b>	0	0	0	0	0	1	1
<b>10</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>Média</b>	<b>0</b>	<b>-0,2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>0,1</b>

**APÊNDICE 9**  
**INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS INFLAMATÓRIAS DE CADA RATO DO**  
**GRUPO SHAM E MÉDIAS**

<b>Ratos SHAM</b>	<b>Netrof.</b>	<b>Edema</b>	<b>Congestão</b>	<b>MMN</b>	<b>T Gran</b>	<b>Fibrose</b>	<b>Escore Detalh.</b>
<b>1</b>	0	-1	-1	1	2	1	2
<b>2</b>	0	0	-1	1	1	1	2
<b>3</b>	0	-1	-1	1	1	1	1
<b>4</b>	-1	-1	-1	1	1	2	1
<b>5</b>	0	-1	-1	1	2	2	3
<b>6</b>	-1	-1	-1	2	0	1	0
<b>7</b>	-1	0	0	2	0	1	2
<b>8</b>	0	0	0	1	0	1	2
<b>Média</b>	<b>-0,375</b>	<b>-0,625</b>	<b>-0,75</b>	<b>1,25</b>	<b>0,875</b>	<b>1,25</b>	<b>1,625</b>

**APÊNDICE 10**  
**INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS INFLAMATÓRIAS DE CADA RATO DO**  
**GRUPO T1 E MÉDIAS**

<b>Ratos T1</b>	<b>Netrof.</b>	<b>Edema</b>	<b>Congestão</b>	<b>MMN</b>	<b>T Gran</b>	<b>Fibrose</b>	<b>Escore Detalh.</b>
<b>1</b>	-1	-1	-1	1	0	1	-1
<b>2</b>	0	0	0	1	0	2	3
<b>3</b>	0	0	0	1	0	3	4
<b>4</b>	0	0	-1	2	2	1	4
<b>5</b>	0	0	0	1	0	1	2
<b>6</b>	0	0	0	1	0	2	3
<b>7</b>	0	0	0	1	0	1	2
<b>8</b>	0	0	0	0	0	1	1
<b>9</b>	0	-1	-1	1	2	3	4
<b>10</b>	0	0	0	1	0	2	3
<b>Média</b>	<b>-0,1</b>	<b>-0,2</b>	<b>-0,3</b>	<b>1</b>	<b>0,4</b>	<b>1,7</b>	<b>2,5</b>

**APÊNDICE 11**  
**INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS INFLAMATÓRIAS DE CADA RATO DO**  
**GRUPO T2 E MÉDIAS**

<b>Ratos T2</b>	<b>Netrof.</b>	<b>Edema</b>	<b>Congestão</b>	<b>MMN</b>	<b>T Gran</b>	<b>Fibrose</b>	<b>Escore Detalh.</b>
<b>1</b>	0	0	0	0	0	3	3
<b>2</b>	0	0	0	1	0	3	4
<b>3</b>	0	-1	0	1	0	1	1
<b>4</b>	0	0	0	0	0	2	2
<b>5</b>	0	0	0	1	0	3	4
<b>6</b>	0	0	0	1	0	3	4
<b>7</b>	0	0	0	1	0	2	3
<b>8</b>	0	-1	-1	1	0	2	1
<b>9</b>	-1	0	-1	1	1	3	3
<b>10</b>	0	0	0	1	0	3	4
<b>Média</b>	<b>-0,1</b>	<b>-0,2</b>	<b>-0,2</b>	<b>0,8</b>	<b>0,1</b>	<b>2,5</b>	<b>2,9</b>

**APÊNDICE 12**  
**INTENSIDADE DAS VARIÁVEIS INFLAMATÓRIAS DE CADA RATO DO**  
**GRUPO T3 E MÉDIAS**

<b>Ratos T3</b>	<b>Netrof.</b>	<b>Edema</b>	<b>Congestão</b>	<b>MMN</b>	<b>T Gran</b>	<b>Fibrose</b>	<b>Escore Detalh.</b>
<b>1</b>	0	0	-1	1	1	2	3
<b>2</b>	0	0	-1	1	1	1	2
<b>3</b>	0	0	-1	1	2	2	4
<b>4</b>	0	0	0	1	0	3	4
<b>5</b>	0	-1	-1	1	0	1	0
<b>6</b>	0	0	0	0	0	3	3
<b>7</b>	0	0	0	1	0	3	4
<b>8</b>	0	0	0	1	0	2	3
<b>9</b>	0	0	0	0	0	1	1
<b>Média</b>	<b>0</b>	<b>-0,111</b>	<b>-0,444</b>	<b>0,778</b>	<b>0,444</b>	<b>2</b>	<b>2,666</b>

**APÊNDICE 13**  
**p-VALOR PELO TESTE DE QUI-QUADRADO ( TESTE NÃO**  
**PARAMÉTRICO)**

<b>Comparações</b>	<b>Netrof</b>	<b>Edema</b>	<b>Congestão</b>	<b>MMN</b>	<b>T Gran</b>	<b>Fibrose</b>
<b>SHAM x T1</b>	0,0137	0,0150	0,0088	0,0092	0,0105	0,0466
<b>SHAM x T2</b>	0,0137	0,0150	0,0062	0,0125	0,0154	0,0015
<b>SHAM x T3</b>	0,0075	0,0094	0,0125	0,0154	0,0209	0,0451
<b>T1 x T2</b>	0,9262	0,5705	0,4129	0,1438	0,1761	0,0090
<b>T1 x T3</b>	0,2996	0,2845	0,4140	0,1765	0,2388	0,2368
<b>T2 x T3</b>	0,2996	0,2845	0,2535	0,2414	0,3488	0,0087

**ANEXO**

**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

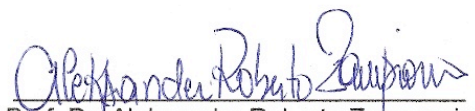
**APROVADO:** 10/07/2009 – R.O. 06/2009

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 Zampronio  
 Coordenador do CEUA