

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALEXANDRE CAVALHEIRO CAVALLI

**AVALIAÇÃO DA NEFROTOXICIDADE PELO TACROLIMUS E MICOFENOLATO  
MOFETIL ASSOCIADOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO RENAL: ESTUDO  
EXPERIMENTAL EM RATOS**

CURITIBA

2014

ALEXANDRE CAVALHEIRO CAVALLI

**AVALIAÇÃO DA NEFROTOXICIDADE PELO TACROLIMUS E MICOFENOLATO  
MOFETIL ASSOCIADOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO RENAL: ESTUDO  
EXPERIMENTAL EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Rogério de Fraga

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

Coordenador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias.

CURITIBA

2014

Cavalli, Alexandre Cavalheiro

Avaliação da nefrotoxicidade pelo tacrolimus e micofenolato mofetil associados à isquemia e reperfusão renal: estudo experimental em ratos / Alexandre Cavalheiro Cavalli – Curitiba, 2014.

81 f.: il. (algumas color.); 29 cm.

Orientador: Prof. Dr. Rogério de Fraga

Tese (Doutorado em Cirurgia) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

1. Rim. 2. Imunossupressão. 3. Isquemia. 4. Reperfusão. 5. Estresse oxidativo. 6. Tacrolimus. 7. Ácido Micofenólico.

I. Título.

À minha esposa Fabiana.

Pelo amor, apoio e cumplicidade.

À minha filha Maria Paula.

Por ter me ensinado o que é o amor incondicional.

Aos meus pais, José e Lourdes, e meus irmãos, Ricardo, Rafael e José Eduardo.

Pelo grande amor que nos une.

Pelo apoio constante e confiança incondicional.

A todos, minha eterna gratidão.

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, pelo dom da vida e por me dar força e coragem para enfrentar com bravura os desafios que me são impostos, e pela graça e felicidade de poder vencê-los.

Ao PROF. DR. RENATO TAMBARA FILHO, por acreditar neste projeto, incentivar e orientar a realização do mesmo. Também pela oportunidade de compartilhar de seus inestimáveis conhecimentos como profissional e principalmente como pessoa. Pelo relacionamento como mestre, como colega de carreira e como amigo, bem como pela grande contribuição para a minha formação ética e profissional.

Ao PROF. DR. ROGÉRIO DE FRAGA, por ter compartilhado do sonho de tornar este projeto realidade e por ter lutado junto conosco para que todas as etapas fossem cumpridas com maestria e dedicação. Por apoiar e incentivar nossos sonhos acadêmicos e pela contribuição em nossa formação pessoal e profissional.

Ao PROF. DR. LUIZ EDISON SLONGO, pela valorosa contribuição na minha formação e na minha carreira profissional, pelas inúmeras oportunidades, exemplo profissional e afetuosa amizade. Por apoiar e incentivar a realização deste projeto, e ter acreditado na minha carreira acadêmica e profissional.

Ao PROF. DR. JORGE EDUARDO FOUTO MATIAS (Coordenador do programa de pós-graduação em clínica cirúrgica da UFPR) e ao PROF. DR. ANTÔNIO CARLOS LIGOCKI CAMPOS (Vice-coordenador do programa de pós-graduação em clínica cirúrgica da UFPR), que me deram oportunidade de participar deste programa, pela contribuição na minha formação acadêmica e profissional e pela maestria com que conduzem a pós-graduação em clínica cirúrgica de nossa universidade.

À secretária do Departamento de pós-graduação em clínica cirúrgica da UFPR, REGINA SASS MARQUES, pelas orientações e ajuda quanto aos compromissos e normas de funcionamento do programa.

Ao SERVIÇO DE UROLOGIA DO HC – UFPR, em especial aos professores já citados anteriormente e PROF. DR. LUIZ SÉRGIO SANTOS, pelos ensinamentos e contribuição técnico-científica durante minha residência e minha formação acadêmica.

Ao DR MARCELO ARANHA, DR CARLOS EDUARDO DE ALCÂNTARA CASTILHO, DR PAULO HENRIQUE GOULART FERNANDES DIAS, DR ANDRE WATANABE, DR JOÃO CARLOS REPKA, DRA REGINA DE PAULA XAVIER GOMES, DR JULIO SLONGO, DR GABRIEL AUGUSTO OLIVEIRA, meus colegas e colaboradores neste experimento, pela vontade e disposição de emprendermos na ciência.

Ao Departamento de Biologia Celular da UFPR, nas pessoas dos PROF. DR. CIRO ALBERTO DE OLIVEIRA RIBEIRO e PROF. DR. FRANCISCO FILIPAK NETO, pelos ensinamentos e pela possibilidade de realizar este experimento sob sua supervisão.

À PROF. DRA. DJANIRA APARECIDA DA LUZ VERONEZ por ter auxiliado e realizado conosco parte fundamental neste experimento, pelos ensinamentos e pelo tempo dispensado.

Ao DR RAFAELLO DI BERNARDI, pelas horas dedicadas à estatística e pelo apoio na análise dos dados deste trabalho.

À minha tia-madrinha PROF. MARIA EDI CAVALHEIRO, por ter contribuído na minha formação pessoal e moral, e por ter auxiliado na revisão deste trabalho.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e de minha pós-graduação.

À MINHA AMÁVEL FAMÍLIA, razão principal dos meus esforços e de minha dedicação, e para os quais dedico mais esta conquista. À minha esposa FABIANA, pelo apoio em todos os momentos, por acreditar em nosso amor e compartilhar do sonho de sermos felizes hoje e sempre. Por lutar comigo pela nossa família e por ter

me dado uma filha linda e perfeita, a MARIA PAULA, razão maior de meus esforços e inspiração constante para que eu possa ser uma pessoa melhor. Aos meus irmãos, RICARDO, RAFAEL e JOSÉ EDUARDO, pela nossa amizade e por estarem sempre a meu lado, pelo apoio em todos os momentos, e em especial ao RICARDO e ao RAFAEL, que participaram do desenvolvimento deste trabalho. Aos meus pais JOSÉ e LOURDES, pelo exemplo de vida e pela preciosa educação. Também por confiarem incondicionalmente na nossa capacidade, pelo amor e pela nossa união como família, por quem eu sou e pelo que conquistei até então. A todos minha eterna gratidão.

“Onde há uma vontade forte, não pode haver grandes dificuldades.”

Maquiavel

“Se um homem não descobriu nada pelo qual morreria,  
não está pronto para viver”

Martin Luther King

## RESUMO

**Introdução:** A terapia imunossupressora tem melhorado a sobrevida e a duração dos enxertos no transplante renal. Um ponto negativo, no entanto, diz respeito à toxicidade causada por estas drogas. **Objetivo:** Este estudo objetivou avaliar a toxicidade renal causada pelo tacrolimus e micofenolato mofetil (MMF) em um modelo de isquemia e reperfusão de rim único. **Material e Método:** Estudo experimental utilizando ratos Wistar, os quais foram submetidos à nefrectomia direita e isquemia renal esquerda por 20 minutos, sendo separados em grupos no pós-operatório (PO): 1) Controle (não operados); 2) *Sham* (operados, sem droga PO); 3) TAC0.1, TAC1 e TAC10, administrado tacrolimus PO nas doses 0,1 mg/kg, 1 mg/kg e 10 mg/kg via gavagem, respectivamente; 4) MMF, administrado micofenolato mofetil 20 mg/kg; 5) MMF/TAC1 e MMF/TAC0.5, com associação de micofenolato mofetil 20 mg/kg e tacrolimus 1 mg/kg e 0,5 mg/kg, respectivamente. Foram mortos no 14º PO e retirado rim para análise do estresse oxidativo tecidual, pela dosagem de glutatona reduzida (GSH), lipoperoxidação (LPO) e carbonilação de proteínas (PCO), e análise histológica por estereologia glomerular (Densidade de volume glomerular, Densidade numérica glomerular e Volume glomerular médio). Também foi avaliada a função renal pela dosagem de creatinina e uréia séricas. **Resultados:** Ambas as drogas provocaram alteração na função renal, sendo a toxicidade do tacrolimus dose-dependente. Neste curto intervalo de tempo, a toxicidade subaguda não mostrou alterações histológicas glomerulares significativas, sendo que houve hipertrofia renal e glomerular compensatória em todos os grupos exceto em TAC10. A dosagem de GSH teve aumento dose-dependente com uso de tacrolimus e micofenolato mofetil isolados, mas não em associação das drogas. LPO e PCO não se alteraram com o emprego do tacrolimus e houve redução de ambos com MMF. **Conclusões:** Pode-se concluir que ambas as drogas provocam alteração na função renal. A morfometria e a estereologia glomerular mostraram interferência negativa dos imunossupressores durante a hipertrofia glomerular compensatória. Tanto tacrolimus quanto MMF parecem aumentar o estresse oxidativo e estimulam elevação de GSH tecidual, no entanto, não foi detectado aumento de peroxidação lipídica ou carbonilação de proteínas, e o MMF parece ser fator protetor contra LPO e PCO.

Palavras-chave: Nefrotoxicidade. Imunossupressão. Isquemia. Reperfusão. Estresse oxidativo. Estereologia. Tacrolimus. Micofenolato mofetil.

## ABSTRACT

**Purpose:** Immunosuppression therapy has improved patient and graft survival in renal transplantation. A point of concern, however, is the drug toxicity. **Aim:** This study aimed to evaluate the renal toxicity caused by tacrolimus and mycophenolate mofetil (MMF) in a single kidney ischemia and reperfusion model. **Methods:** Experimental study using Wistar rats, which underwent right nephrectomy and left renal ischemia for 20 min. Postoperative (PO) groups were separated in: 1) control (non-operated); 2) *Sham* (operated without drug PO); 3) TAC0.1, TAC1 and TAC10, tacrolimus administered PO at doses 0.1 mg/kg, 1 mg/kg and 10 mg/kg by gavage, respectively; 4) MMF, mycophenolate mofetil administered 20 mg/kg; 5) MMF/TAC1 and MMF/TAC0.5, mycophenolate mofetil 20 mg/kg in combination with tacrolimus 1 mg/kg and 0.5 mg/kg, respectively. Rats were sacrificed on the 14th postoperative day and the kidney removed for tissue oxidative stress analysis. Levels of reduced glutathione (GSH), lipid peroxidation (LPO) and protein carbonyls (PCO) were measured, and glomerular histological analysis was done by stereology (Glomerular volume density, Glomerular number density and Mean glomerular volume). Renal function was assessed measuring serum creatinine and urea. **Results:** Renal function changed with both drugs use, and there was a dose-dependent toxicity of tacrolimus. In this short period of time, the subacute toxicity showed no significant glomerular histological changes, and there was compensatory renal and glomerular hypertrophy in all groups except in TAC10. The level of GSH increased dose-dependently with the use of tacrolimus, and with isolated mycophenolate mofetil, but not in combination of drugs. LPO and PCO did not changed with the use of tacrolimus and both decreased with MMF. **Conclusions:** Both drugs cause changes in renal function. The glomerular morphometry and stereology showed a negative interference of immunosuppressants during compensatory glomerular hypertrophy. Both tacrolimus and MMF appear to increase oxidative stress and stimulate elevation of tissue GSH levels. However, increased lipid peroxidation and protein carbonylation were not detected, and MMF seems to be protective against PCO and LPO.

Key words: Nephrotoxicity. Immunosuppression. Ischemia. Reperfusion. Oxidative stress. Stereology. Tacrolimus. Mycophenolate mofetil.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	- RATOS SEPARADOS INDIVIDUALMENTE EM GAIOLAS .....	24
FIGURA 2	- PROCEDIMENTO ANESTÉSICO (A) E MEDICAÇÃO ANESTÉSICA UTILIZADA .....	25
FIGURA 3	- LAPAROTOMIA MEDIANA.....	26
FIGURA 4	- DISSECÇÃO DO PEDÍCULO VASCULAR E URETER DIREITOS (A) E LIGADURA E NEFRECTOMIA DIREITA (B) .....	26
FIGURA 5	- DISSECÇÃO DO RIM ESQUERDO (A) E CLAMPEAMENTO DO PEDÍCULO VASCULAR COM ISQUEMIA RENAL ESQUERDA .....	27
FIGURA 6	- CISTOTOMIA (A) E CISTORRAFIA (B).....	27
FIGURA 7	- RIM ACONDICIONADO EM CASSETE PLÁSTICO COM IDENTIFICAÇÃO DO GRUPO E NÚMERO DO ANIMAL.....	29
FIGURA 8	- SEGMENTO RENAL ACONDICIONADO EM TUBO <i>EPPENDORF</i> .....	29
FIGURA 9	- SISTEMA-TESTE M42 SUPERPOSTO À CÓRTEX RENAL .....	31
GRÁFICO 1	- DENSIDADE DE VOLUME GLOMERULAR (DOSE-RESPOSTA).....	39
GRÁFICO 2	- DENSIDADE NUMÉRICA GLOMERULAR (DOSE-RESPOSTA).....	40
GRÁFICO 3	- VOLUME GLOMERULAR MÉDIO (DOSE-RESPOSTA).....	40

GRÁFICO 4 - CONCENTRAÇÃO DE TIÓIS NÃO-PROTEICOS (DOSE-RESPOSTA) .....	41
GRÁFICO 5 - CONCENTRAÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS (DOSE-RESPOSTA).....	42
GRÁFICO 6 - CONCENTRAÇÃO DE CARBONILAS (DOSE-RESPOSTA).....	42
GRÁFICO 7 - DENSIDADE DE VOLUME GLOMERULAR (ASSOCIAÇÃO DE DROGAS) .....	45
GRÁFICO 8 - DENSIDADE NUMÉRICA GLOMERULAR (ASSOCIAÇÃO DE DROGAS) .....	46
GRÁFICO 9 - VOLUME GLOMERULAR MÉDIO (ASSOCIAÇÃO DE DROGAS) .....	47
GRÁFICO 10 CONCENTRAÇÃO DE TIÓIS NÃO-PROTEICOS (ASSOCIAÇÃO DE DROGAS) .....	48
GRÁFICO 11 CONCENTRAÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS (ASSOCIAÇÃO DE DROGAS) .....	48
GRÁFICO 12 CONCENTRAÇÃO DE CARBONILAS (ASSOCIAÇÃO DE DROGAS) .....	49

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS – DOSE-RESPOSTA .....	38
TABELA 2 - MORFOMETRIA RENAL – DOSE-RESPOSTA .....	39
TABELA 3 - AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS – ASSOCIAÇÃO DE DROGAS .....	44
TABELA 4 - MORFOMETRIA RENAL – ASSOCIAÇÃO DE DROGAS .....	45

## LISTA DE SIGLAS

ABTO – Associação Brasileira de Transplante de Órgãos  
AGPI – Ácidos graxos poli-insaturados  
BSA – albumina de soro bovino  
CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais  
CNI – Inibidor da calcineurina  
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal  
DTNB – ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico  
ERO – Espécie reativa de oxigênio  
FeSO<sub>4</sub>.NH<sub>4</sub> – sulfato ferroso amoniacal  
FK 506 – Tacrolimus  
GSH – Glutathiona reduzida  
HCl – ácido clorídrico  
HLA – Antígeno leucocitário humano  
LPO – Peroxidação de lipídios  
MTOR – *Mammalian Target of Rapamycin*  
PBS – Tampão fosfato salina  
PCO – Carbonilação de proteínas  
PTK – Proteína Tirosinaquinase  
TCA – Ácido tricloroacético  
TCR – Receptor da célula T

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1 OBJETIVOS .....	16
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
2.1 OS IMUNOSSUPRESSORES.....	17
2.2 ESTRESSE OXIDATIVO.....	20
2.3 ESTEREOLOGIA .....	22
<b>3 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>24</b>
3.1 DESENVOLVIMENTO DO EXPERIMENTO .....	24
3.2 ANÁLISE BIOQUÍMICA DO SANGUE .....	30
3.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E ESTEREOLÓGICA DOS RINS .....	30
3.4 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO TECIDUAL .....	32
3.5 METODOLOGIA ESTATÍSTICA.....	35
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
4.1 ANÁLISE COMPARATIVA DA DOSE-RESPOSTA COM USO DO TACROLIMUS.....	37
4.1.1 Análises bioquímicas.....	37
4.1.2 Análise morfométrica renal.....	38
4.1.3 Análise estereológica .....	39
4.1.4 Análise do estresse oxidativo tecidual.....	41
4.2 ANÁLISE COMPARATIVA DA ASSOCIAÇÃO DE DROGAS IMUNOSSUPRESSORAS.....	43
4.2.1 Análises bioquímicas.....	43
4.2.2 Análise morfométrica renal.....	44
4.2.3 Análise estereológica .....	45
4.2.4 Análise do estresse oxidativo tecidual.....	47
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>50</b>
5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	59
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>62</b>
<b>DOCUMENTOS CONSULTADOS</b> .....	<b>70</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>71</b>

ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	71
ANEXO 2 – DADOS DAS DOSAGENS BIOQUÍMICAS .....	72
ANEXO 3 – DADOS DA MORFOMETRIA RENAL .....	74
ANEXO 4 – DADOS DA ESTEREOLOGIA.....	76
ANEXO 5 – DADOS DAS DOSAGENS DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	80

## 1 INTRODUÇÃO

O aumento do número de candidatos a transplantes e a crescente necessidade de órgãos, associado a um número limitado de doadores disponíveis têm exigido crescente esforço para otimizar os procedimentos de transplante realizados, aumentando assim os índices de sucesso e reduzindo as complicações relacionadas (ABTO – Associação Brasileira de Transplante de Órgãos, 2014).

O transplante renal é um dos mais frequentes, e tem a vantagem de dispor de uma fonte maior de possíveis doadores, haja vista a duplicidade do órgão e, recentemente, o emprego da laparoscopia como método minimamente invasivo para retirada do mesmo, o que tornou a doação mais atrativa e menos traumática para os transplantes de doador vivo relacionado (NANIDIS *et al.*, 2008).

Por outro lado, apesar de outros órgãos não apresentarem esta singularidade referente ao rim, há um ponto comum a todos e que tem vital importância no sucesso do procedimento: a imunossupressão.

A rejeição na fase aguda ainda é a maior causa de perda dos enxertos renais, representando um desafio para o tratamento e manutenção da função no longo prazo do órgão transplantado (EAU, 2009).

A necessidade de imunossupressão fez com que se desenvolvessem múltiplas drogas de diferentes classes, cada qual com suas particularidades e também seus efeitos adversos. Neste ponto, pode-se destacar as alterações tóxicas renais ocasionadas, e que muitas vezes limitam os resultados não só no transplante renal, mas também para transplantes de outros órgãos (REGAZZI; ALESSIANI; RINALDI, 2005).

Nos últimos anos, o Tacrolimus e o Micofenolato Mofetil ocupam papel de destaque na terapia pós-transplante, sendo amplamente utilizados como agentes centrais nos esquemas de imunossupressão atuais (HALLORAN, 2004).

Apesar de se conhecer sobre o potencial dano que estas drogas podem exercer no rim, tanto nos órgãos nativos quanto nos enxertos, não se sabe ao certo qual o exato mecanismo de lesão celular renal, principalmente quando há isquemia renal associada (KILINC *et al.*, 2014).

Desta forma, há necessidade de se aprofundar o conhecimento dos efeitos renais causados durante a imunossupressão com drogas potencialmente nefrotóxicas, como o Tacrolimus e o Micofenolato Mofetil, levando também em

consideração fatores relacionados com o procedimento de transplante renal e manipulação do órgão.

### 1.1 OBJETIVOS

Avaliar a nefrotoxicidade subaguda das drogas imunossupressoras Tacrolimus e Micofenolato Mofetil em ratos submetidos a um processo de isquemia e reperfusão renal, utilizando os parâmetros:

- a) avaliação da função renal através da creatinina e uréia séricas;
- b) avaliação morfométrica renal, e sua composição morfológica glomerular utilizando método de estereologia;
- c) análise do estresse oxidativo tecidual renal.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 OS IMUNOSSUPRESSORES

A imunossupressão clínica teve início 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. A partir dos anos 90 agentes químicos como tacrolimus, micofenolato mefetil 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 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. A sequência 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 (PTKs) 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, 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 proporcionam a 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 da síntese de DNA (ABBUD FILHO; RAMALHO, 1997; HALLORAN, 2004) .

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 mofetil e pirimidinas, como brequinar) (HALLORAN, 2004; EAU, 2009).

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. Estes esquemas atualmente consistem em uma associação de um inibidor da calcineurina (CNI), associado a um agente antiproliferativo e um corticóide (KALLURI; HARDINGER, 2012). Entre as drogas utilizadas, podemos mencionar o Tacrolimus e o Micofenolato Mofetil.

O FK 506 (tacrolimus) é um macrolídeo produzido pelo fungo *Streptomyces tsukubaensis* com potente atividade imunossupressora. Atua nas vias bioquímicas intracelulares dependentes de Ca 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. Pertence ao grupo dos inibidores da calcineurina (CNI), assim como a ciclosporina, e compõe a pedra fundamental da terapia imunossupressora standart. O Tacrolimus é metabolizado quase totalmente no fígado, pela enzima Citocromo P450-3A4 (CYP3A4), e eliminado nas fezes através da bile (HALLORAN, 2004; ASTELLAS PHARMA US INC, 2005; EAU, 2009).

Os micofenolatos são baseados no ácido micofenólico, que inibe a enzima inosina monofosfato desidrogenase. Esta é etapa limitante na síntese de guanosina monofostato na via da síntese “de novo” de purinas. Como a função e proliferação dos linfócitos é muito dependente da síntese “de novo” de purinas, esta imunossupressão tem melhor efeito citostático na proliferação dos linfócitos. O metabólico ativo do ácido micofenólico é metabolizado pela glucoronil transferase no fígado e sua maior parte é excretada em forma inativa na urina (SRINIVAS; KAPLAN; MEIER-KRIESCHE, 2003; HALLORAN, 2004; EAU, 2009).

Independente do esquema terapêutico, as drogas imunossupressoras possuem efeitos adversos como nefrotoxicidade, efeitos de ordem cardiovascular,

diabetes mellitus, efeitos cosméticos como hirsutismo, hiperplasia gengival, alopecia. Além destes, pode haver influência também no processo de cicatrização e reparação tecidual (SRINIVAS; MEIER-KRIESCHE, 2008).

No que diz respeito à nefrotoxicidade, o Tacrolimus tanto pode exercer efeito citotóxico direto quanto alterações isquêmicas celulares renais (NAESENS; KUYPERS; SARWAL, 2009).

Ninova *et al.* (2004) cita lesões renais como infiltrado inflamatório intersticial, fibrose e vacualização tubular, os quais estão relacionados e proporcionalmente aumentam com o aumento da dose dos imunossupressores. Além disso, através da dosagem de TGF-beta 1, o autor identificou diferentes padrões de lesão para cada tipo de droga.

Rajnoch *et al.* (2005) avaliou a regulação de angiogênese renal e o efeito do tacrolimus na mesma, percebendo maior expressão de Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF) e Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) em ratos sob o uso do imunossupressor.

Simon *et al.* (2003) relacionou o uso do tacrolimus e sirolimus na diminuição da fosforilação oxidativa mitocondrial, favorecendo o processo de nefrotoxicidade crônica.

Zhou *et al.* (2004) estudou citotoxicidade induzida por tacrolimus e encontrou que a droga aumenta as espécies reativas de oxigênio, mediada principalmente por peróxido de hidrogênio, e que tal alteração é dose-dependente.

Já o Micofenolato Mofetil não apresenta padrão de nefrotoxicidade. Assim, estudos recentes tentaram utilizá-lo como forma de reduzir a dose de outras drogas, como os Inibidores da Calcineurina (CNI).

Frimat *et al.* (2006) estudou redução de 50% da dose de ciclosporina com uso associado de micofenolato mofetil, e concluiu que há redução na nefrotoxicidade a longo prazo.

Ekberg *et al.* (2011) avaliando pacientes pós-transplante renal com diferentes doses de tacrolimus e micofenolato, concluiu que há melhor função renal e menor padrão de nefrotoxicidade quando utilizou doses reduzidas de tacrolimus e aumentadas de micofenolato.

## 2.2 ESTRESSE OXIDATIVO

A utilização do oxigênio para geração de energia, ou metabolismo aeróbio, trouxe como ônus o desenvolvimento de produtos potencialmente tóxicos: os oxidantes ou Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (SIES, 1991).

As EROs são parte de uma gama maior de subprodutos do metabolismo conhecidas como Radicais Livres. Estes são denominados pelo fato de poderem existir independentemente e apresentarem um ou mais elétrons desemparelhados. As ERO incluem todos os radicais do oxigênio, como o ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ), radical alquila ( $L^{\cdot}$ ), alcoxila ( $LO^{\cdot}$ ) e peroxila ( $LOO^{\cdot}$ ) (BARBER; BERNHEIM, 1967; CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979).

Podem existir além das ERO, as espécies reativas de Nitrogênio. Todas estas moléculas têm como principal característica a capacidade de transportar elétrons durante as reações de geração de energia na célula.

Para contrabalançar estes compostos reativos e manter a homeostase celular, existem sistemas anti-oxidantes que agem de forma a neutralizar total ou parcialmente os radicais livres. Estes sistemas podem ser enzimáticos ou não-enzimáticos, e atuam reagindo com os compostos oxidantes, absorvendo os elétrons livres e modificando as moléculas reativas (BARBOSA *et al.*, 2010).

Assim, o estresse oxidativo se caracteriza pelo excesso de EROs em decorrência de um desequilíbrio nos mecanismos de oxi-redução, conduzindo a um processo de oxidação de biomoléculas, como proteínas, lipídios, DNA, e gerando quebra da homeostasia celular e dano potencial à células e tecidos (WARNER, 1994).

Drogas, ou agentes xenobióticos, podem interferir com os mecanismos de oxi-redução, gerando estresse oxidativo. Os mecanismos principais são pela atuação destes agentes a nível mitocondrial, interferindo com o transporte de elétrons, e alterando o funcionamento enzimático, em especial do Citocromo P450 e CYP3A4 (que são importantes agentes oxidantes) (RAY; HUANG; TSUJI, 2012).

As moléculas-alvo das EROs podem ser utilizadas como biomarcadores do estresse oxidativo, uma vez que sua identificação e quantificação podem auxiliar no reconhecimento de se há aumento na produção de radicais livres. Algumas delas são mais facilmente identificadas e já estudadas como biomarcadores, como a

Glutationa reduzida (GSH), Lipídios peroxidados e Proteínas carboniladas (FINKEL, 1998).

A Glutationa reduzida (GSH) é um peptídeo intracelular da classe dos tióis, encontrado em altas concentrações e atua principalmente nas reações de oxirredução, pela sua facilidade em doar elétrons e neutralizar as EROs. É o substrato das enzimas Glutationa transferase, peroxidase, oxidase e redutase. Possui papel central na biotransformação e eliminação dos xenobióticos, sendo considerada fundamental na adaptação e evolução das espécies devido a este papel detoxificador (HUBER; ALMEIDA; FATIMA, 2008).

O processo de Peroxidação de Lipídios (LPO) é uma cascata de eventos decorrente da ação dos radicais livres sobre os lipídios de membrana, principalmente os Ácidos Graxos Poliinsaturados (AGPI). Basicamente, ocorre incorporação de um oxigênio livre a um AGPI, gerando um hidroperóxido lipídico. Como consequência, há uma perda funcional nestes lipídios de membrana, fazendo com que as membranas celulares percam suas propriedades, em especial de seletividade, permeabilidade e fluidez, ocasionando disfunções celulares, envelhecimento celular e até apoptose. Este processo é complexo e envolve várias cadeias de reação, tanto enzimáticas quanto não-enzimáticas, e a avaliação da lipoperoxidação pode ser feita pela medida dos sub-produtos resultantes do processo de peroxidação, como dienos conjugados, malondialdeído e hidroperóxidos (LIMA; ABDALLA, 2001).

A Carbonilação de Proteínas (PCO) consiste na reação de EROs que têm como consequência a introdução de grupos carbonila (CO) em proteínas. Esta reação produz uma modificação estrutural não-enzimática irreversível à proteína, tendo como principal resultado uma proteína potencialmente desfuncionalizada e que é de mais difícil degradação, causando acúmulo deste material na célula ou tecido. A oxidação proteica pode se dar diretamente pela reação das EROs ou por reações secundárias das EROs com lipídios ou açúcares que geram produtos carbonilados, os quais irão reagir com as proteínas. Os radicais carbonila se ligam às cadeias laterais do aminoácidos, em especial lisina, arginina, prolina e treonina, e através destas ligações estes compostos podem ser identificados e dosados. A PCO é o biomarcador mais amplamente utilizado para identificar dano proteico por estresse oxidativo, e reflete o dano celular causado por múltiplas EROs (DALLE-DONNE *et al.*, 2006).

## 2.3 ESTEREOLOGIA

A origem etimológica da estereologia vem do grego “stereo” e “logos”, ou a “ciência que estuda os sólidos”.

Na ciência moderna, é definida como “interpretação espacial de secções”. Assim, o método estereológico faz parte de uma área multidisciplinar que utiliza de dados obtidos através de planos seccionais bidimensionais de uma determinada estrutura, analisa estes dados e fornece informações capazes de interpretar tridimensionalmente aquela estrutura. Para tanto, são utilizadas amostras randômicas e sistemáticas, obtidas em secções seriadas, que fornecem dados quantitativos capazes de serem extrapolados tridimensionalmente (INTERNATIONAL STEREOLOGY SOCIETY, 2014).

O emprego deste método vem desde meados do século XIX, quando em 1843 Achille Ernest Delesse (um geólogo e mineralogista francês) descreveu um método para estimar o volume de determinado mineral em uma rocha baseado em uma amostra da rocha (princípio de *Delesse*). Somente a partir de meados do século XX, entretanto, que esta ciência passou a ser mais amplamente utilizada na área médica, e a partir dos anos 80 novos estudos aperfeiçoaram os métodos de amostragem, reduzindo as tendenciosidades e tornando suas técnicas mais consistentes (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003).

O método da estereologia está baseado em algumas premissas: Princípio de Delesse, que estima a proporcionalidade de elementos de uma amostra; Princípio de Cavalieri, utilizado para calcular o volume de uma estrutura baseada nas áreas de secção e distância interseccional desta estrutura; Efeito Holmes, espessura da amostra deve ser fina suficiente para não superestimar o número de elementos na secção (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003).

Deste modo, baseado nestes princípios, toda análise estereológica deve objetivar inicialmente obter um corte ou secção Aleatório e Uniformemente Isotrópico (AUI) a fim de evitar vieses de amostragem. Em seguida, o corte deve ser analisado frente a um sistema-teste pré-definido de pontos, retas e intersecções para obtenção das informações do corte. Um sistema-teste muito utilizado é o Sistema M42, o qual é sobreposto às lâminas para contagem das estruturas interessadas (WEIBEL; KISTLER; SCHERLE, 1966).

Recentemente, a estereologia tem sido empregada em pesquisas dedicadas ao rim (NYENGAARD JR, 1999) para avaliação das estruturas renais no desenvolvimento embrionário (NÁPRSTKOVÁ, 2005; CATTAPRETA, 2006), nas alterações relacionadas a doenças crônicas, como diabetes (MEDEIROS; AGUILA; MANDARIM-DE-LACERDA, 2006) e hipertensão (WINTOUR, 2003), e também exposição a agentes específicos como dieta (AGUILA; MANDARIM-DE-LACERDA, 2003) e ambiente (CASOTTI, 2001), hormônios (ZEIER, 1998) e algumas drogas (DRAGAN, 1995; CIBULSKYTE, 2007; DICKINSON, 2007).

### 3 MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais na 6ª Reunião Ordinária do CEUA de 2009 (10/07/09, certificado 386 b), com retificação e nova aprovação das alterações na Reunião Ordinária 03/2011 (05/04/2011).

Foram observados os princípios éticos na experimentação animal preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e também as exigências estabelecidas no “Guide for the care and use of experimental animals” (CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 1993).

A fase experimental ocorreu em etapas distintas, sendo os procedimentos cirúrgicos e as análises histológicas e de estereologia realizados no Departamento de Anatomia, e os testes de estresse oxidativo realizados em conjunto com o Departamento de Biologia Celular, ambos do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

#### 3.1 DESENVOLVIMENTO DO EXPERIMENTO

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia), do sexo masculino (FIGURA 1), com idade média de nove semanas, peso médio dos grupos variando entre 221 e 254 gramas, mantidos em gaiolas com as mesmas condições ambientais, ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo água e ração *ad libitum* durante todo o período do experimento (NEVES *et al.*, 2013).



FIGURA 1 – Ratos separados individualmente em gaiolas.  
FONTE: O Autor (2010).

Os animais foram divididos aleatoriamente em oito grupos, nos quais foram realizados: nefrectomia direita, isquemia renal quente por clampeamento do pedículo renal esquerdo durante 20 minutos, reperfusão renal após desclampeamento do pedículo vascular e cistotomia seguida de cistorrafia, através de laparotomia mediana, seguindo técnica asséptica, com exceção dos animais do GRUPO CONTROLE.

Para a realização do procedimento cirúrgico os animais foram submetidos à injeção intra-muscular de diazepam (5 mg/kg) e atropina (0,5 mg/kg), e após iniciado o efeito destas drogas, anestesiados com uma associação de Xilazina (5 mg/kg) e Ketamina (100 mg/Kg) intraperitoneal, sendo mantidos anestesiados durante todo o procedimento, com doses de manutenção de Xilazina (0,4 mg/Kg) e Ketamina (20 mg/Kg) (NEVES *et al*, 2013) (FIGURA 2).

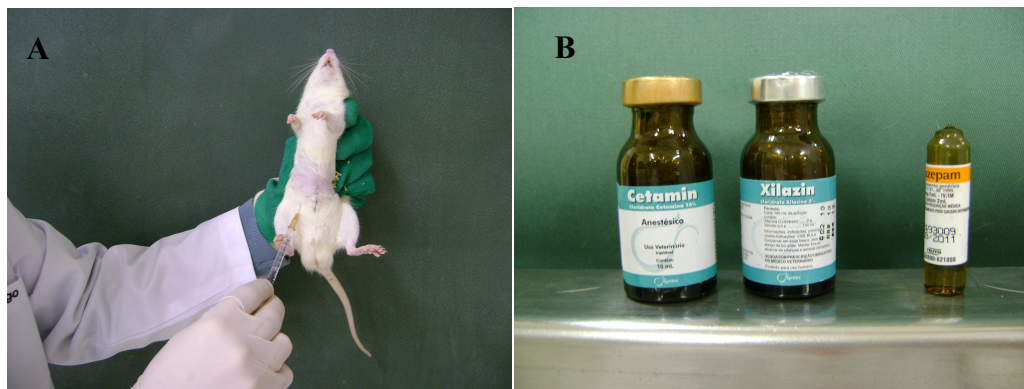


FIGURA 2 – Procedimento anestésico (A) e medicação anestésica utilizada (B).  
 FONTE: O AUTOR (2010)

O procedimento cirúrgico consistiu em laparotomia mediana (FIGURA 3), dissecação do rim direito e ligadura dos vasos renais e ureter direitos com fio de algodão “4-0” (quatro zeros), seguido de nefrectomia direita (FIGURA 4). Posteriormente 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 5). Em seguida, o *clamp* era retirado, ocorrendo a reperfusão renal. Procedeu-se à dissecação vesical e realização de cistotomia com abertura de um centímetro em linha média. A parede vesical foi fechada em 2 planos (primeiro plano com pontos contínuos totais e segundo plano com pontos separados extramucosos), utilizando fio monofilamentar absorvível sintético *poliglecaprone* (*Caprofil*®) “4-0” (FIGURA 6)

e por fim, fechamento da parede abdominal por planos, sendo aponeurose com sutura contínua de fio de nylon “3-0” (três zeros) e pele com sutura contínua de fio de nylon “3-0”.



FIGURA 3 – Laparotomia mediana  
FONTE: O Autor (2010).

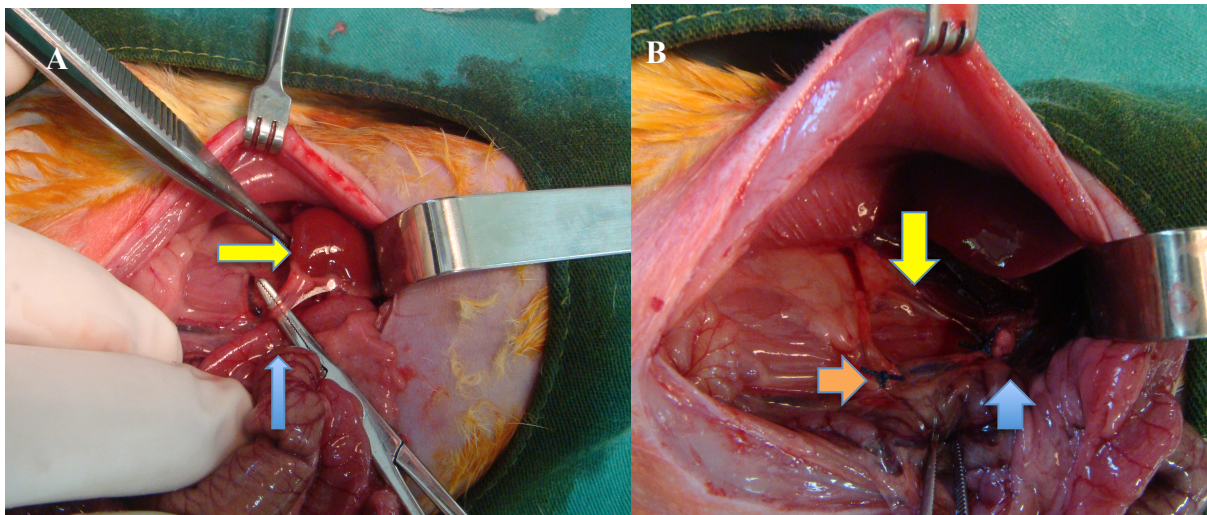


FIGURA 4 – Dissecção do rim (seta amarela) e ureter direitos (seta azul) (A); ligadura e nefrectomia direita (coto ureteral – seta laranja, pedículo vascular renal direito ligado – seta azul, loja renal – seta amarela) (B).

FONTE: O Autor (2010).

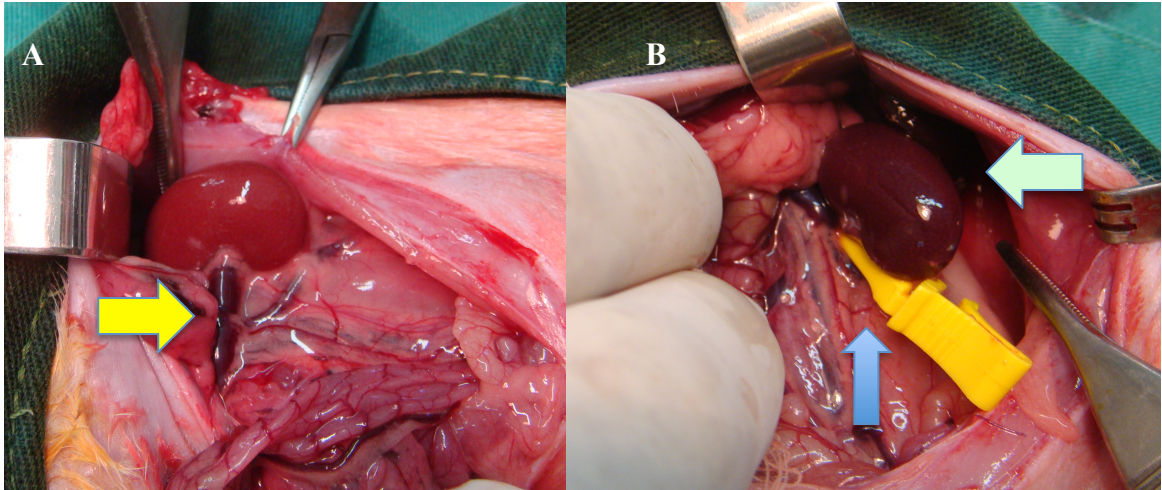


FIGURA 5 – Dissecção do rim esquerdo (pedículo vascular – seta amarela) (A) e clampeamento do pedículo vascular (seta azul) com isquemia renal esquerda (seta verde) (B).  
FONTE: O Autor (2010).

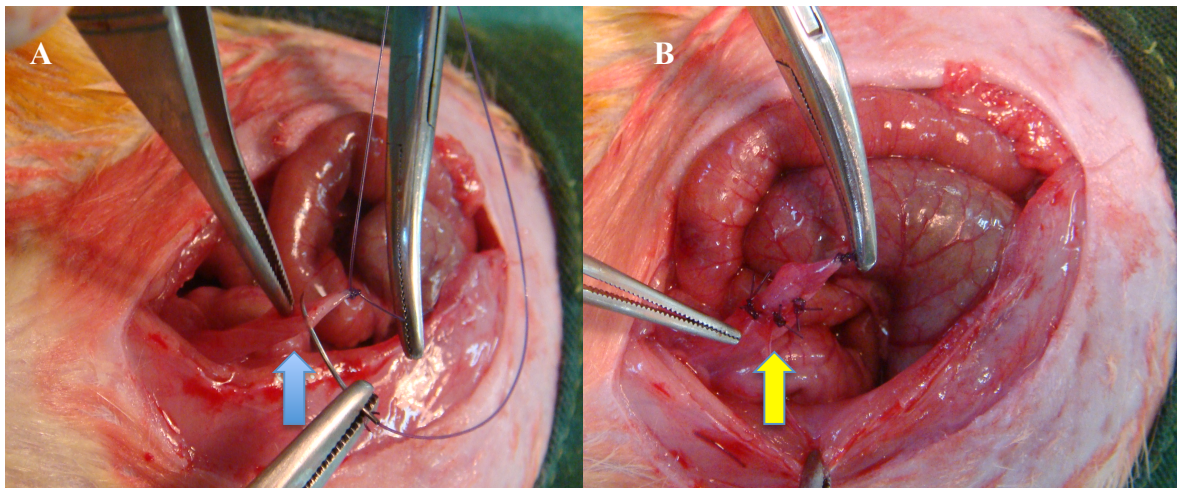


FIGURA 6 – Cistotomia (bexiga aberta longitudinalmente e início da síntese – seta azul) (A) e cistorrafia (parede vesical suturada – seta amarela) (B).  
FONTE: O Autor (2010).

Os grupos foram organizados da seguinte forma:

**GRUPO CONTROLE:** não foi submetido à intervenção cirúrgica. Constituído por 10 animais.

**GRUPO SHAM:** animais submetidos ao procedimento cirúrgico padrão e não receberam droga no pós-operatório. Constituído por 8 animais.

**GRUPO TAC0.1:** animais submetidos ao procedimento cirúrgico padrão e receberam no pós-operatório TACROLIMUS na dose 0,1 mg/kg/dia. Constituído por 10 animais.

GRUPO TAC1: animais submetidos ao procedimento cirúrgico padrão e receberam no pós-operatório TACROLIMUS na dose 1 mg/kg/dia. Constituído por 10 animais.

GRUPO TAC10: animais submetidos ao procedimento cirúrgico padrão e receberam no pós-operatório TACROLIMUS na dose 10 mg/kg/dia. Constituído por 9 animais.

GRUPO MMF: animais submetidos ao procedimento cirúrgico padrão e receberam no pós-operatório MICOFENOLATO MOFETIL na dose 20 mg/Kg/dia . Constituído por 10 animais.

GRUPO MMF/TAC1: animais submetidos ao procedimento cirúrgico padrão e receberam no pós-operatório MICOFENOLATO MOFETIL na dose 20 mg/Kg/dia associado a TACROLIMUS na dose 1 mg/kg/dia. Constituído por 11 animais.

GRUPO MMF/TAC0.5: animais submetidos ao procedimento cirúrgico padrão e receberam no pós-operatório MICOFENOLATO MOFETIL na dose 20 mg/Kg/dia associado a TACROLIMUS na dose 0,5 mg/kg/dia. Constituído por 10 animais.

Durante o experimento houve óbito de três animais, dois deles no período de pós-operatório imediato e um durante o curso de administração da droga (GRUPO TAC10).

Todos os animais receberam no primeiro dia de Pós-Operatório medicação analgésica com dipirona em dose única de 1 mg/Kg/dose por via subcutânea.

Todos os animais receberam dose diária de 0,5 ml de solução das drogas e concentrações descritas com solução fisiológica 0,9%, via gavagem com técnica e sonda de calibre adequados, sendo que os animais do GRUPO *SHAM* receberam apenas solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%.

Foram então mortos no 14º pós-operatório. Neste momento, após administração de nova anestesia como previamente descrita, foi realizada toracotomia mediana e punção cardíaca para retirada de amostra sanguínea para análises, com subsequente morte do animal. Logo após, realizou-se laparotomia com ressecção da cicatriz mediana anterior (utilizada em outro estudo) e exposição dos órgãos da cavidade abdominal.

Neste momento foi realizada a nefrectomia esquerda e preparação do órgão. Para análise histológica, após a ressecção do terço inferior do rim, o órgão foi bipartido longitudinalmente e acondicionado em cassete plástico devidamente identificado (FIGURA 7), sendo levado à solução de formalina a 10% e posteriormente preparado em bloco de parafina. Os blocos foram então seccionados em micrótomo e as lâminas preparadas e coradas em HEMATOXILINA E EOSINA. Para análise do estresse oxidativo tecidual do rim, uma amostra de tecido, que consistia do terço inferior do rim previamente seccionado, foi acondicionada em tubos de *Eppendorf* de 2 ml (FIGURA 8) e levada imediatamente a freezer de  $-20^{\circ}$  C e posteriormente a  $-80^{\circ}$  C, onde permaneceram até as análises descritas a seguir.



FIGURA 7 – Rim acondicionado em cassete plástico com identificação do grupo e número do animal.  
FONTE: O Autor (2010).



FIGURA 8 – Segmento renal acondicionado em tubo de *Eppendorf*.  
FONTE: O Autor (2010).

### 3.2 ANÁLISE BIOQUÍMICA DO SANGUE

O sangue coletado dos animais foi encaminhado para análise em Laboratório de Análises Bioquímicas e foram dosados Tacrolimus pelo método de quimioluminescência, e Creatinina, Uréia e Albumina séricas pelo método enzimático colorimétrico de química seca (BURTIS; ASHWOOD; BRUNS, 2012).

### 3.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E ESTEREOLÓGICA DOS RINS

Após a morte, dissecação e remoção dos rins, os mesmos foram pesados em balança de precisão semi analítica (Shimadzu, BL220S) e suas dimensões (comprimento, largura e espessura) foram mensuradas utilizando um paquímetro manual, sendo registrados os dados para posterior análise. O volume renal (V) foi calculado a partir das medidas lineares, utilizando a fórmula para o volume de um elipsóide recomendada por Barr (1990):  $\text{Volume (V)} = \text{Comprimento (C)} \times \text{Largura (L)} \times \text{Espessura (E)} \times 0,523$  (SAMPAIO; ARAÚJO, 2002).

Após a fixação em formalina 10% o material foi desidratado em uma série decrescente de xilol e álcoois, para posterior inclusão em blocos de parafina.

Após essa etapa, os rins foram submetidos aos cortes sucessivos em micrótomo com 7 $\mu$ m de espessura (American Optical, Spencer AO 820).

Para obtermos cortes aleatórios e uniformemente isotrópicos (cortes AUI) utilizou-se o método do *Disector* (STERIO, 1984) para obtenção dos planos superior e inferior. Os rins foram amostrados com dois cortes consecutivos, selecionados 1 a cada 5 cortes, representando uma espessura de 35 micrômetros entre os planos, para determinação dos parâmetros quantitativos tridimensionais dos glomérulos renais a partir de cortes bidimensionais.

Posteriormente, as lâminas histológicas foram montadas com 5 cortes de cada unidade renal para a execução da técnica histoquímica HEMATOXILINA & EOSINA (HE).

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

Para coloração de HE seguimos o protocolo clássico com algumas adaptações. As lâminas foram colocadas, por um minuto, em solução Hematoxilina 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. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S., 1983).

Todas as lâminas preparadas com a técnica histoquímica HE foram analisadas em fotomicroscópio NIKON ECLIPSE E200MV (NIKON INSTRUMENTS INC.) com sistema de captura de imagem CÂMERA BIOCAM CMOS SERIES 3.0® e software View 7.1.1.7® acoplados. Posteriormente, as imagens capturadas foram utilizadas para a análise dos parâmetros estereológicos para obtenção da densidade volumétrica ( $V_v[\text{glom}]$ ), densidade numérica ( $N_v[\text{glom}]$ ) e volume médio ( $Vol[\text{glom}]$ ) dos glomérulos renais.

Para determinar a tridimensão do rim utilizou-se o método estereológico Sistema-teste  $M_{42}$ . Esse foi superposto às imagens histológicas para a contagem de pontos e de intersecções-teste conforme descrito por Mandarim de Lacerda (MANDARIM-DE-LACERDA, 2000) (FIGURA 9).

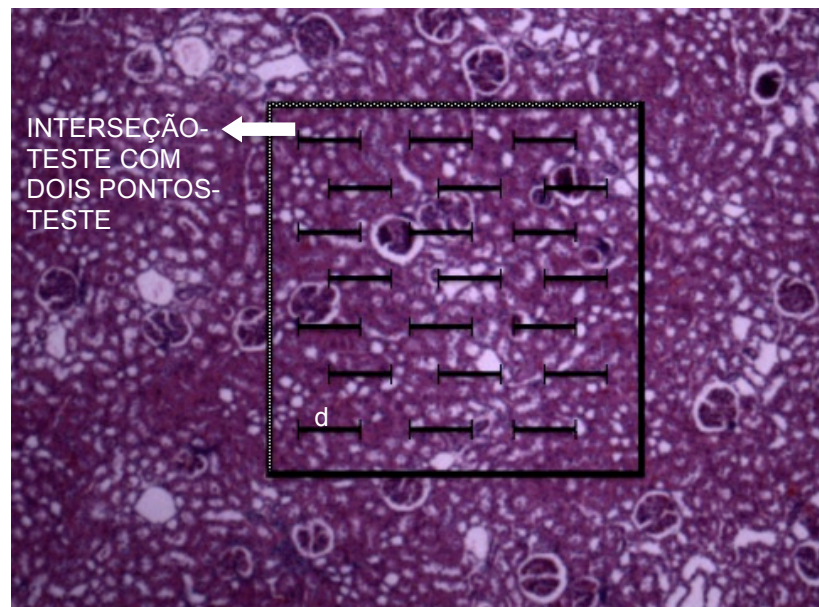


FIGURA 9 – Sistema-teste  $M_{42}$  superposto à córtex renal. Pode-se observar que alguns glomérulos são tocados pelos pontos-teste (extremidades das intersecções-teste) e estes então são incluídos na contagem de glomérulos. Distância “d” = 100 micrômetros. Aumento de 40x.  
FONTE: O Autor (2014).

Para obtenção da densidade volumétrica dos glomérulos renais:

$$Vv[\text{glom}] = P[\text{glom}]/PT \quad (\mu\text{m}^3)$$

onde:

$P[\text{glom}]$  = números dos pontos que cruzam os glomérulos renais

$PT$  = números de pontos-testes

Para obtenção da densidade numérica dos glomérulos renais:

$$\text{Vol}[\text{disector}] = e \cdot A_t$$

$$Nv[\text{glom}] = \Sigma Q_{A[\text{glom}]}^- / \text{Vol}[\text{disector}] \quad (1/\text{mm}^3)$$

onde:

$e$  = espessura do micrômetro

$A_t$  = área-teste do plano superior

$\Sigma Q_{A[\text{glom}]}^-$  = somatório do número de glomérulos renais

Para obtenção do volume médio dos glomérulos renais ( $V_{\text{glom}}$ ):

$$V[\text{glom}] = Vv[\text{glom}]/Nv[\text{glom}] \quad (\text{mm}^3)$$

onde:

$Vv$  = densidade volumétrica

$Nv$  = densidade numérica

### 3.4 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO TECIDUAL

As amostras de rim de cada animal foram homogeneizadas congeladas, em tubo completado para 2 mL de tampão fosfato salina (PBS) 0,1M, pH 7,4, com auxílio de homogeneizador de tecidos BioSpec Tissue-Tearor (BIOSPEC PRODUCTS, Bartlesville, USA). Os homogeneizados foram centrifugados por 20 min a 4°C a 12.000x g. Amostras de sobrenadante foram aliquotadas em tubos *Eppendorf* e armazenadas a - 80 °C para posterior realização das análises bioquímicas.

Para as análises referentes ao estresse oxidativo foram consideradas:

Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH): As amostras foram descongeladas em gelo, submetidas ao ultra-som (6 ciclos de 4s cada). Para cada 250  $\mu\text{l}$  de amostra, foram adicionados 50  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético (TCA) a 50% m.v<sup>-1</sup> para precipitação protéica após centrifugação a 1.000 xg por 15 min a 4°C. Para as leituras, foram adicionados 50  $\mu\text{l}$  do sobrenadante da amostra e 230  $\mu\text{l}$  de tampão Tris (400 mM, pH 8.9) em microplacas de 96 poços. Por último, 20  $\mu\text{l}$  de DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico) a 2.5 mM (em metanol a 25%, tampão Tris 300 mM, pH 8.9) foram acrescentados para medir a absorbância a 415 nm de comprimento de onda. Como branco foi utilizado 230  $\mu\text{l}$  do tampão Tris a 400 mM mais 50  $\mu\text{l}$  de TCA a 10% em PBS e a determinação do conteúdo de GSH fez-se através de comparação com curva-padrão de GSH (0, 1.25, 2.5, 5.0, 10  $\mu\text{g}$  GSH . ml<sup>-1</sup>) (SEDLAK e LINDSAY, 1968).

Os valores encontrados foram calculados e a concentração de Tióis não-proteicos expressos em nanomoles de tióis por mg de proteína.

Peroxidação lipídica (LPO): As amostras foram submetidas ao ultra-som por 3 min em gelo após acréscimo de metanol PA (500  $\mu\text{l}$ ) e centrifugadas a 1.000 xg por 10 min a 4°C. Para as leituras, 30  $\mu\text{l}$  do sobrenadante da amostra mais 270  $\mu\text{l}$  de meio de reação (laranja de xilenol a 100  $\mu\text{M}$ , H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 25 mM, BHT [hidroxitolueno butilado] a 4 mM, FeSO<sub>4</sub>.NH<sub>4</sub> [sulfato ferroso amoniacal] a 250  $\mu\text{M}$  acrescentados na seqüência descrita em metanol a 90% [solução apresenta uma coloração do dourado ao laranja] foram adicionados em microplaca de 96 poços. Após 30 min foi realizada a medida de absorbância a 550 nm de comprimento de onda (JIANG; WOOLLARD; WOLFF, 1991; JIANG; HUNT; WOLFF, 1992).

Os valores encontrados foram calculados e a concentração de Hidroperóxidos expressos em nanomoles de hidroperóxidos por mg de proteína.

Carbonilação de proteínas (PCO): Para realização deste ensaio, utilizou-se o método de Levine *et al.* (1994). Inicialmente procedeu-se à quantificação de proteínas totais: Em microplaca de 96 poços, foram aplicados 10  $\mu\text{l}$  do sobrenadante das amostras seguidos de 250  $\mu\text{l}$  do reativo de Bradford (Sigma®) e foram

realizadas as leituras de absorvância a 620 nm (valor ideal 595-600 nm). As concentrações de proteína foram determinadas a partir da comparação dos valores de absorvância obtidos com aqueles provenientes de uma curva-padrão de BSA realizada em paralelo, sendo que para essa curva-padrão, foi utilizada BSA nas concentrações de 0, 125, 250, 500 e 1000  $\mu\text{g}$  de BSA por mililitro de volume final (BSA em PBS) (BRADFORD, 1976).

Após a determinação da concentração de proteínas, as amostras foram normalizadas para  $2,0 \text{ mg.ml}^{-1}$ , diluindo-as com PBS. Foram separados 200  $\mu\text{l}$  do sobrenadante em dois tubos de 2 ml por amostra (uma para o teste e outra para o branco) e adicionado 500  $\mu\text{l}$  de HCl a 2 M aos brancos. Adicionou-se 500  $\mu\text{l}$  de meio de reação aos tubos testes e todos foram incubados a  $30\text{-}37^\circ\text{C}$  por 90 min. Posteriormente, adicionou-se 700  $\mu\text{l}$  de solução de ácido tricloroacético, sendo misturados em *vortex* e centrifugados a  $9.000 \text{ g}$ ,  $4^\circ\text{C}$  por 10 min, sendo descartado o sobrenadante. Novamente ressuspendeu-se o *pellet* em 1.0 ml de solução de etanol – acetato de etila gelado, misturado em *vortex* e centrifugar a  $9.000 \text{ g}$ ,  $4^\circ\text{C}$  por 10 min, sendo descartado o sobrenadante. Repetido este procedimento mais duas a três vezes (até que a solução de acetato de etila-etanol removida estivesse transparente). Novamente ressuspendeu-se o precipitado em 500  $\mu\text{l}$  de solução de hidrocloreto de guanidina, misturado em *vortex* e centrifugado a  $9.000 \text{ g}$ ,  $4^\circ\text{C}$  por 3 min. Aplicado 200  $\mu\text{l}$  das amostras em microplaca 96 poços (em duplicata) e medida a absorvância a 358 nm de comprimento de onda.

Os valores encontrados foram calculados e a concentração de Carbonilas expressos em nanomoles de carbonilas por mg de proteína.

Todas as leituras de espectrofotometria descritas acima foram realizadas em Leitora de Microplacas Infinite® 200 PRO - Tecan® (Tecan Group Ltd., Seestrasse – Männedorf, Switzerland).

### 3.5 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

Recorreu-se à análise descritiva dos dados através de tabelas e gráficos. Para a comprovação do objetivo deste trabalho foram utilizados os testes paramétrico “ANOVA” com pós-teste de “TUKEY” e o não-paramétrico “Mann-Whitney”. Para tais análises foi utilizado o software “*PRISM 5 for Windows – version 5.0*” (GraphPad Software, Inc., 2007). O nível de significância (erro  $\alpha$ ) adotado foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

As análises foram realizadas em conjunto para todas as amostras e todos os espécimes coletados dos animais de todos os grupos do experimento.

Após coletados os dados, estes foram divididos em dois grupos para fins de comparação e demonstração dos resultados do experimento, conforme segue:

### 4.1 ANÁLISE COMPARATIVA DA DOSE-RESPOSTA COM USO DO TACROLIMUS

Esta avaliação comparativa objetivou a resposta dos diferentes parâmetros com relação a doses logarítmicas do tacrolimus e seu potencial dano tecidual renal.

Para esta análise foram comparados os grupos: CONTROLE, *SHAM*, TAC0.1, TAC1 e TAC10.

### 4.2 ANÁLISE COMPARATIVA DA ASSOCIAÇÃO DE DROGAS IMUNOSSUPRESSORAS

Esta avaliação comparativa objetivou a resposta dos diferentes parâmetros com relação a associação de tacrolimus com micofenolato mofetila e se este último pode reduzir a toxicidade do primeiro em dose menor.

Para esta análise foram considerados os grupos: CONTROLE, *SHAM*, TAC1, MMF, MMF/TAC1 e MMF/TAC0.5.

#### 4.1 ANÁLISE COMPARATIVA DA DOSE-RESPOSTA COM USO DO TACROLIMUS

Os animais do grupo CONTROLE tinham peso inicial médio de 250 g e peso final médio de 317 g (+26,8%). Os animais do grupo *SHAM* pesavam inicialmente 221 g em média, com peso final médio de 277 g (+25,3%). O grupo TAC0.1 apresentava peso inicial médio de 234 g e final de 283 g (+21%). Os animais do grupo TAC1 tiveram peso inicial médio de 245 g e final médio de 295 g (+20,4%). O grupo TAC10 teve peso inicial de 240 g e final de 246 g (+2,5%).

##### 4.1.1 Análises bioquímicas

Todas as amostras de sangue coletado foram submetidas a dosagem bioquímica de Tacrolimus, Creatinina, Uréia e Albumina séricos. Os dados revelam que as amostras foram suficientes e adequadas para a dosagem.

A dosagem do Tacrolimus mostrou diferença entre os grupos de administração da droga, confirmando que esta foi adequadamente absorvida durante o período de estudo. Houve diferença estatística na dosagem sérica da droga no grupo TAC10, mostrando maior concentração de Tacrolimus no sangue destes animais (TABELA 1).

Os valores de creatinina séricos encontrados não apresentaram diferença estatística entre os grupos CONTROLE, *SHAM*, TAC0.1 e TAC1. O grupo TAC10 mostrou dosagem de  $0,50 \pm 0,05$  mg/dl e foi significativamente maior que os outros grupos (TABELA 1).

A dosagem de uréia sérica, no entanto, revelou que o grupo CONTROLE foi significativamente menor que os outros grupos, com valor de  $44,9 \pm 2,85$  mg/dl. O grupo *SHAM* também apresentou valores menores que os demais, com  $53,75 \pm 4,71$  mg/dl. Os grupos TAC1 e TAC0.1 apresentaram valores estatisticamente similares, enquanto o TAC10 mostrou a dosagem média de  $71 \pm 7,07$  mg/dl, sendo significativamente maior que os outros animais (TABELA 1).

A dosagem de albumina sérica mostrou valores estatisticamente similares entre os grupos CONTROLE e TAC1, com valores de  $2,79 \pm 0,11$  g/dl e  $2,90 \pm 0,26$  g/dl, respectivamente. O grupo *SHAM* mostrou média de  $2,89 \pm 0,08$ , sendo similar ao grupo TAC1 e diferente dos demais. Os grupos TAC0.1 e TAC10 tiveram valores

semelhantes, sendo estatisticamente similares ao grupo CONTROLE e menores que dos grupos *SHAM* E TAC1 (TABELA 1).

TABELA 1 – AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS – DOSE/RESPOSTA

GRUPO	TACROLIMUS (ng/ml)	CREATININA (mg/dl)	URÉIA (mg/dl)	ALBUMINA (g/dl)
CONTROLE	N.A.	0,42 ± 0,14	44,90 ± 2,85 <sup>*#</sup>	2,79 ± 0,11
<i>SHAM</i>	N.A.	0,41 ± 0,04	53,75 ± 4,71 *	2,89 ± 0,08*
TAC0.1	0,30 ± 0,19	0,34 ± 0,05	71,00 ± 7,07	2,67 ± 0,22
TAC1	0,49 ± 0,23	0,37 ± 0,05	72,60 ± 6,28	2,90 ± 0,26*
TAC10	2,22 ± 0,74 *	0,50 ± 0,05*	94,63 ± 10,81 *	2,66 ± 0,22

NOTA: \*, # p<0,05 – diferença estatisticamente significativa; Valores apresentados em média ± desvio padrão.

FONTE: O Autor (2014).

#### 4.1.2 Análise morfométrica renal

No que refere à volumetria renal, encontrou-se que o VOLUME renal foi similar entre os grupos CONTROLE e GRUPO TAC10, e entre os grupos *SHAM*, TAC0.1 e TAC1. Houve diferença estatística entre os grupos CONTROLE e grupos *SHAM*, TAC0.1 e TAC1, e entre os TAC0.1 e TAC10. Vale ressaltar que a diferença de volume entre os grupos TAC1 e TAC10 não mostrou significância estatística, porém o p=0,06 mostra que houve uma tendência à diferença (TABELA 2).

O PESO renal mostrou semelhança entre os grupos CONTROLE e TAC10, e entre os grupos *SHAM*, TAC0.1 e TAC1, sendo estes diferentes estatisticamente dos primeiros (TABELA 2).

TABELA 2 – MORFOMETRIA RENAL – DOSE/RESPOSTA

GRUPO	VOLUME RENAL (mm <sup>3</sup> )	PESO RENAL (g)
CONTROLE	817,5 ± 170,3 *	1,2150 ± 0,1446 *
SHAM	1.240,8 ± 341,1	1,5125 ± 0,1680
TAC0.1	1.211,1 ± 169,4	1,5590 ± 0,1584
TAC1	1.102,2 ± 117,6	1,4510 ± 0,1422
TAC10	931,7 ± 205,9 *	1,1575 ± 0,1501 *

NOTA: \* p<0,05 – diferença estatisticamente significativa; Valores apresentados em média ± desvio padrão.

FONTE: O Autor (2014).

#### 4.1.3 Análise estereológica

Após análise estereológica observou-se que não houve diferença na densidade de volume glomerular ( $Vv_{glom}$ ) na comparação entre os grupos (GRÁFICO 1). Da mesma forma, os valores de densidade numérica glomerular ( $Nv_{glom}$ ) não mostraram diferença estatística (GRÁFICO 2).

**Densidade de Volume Glomerular ( $Vv_{glom}$ )**

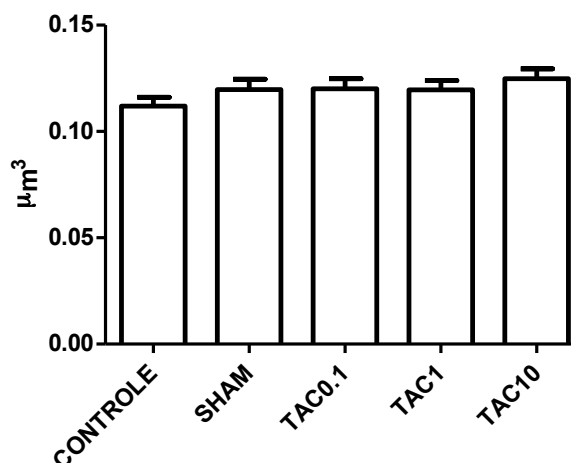


GRÁFICO 1 – DENSIDADE DE VOLUME GLOMERULAR (DOSE-RESPOSTA)

NOTA: Os valores de  $Vv_{glom}$  não mostraram diferença estatisticamente significativa.

FONTE: O Autor (2014).

### Densidade Numérica Glomerular ( $Nv_{glom}$ )

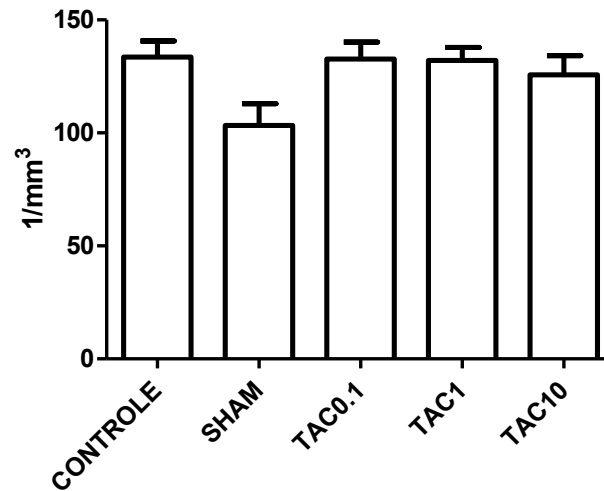


GRÁFICO 2 – DENSIDADE NUMÉRICA GLOMERULAR (DOSE-RESPOSTA)

NOTA: O grupo *SHAM* apresentou valores menores que os demais, com nível de significância  $p=0,07$ .

FONTE: O Autor (2014).

O volume glomerular médio ( $V_{glom}$ ) do grupo *SHAM* foi o maior encontrado, mostrando diferença estatística dos grupos CONTROLE, TAC0.1 e TAC1. O grupo TAC10 teve  $V_{glom}$  maior que o CONTROLE, sendo similar aos demais.

### Volume Glomerular ( $V_{glom}$ )

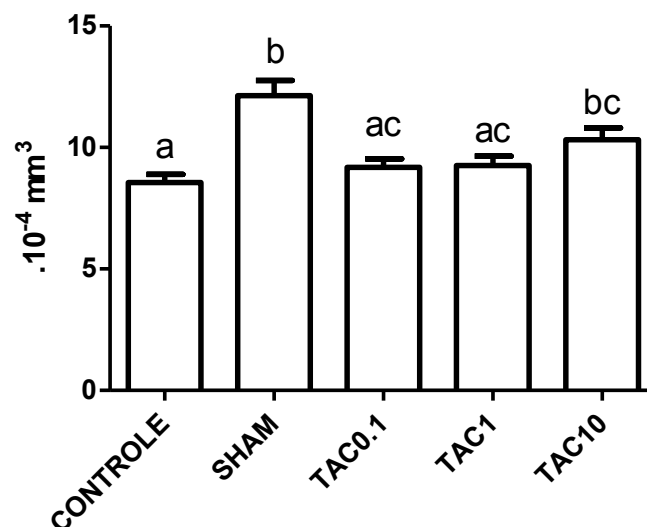


GRÁFICO 3 – VOLUME GLOMERULAR MÉDIO (DOSE-RESPOSTA)

NOTA: Para letras diferentes houve diferença estatística, e letras iguais mostram que não houve diferença entre os grupos.

FONTE: O Autor (2014).

Não foi encontrada esclerose glomerular ou fibrose/espessamento da cápsula de Bowman para fins de comparação entre os grupos.

#### 4.1.4 Análise do estresse oxidativo tecidual

As dosagens bioquímicas de Tióis não-proteicos (GSH) mostraram que houve aumento na concentração nos grupos TAC1 e TAC10, sendo de significância estatística apenas a comparação entre TAC10 e TAC0.1 (GRÁFICO 4).

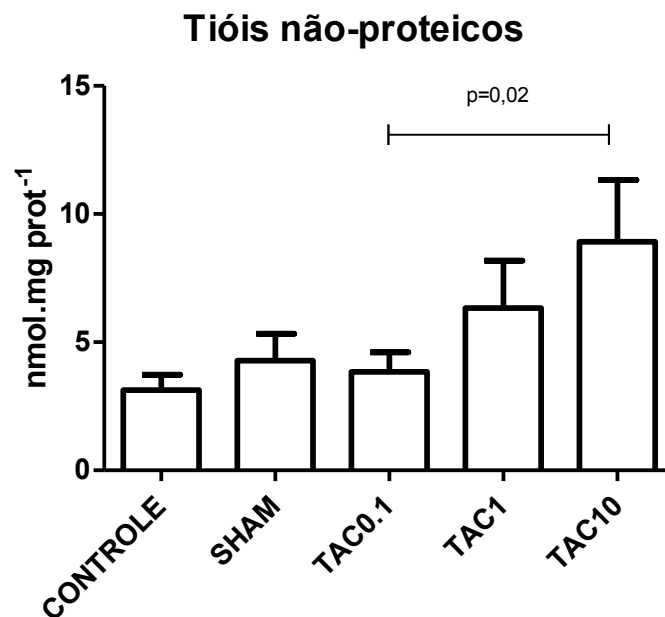


GRÁFICO 4 – CONCENTRAÇÃO DE TIÓIS NÃO-PROTEICOS (DOSE-RESPOSTA)

NOTA: Houve diferença estatística entre TAC0.1 e TAC10, com  $p=0,02$ .

FONTE: O Autor (2014).

As concentrações de Hidroperóxidos (LPO) e de Carbonilas protéicas (PCO) não mostraram diferença significativa entre os grupos na avaliação da Dose-Resposta com uso do tacrolimus (GRÁFICOS 5 e 6).

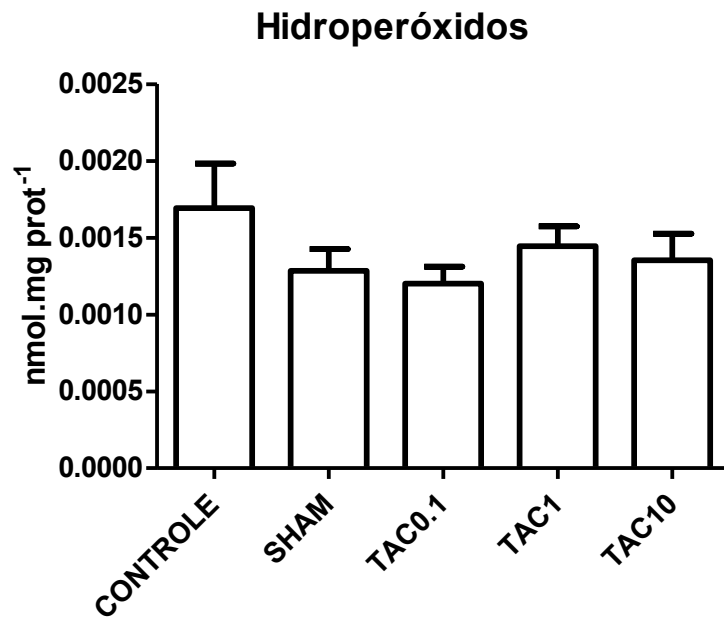


GRÁFICO 5 – CONCENTRAÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS (DOSE-RESPOSTA)

NOTA: Não houve diferença estatística entre os grupos.

FONTE: O Autor (2014).

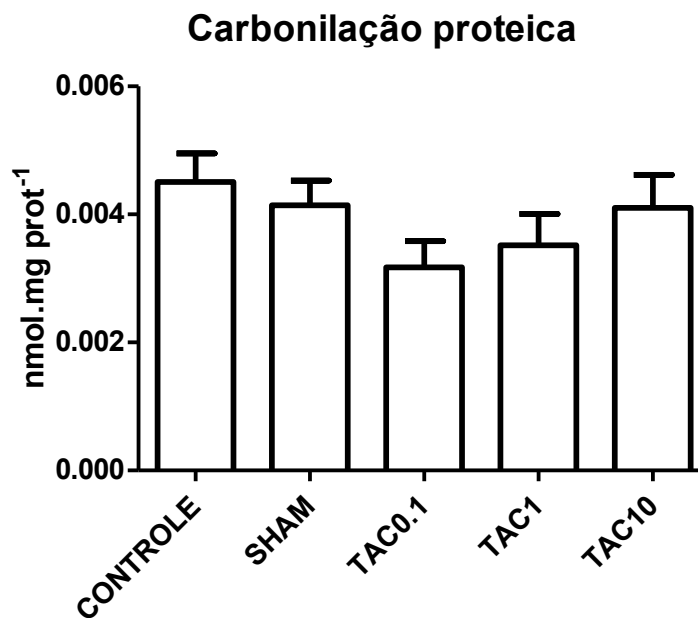


GRÁFICO 6 – CONCENTRAÇÃO DE CARBONILAS (DOSE-RESPOSTA)

NOTA: Não houve diferença estatística entre os grupos.

FONTE: O Autor (2014).

## 4.2 ANÁLISE COMPARATIVA DA ASSOCIAÇÃO DE DROGAS IMUNOSSUPRESSORAS

Os animais do grupo CONTROLE tinham peso inicial médio de 250 g e peso final médio de 317 g (+26,8%). Os animais do grupo *SHAM* pesavam inicialmente 221 g em média, com peso final médio de 277 g (+25,3%). Os animais do grupo TAC1 tiveram peso inicial médio de 245 g e final médio de 295 g (+20,4%). O grupo MMF mostrou peso inicial médio de 247 g e final de 305 g (+23,5%). O grupo MMF/TAC1 teve peso inicial médio de 254 g e final de 304 g (+19,7%). O grupo MMF/TAC0.5 apresentou peso inicial de 248 g e final de 303 g (+22,2%).

### 4.2.1 Análises bioquímicas

As amostras avaliadas para dosagem de tacrolimus mostraram que houve diferença estatística entre os grupos TAC1 e MMF/TAC0.5. A comparação dos grupos MMF/TAC1 e MMF/TAC0.5 teve nível de significância  $p=0,06$ , demonstrando que, apesar de não haver diferença estatística, há uma tendência (TABELA 3).

Os valores de creatinina sérica revelaram que não houve diferença estatística entre os grupos CONTROLE, *SHAM* e TAC1, sendo que estes tiveram valores estatisticamente menores que os dos grupos MMF, MMF/TAC1 e MMF/TAC0.5 (TABELA 3).

A dosagem de uréia sérica mostrou diferença estatística do grupo CONTROLE, com valor inferior de  $44,90 \pm 2,85$  mg/dl, e TAC1 com valor superior de  $72,60 \pm 6,28$  mg/dl. A dosagem do grupo *SHAM* também foi diferente estatisticamente dos demais grupos, com excessão do MMF. Os valores de MMF e MMF/TAC1 mostraram diferença estatística, sendo que não houve diferença destes com o grupo MMF/TAC0.5 (TABELA 3).

A albumina sérica não mostrou diferença estatística entre os grupos comparados, com excessão do grupo *SHAM*, que foi significativamente maior que os grupos CONTROLE, MMF e MMF/TAC1 (TABELA 3).

TABELA 3 – AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS – ASSOCIAÇÃO DE DROGAS

GRUPO	TACROLIMUS (ng/ml)	CREATININA (mg/dl)	URÉIA (mg/dl)	ALBUMINA (g/dl)
CONTROLE	N.A.	0,42 ± 0,14	44,90 ± 2,85 *	2,79 ± 0,11
SHAM	N.A.	0,41 ± 0,04	53,75 ± 4,71 <sup>*#</sup>	2,89 ± 0,08 *
TAC 1	0,49 ± 0,23 *	0,37 ± 0,05	72,60 ± 6,28 *	2,90 ± 0,26
MMF	N.A.	0,55 ± 0,12 *	58,10 ± 7,14 <sup>*#</sup>	2,74 ± 0,21
MMF/TAC1	0,39 ± 0,19	0,57 ± 0,15 *	66,64 ± 5,66	2,70 ± 0,24
MMF/TAC0.5	0,24 ± 0,14	0,58 ± 0,13 *	61,50 ± 8,96	2,85 ± 0,19

NOTA: \*,<sup>#</sup> p<0,05 – diferença estatisticamente significativa; Valores apresentados em média ± desvio padrão.

FONTE: O Autor (2014).

#### 4.2.2 Análise morfométrica renal

O volume renal aferido foi menor estatisticamente no grupo CONTROLE. Os grupos SHAM, TAC1, MMF/TAC1 e MMF/TAC0.5 foram similares e o grupo MMF mostrou valores estatisticamente maiores que os TAC1 e MMF/TAC0.5, não tendo diferença estatística de MMF/TAC1 (TABELA 4).

A aferição do peso renal revelou valores estatisticamente menores no grupo CONTROLE. Os outros grupos da comparação não apresentaram diferença estatística (TABELA 4).

TABELA 4 – MORFOMETRIA RENAL – ASSOCIAÇÃO DE DROGAS

GRUPO	VOLUME RENAL (mm <sup>3</sup> )	PESO RENAL (g)
CONTROLE	817,5 ± 170,3 *	1,2150 ± 0,1446 *
SHAM	1.240,8 ± 341,1	1,5125 ± 0,1680
TAC 1	1.102,2 ± 117,6	1,4510 ± 0,1422
MMF	1.279,5 ± 107,1 *	1,5320 ± 0,2378
MMF/TAC1	1.201,8 ± 247,7	1,5109 ± 0,2823
MMF/TAC0.5	1.139,3 ± 140,9	1,5900 ± 0,1621

NOTA: \* p<0,05 – diferença estatisticamente significativa; Valores apresentados em média ± desvio padrão.

FONTE: O Autor (2014).

#### 4.2.3 Análise estereológica

A aferição quantitativa da densidade de volume glomerular ( $V_{v_{glom}}$ ) revelou diferença estatística apenas entre os grupos CONTROLE e MMF/TAC0.5. Os outros grupos foram similares (GRÁFICO 7).

#### Densidade de Volume Glomerular ( $V_{v_{glom}}$ )

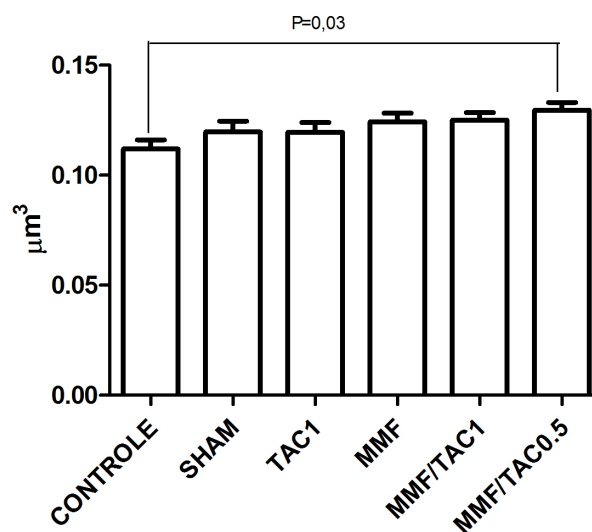


GRÁFICO 7 – DENSIDADE DE VOLUME GLOMERULAR (ASSOCIAÇÃO DE DROGAS)

NOTA: O valor de  $p=0,03$  evidencia que apenas CONTROLE e MMF/TAC0.5 tem diferença estatística.

FONTE: O Autor (2014).

Os valores de  $Nv_{glom}$  não apresentaram diferença estatística na comparação dos grupos de associação de drogas (GRÁFICO 8).

### Densidade Numérica Glomerular ( $Nv_{glom}$ )

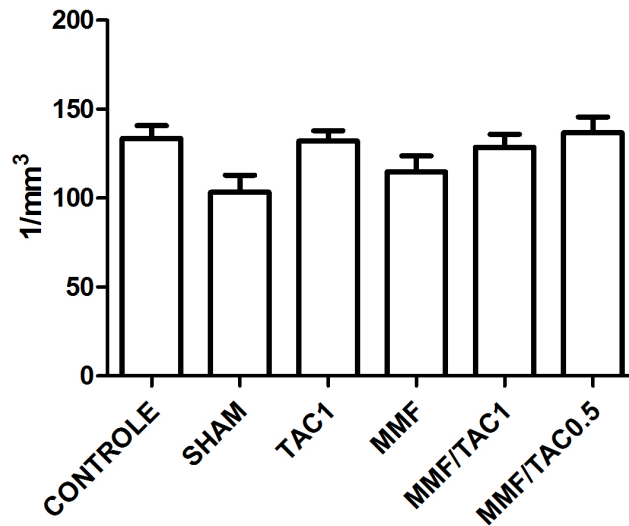


GRÁFICO 8 – DENSIDADE NUMÉRICA GLOMERULAR (ASSOCIAÇÃO DE DROGAS)

Nota: Não houve diferença estatística entre os grupos.

FONTE: O Autor (2014).

O  $V_{glom}$  calculado demonstrou que o grupo *SHAM* foi estatisticamente maior que os demais, exceto quando comparado ao *MMF*. Os grupos *TAC1* e *MMF* foram significativamente diferentes, e estes foram similares aos *MMF/TAC1* e *MMF/TAC0.5* (GRÁFICO 9).

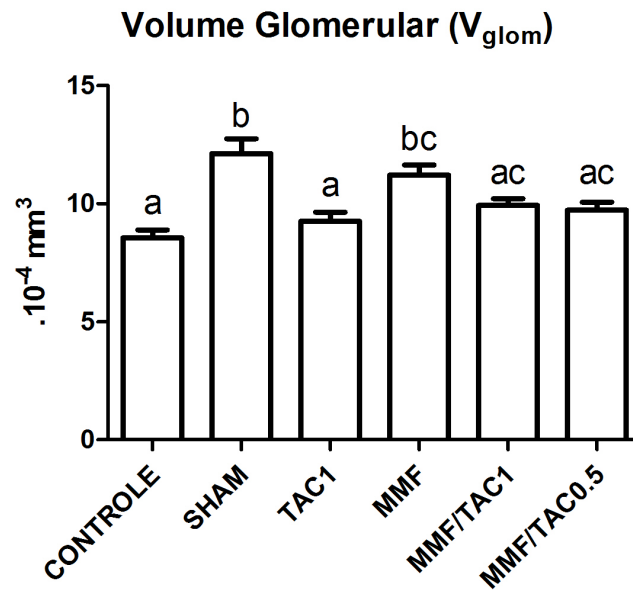


GRÁFICO 9 – VOLUME GLOMERULAR MÉDIO (ASSOCIAÇÃO DE DROGAS)

NOTA: Para letras diferentes houve diferença estatística, e letras iguais mostram que não houve diferença entre os grupos.

FONTE: O Autor (2014).

Não foram encontradas esclerose glomerular ou fibrose/espessamento da cápsula de Bowman na avaliação histológica para fins de comparação entre os grupos

#### 4.2.4 Análise do estresse oxidativo tecidual

A dosagem de Tióis não-proteicos foi significativamente mais alta no grupo MMF, quando comparada aos demais. Apesar de não alcançar diferença estatística, a comparação entre os grupos MMF/TAC1 e MMF/TAC0.5 teve nível de significância  $p=0,06$  (GRÁFICO 10).

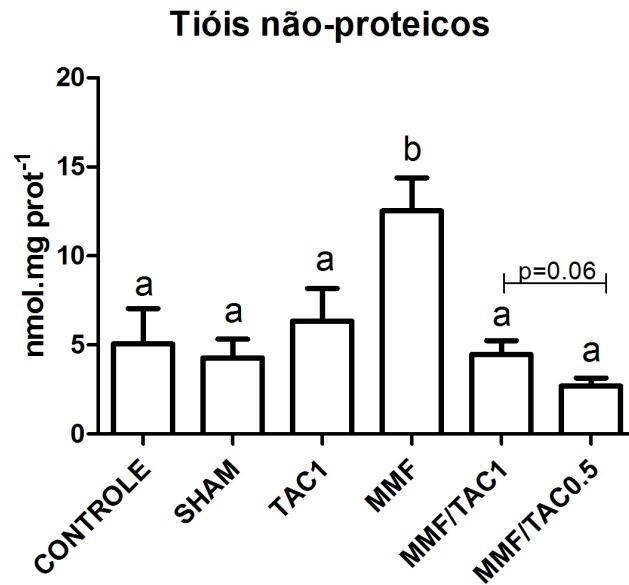


GRÁFICO 10 – CONCENTRAÇÃO DE TIÓIS NÃO-PROTEICOS (ASSOCIAÇÃO DE DROGAS)

NOTA: Para letras diferentes houve diferença estatística, e letras iguais mostram que não houve diferença entre os grupos.

FONTE: O Autor (2014).

A concentração de Hidroperóxidos encontrada foi significativamente menor nos grupos MMF e MMF/TAC0.5. Os outros grupos de associação de drogas não foram diferentes estatisticamente (GRÁFICO 11).

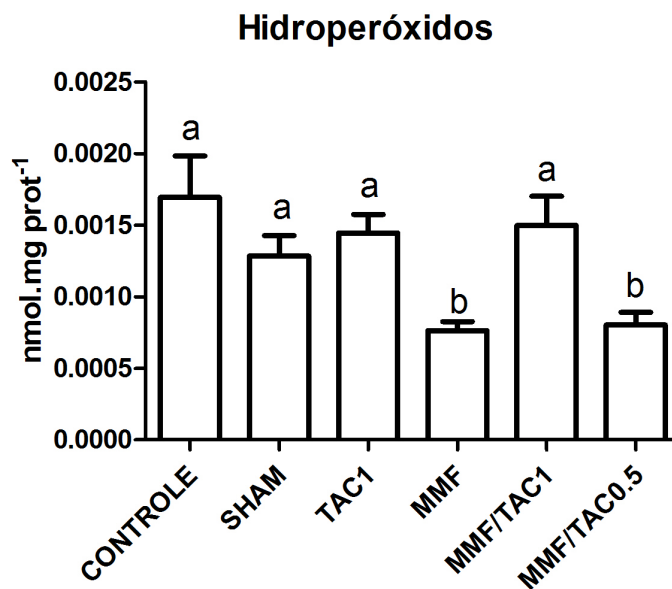


GRÁFICO 11 – CONCENTRAÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS (ASSOCIAÇÃO DE DROGAS)

NOTA: Para letras diferentes houve diferença estatística, e letras iguais mostram que não houve diferença entre os grupos.

FONTE: O Autor (2014).

A concentração de Carbonilas proteicas encontrada em menor quantidade no grupo MMF, sendo esta diferença estatisticamente significativa, exceto quando comparada à TAC1, cuja diferença teve nível de significância  $p=0,08$ . Os grupos TAC1 e MMF/TAC1 também apresentaram significância estatística na sua diferença, sendo que foram similares ao MMF/TAC0.5 (GRÁFICO 12).

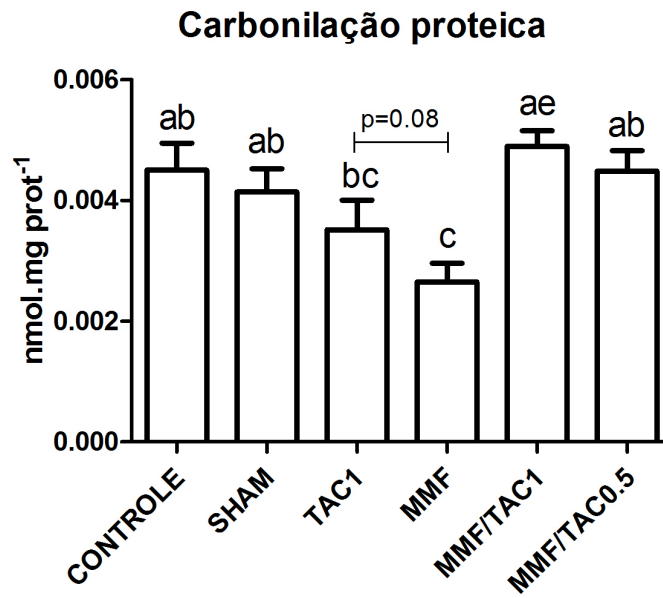


GRÁFICO 12 – CONCENTRAÇÃO DE CARBONILAS (ASSOCIAÇÃO DE DROGAS)

NOTA: Para letras diferentes houve diferença estatística, e letras iguais mostram que não houve diferença entre os grupos.

FONTE: O Autor (2014).

## 5 DISCUSSÃO

Os transplantes de órgãos sólidos, e em especial o transplante de Rim, podem ser considerados um desafio biológico tanto para o hospedeiro que recebe um aloenxerto quanto para o próprio órgão a ser implantado. Tal desafio pode ser dividido em múltiplas provas e suas reações orgânicas correspondentes, sendo as principais: PROVA FÍSICA (procedimento cirúrgico, manipulação de órgãos); PROVA BIOLÓGICA (reação cicatricial, isquemia, recirculação); PROVA IMUNOLÓGICA (reação imunológica do hospedeiro); PROVA QUÍMICA (resposta orgânica às drogas, toxicidade das drogas) (SUTHANTHIRAN; STROM, 1994; PASCUAL *et al.*, 2002).

Os imunossupressores são imprescindíveis no transplante de órgãos. Estas drogas possuem efeitos colaterais diversos (SRINIVAS; MEIER-KRIESCHE, 2008) e muitas vezes acabam afetando o próprio funcionamento do órgão transplantado. No caso do transplante renal, existem vários esquemas de imunossupressão, no entanto, em nosso meio o esquema mais amplamente utilizado é uma associação inicial de Tacrolimus e Micofenolato Mofetil, associado a Corticosteróide (HALLORAN, 2004; EAU, 2009).

O delineamento do estudo teve como objetivo avaliar o comportamento biológico do rim nos diferentes cenários de exposição aos imunossupressores comumente usados no transplante renal. Desta forma, para quantificar a toxicidade renal frente ao tacrolimus, droga sabidamente nefrotóxica, utilizou-se de um método de avaliação de dose-resposta de toxicidade por drogas, o qual emprega uma dose padronizada e duas outras doses em valores logarítmicos acima e abaixo (VALADARES, 2007; OECD 425 *guideline*, 2006). Neste tocante, optou-se pelo período de exposição subaguda de 2 semanas, conforme preconizado pelo *guideline* 407 da OECD (*Organisation for Economic Cooperation and Development*), no intuito de prevenir óbitos desnecessários devido à dose tóxica do tacrolimus e ao mesmo tempo permitir que houvesse prazo suficiente para sair da fase inflamatória da cicatrização.

Além disso, estudos recentes demonstraram que pode haver efeito sinérgico entre os imunossupressores, e assim, poderia haver benefício na associação de drogas com o intuito de diminuir a toxicidade dos CNI (FRIMAT *et al.*, 2006). Neste sentido, foram delineados os grupos de estudo para avaliação da toxicidade renal

frente ao tacrolimus e ao micofenolato, e à associação de ambos em dose padrão e dose reduzida (50% da dose) do tacrolimus.

O tempo de isquemia renal tem sido alvo de estudos com objetivo de estimar qual o tempo ideal para que não ocorram lesões irreversíveis (WEIGHT; BELL; NICHOLSON, 1996). Neste sentido há modelos de isquemia renal quente (JABLONSKI *et al.*, 1983) e fria (HERRERO *et al.*, 1999), sendo que a maior parte dos autores suporta que isquemia quente menor que 30 minutos é adequada para prevenir lesões definitivas em decorrência da hipoperfusão e hipóxia (THOMPSON *et al.*, 2010). No presente estudo utilizou-se tempo de isquemia de 20 minutos por clampamento do pedículo vascular renal, com o objetivo principal de promover uma prova perfusional no órgão e estimular que houvesse resposta do órgão ao estresse de isquemia e reperfusão, sem, no entanto, gerar possíveis lesões definitivas que comprometessem sua função. Neste sentido, Schumer *et al.* (1992) já mostraram que mesmo com tempo de isquemia quente de 5 minutos se inicia processo de estresse oxidativo e apoptose em células do rim, em resposta à lesão isquêmica e posterior reperfusão do órgão, sendo que tais respostas são reversíveis e que não levam a alteração na função renal.

Assim, o presente experimento teve como premissa reproduzir algumas das condições adversas relativas ao transplante renal, em especial àquelas relacionadas com prova de isquemia e reperfusão e uso de drogas imunossupressoras, sem que houvesse o viés da resposta imune, para que pudesse ser melhor avaliada a reação do órgão frente às drogas utilizadas.

O peso dos animais variou entre 221 e 254 g e houve ganho de peso pelos animais de todos os grupos que variou de 20% a 26%, com exceção dos animais do grupo TAC10 que teve variação positiva de apenas 2,5%. A evolução do peso dos animais está de acordo com os achados de Tomanari, Pine e Silva (2003), cujos animais apresentaram curva ascendente de ganho ponderal até aproximadamente 180 dias de vida quando submetidos à dieta *ad libitum*. Por outro lado, estes e outros pesquisadores (CURI *et al.*, 1989; CONNOR *et al.*, 2004) demonstraram que animais submetidos à dietas restritivas, restrição hídrica ou drogas tóxicas apresentaram redução de ganho ou até perda de peso corporal, o que é compatível com os achados dos animais aqui submetidos à dose tóxica de tacrolimus (10 mg/kg de peso). Comparativamente, Klawitter *et al.* (2014) encontraram ganho ponderal e

perda de peso em ratos submetido à tratamento com tacrolimus em doses de 1 e 3 mg/kg, respectivamente.

Outro parâmetro de nutrição avaliado foi a dosagem de albumina sérica. Esta é a principal proteína sérica, e tem relação direta com a biodisponibilidade do tacrolimus, uma vez que o transporte sanguíneo da droga ocorre principalmente ligada à albumina e às hemácias (IWASAKI, 2007). No presente estudo, demonstrou-se que os valores de albumina sérica permaneceram estáveis em todos os grupos, sendo que apenas o grupo TAC1 teve valores pouco maiores da proteína. Tais achados são compatíveis com os de outros pesquisadores e biotérios do país, o que reflete uma adequada nutrição dos animais estudados (DINIZ *et al.*, 2006; CASTELLO BRANCO *et al.*, 2011; SPINELLI *et al.*, 2012).

A administração das drogas foi realizada via gavagem para que todos os animais recebessem igual manipulação no pós-operatório. Para tal procedimento foi realizada a diluição adequada das drogas nas doses conforme cada grupo do estudo. Esta forma de administração das drogas já foi previamente avaliada em estudo de toxicidade por drogas imunossupressoras publicado por Jain, Bicknell e Nicholson (2000). A dosagem sérica foi realizada apenas da concentração de tacrolimus, uma vez que esta é a droga conhecidamente nefrotóxica e também pelo fato de a dosagem sérica de micofenolato não estar disponível em nosso meio. Os resultados encontrados mostraram diferentes concentrações da droga nos grupos TAC0.1, TAC1 e TAC10, sendo estatisticamente significante apenas a dosagem em TAC10, a qual foi significativamente maior. Quando tomada a comparação de associação de drogas, o grupo MMF/TAC0.5 foi menor que o grupo TAC1, e tendendo a menor que MMF/TAC1. Os resultados são condizentes com as doses utilizadas, uma vez que doses mais baixas apresentaram concentrações séricas mais baixas. Houve, no entanto, fato que todas as dosagens mostraram valores abaixo do que se considera a faixa terapêutica para transplantes renais. As recomendações de imunossupressão pós-transplante preconizam que a concentração de tacrolimus no sangue deve estar entre 5-20 ng/ml (HALLORAN, 2004; ASTELLAS PHARMA US INC, 2005; EAU, 2009).

Estudos recentes mostram que a biodisponibilidade de drogas imunossupressoras administradas por via oral, podem sofrer alterações em decorrência de sua absorção, metabolismo de primeira passagem intestinal e hepática e também interações com outras drogas comumente associadas nos

transplantados (OKABE *et al.*, 2002). Além disso, a farmacocinética no animal de experimentação tem particularidades que diferem do humano. Neste sentido, Venkataramanan *et al.* (1995) mostrou que o tacrolimus administrado pelo tubo digestivo do rato é parcialmente metabolizado no intestino e na primeira passagem hepática, sendo que aproximadamente 25% da dose fornecida estará biodisponível. Assim, optou-se pelo aumento da dose padrão, que foi de 1 mg/kg/dia, a qual também já foi avaliada por outros autores (KLAWITTER *et al.*, 2014) em experimentos com ratos. Comparativamente, a dose padrão preconizada para administração via oral em humanos é de 0,1 – 0,3 mg/kg/dia (ASTELLAS PHARMA, 2005), sendo a dose padrão do presente estudo adequada para equiparação. Com relação ao micofenolato mofetil, Braun *et al.* (2009) observou que pode haver aumento na sua biodisponibilidade frente ao uso associado com tacrolimus, no entanto tal achado não foi o mesmo de outro estudo conduzido por van Gelder *et al.* (2001). Não há descrição de estudos que mostrem alterações significativas na biodisponibilidade do tacrolimus frente à administração associada ao micofenolato (ASTELLAS PHARMA, 2005).

Outros aspectos importantes a serem observados dizem respeito à distribuição da droga, ao seu *clearance* e principalmente ao tempo de meia-vida de eliminação ( $t_{1/2}$ ) do fármaco. Estudos em ratos mostram que o  $t_{1/2}$  é de 2,5 a 7 horas, enquanto em humanos transplantados gira em torno de 12 horas, podendo chegar até a 45 horas em indivíduos saudáveis normais. Da mesma forma, nos ratos há um maior volume de distribuição da droga (14-20 L/Kg) e mais elevado *clearance* (2-2,5 L/h/Kg) que o demonstrado pela farmacocinética em humanos (1 L/Kg e 0,1 L/h/Kg, respectivamente) (VENKATARAMANAN *et al.*, 1995; ARIMA *et al.*, 2001).

Assim, consideradas estas variáveis e também o fato que a última administração das drogas ocorreu entre 24 e 28 horas antes da coleta de sangue para dosagem, justifica-se o achado das concentrações séricas estarem abaixo dos valores considerados ideais para a faixa terapêutica. Pondera-se da mesma forma que a janela terapêutica do tacrolimus é bastante estreita e o limiar de toxicidade da droga é baixo, o que limita o aumento da dose de administração. Por outro lado, extrapolando os dados de farmacocinética, pode-se inferir que as concentrações do fármaco estiveram adequadas a maior parte do tempo, permitindo assim que houvesse ação da droga nos órgãos alvo e conseqüentemente validando os achados relativos à sua toxicidade.

A avaliação da função renal foi realizada pela dosagem sérica de creatinina e uréia. Na comparação das diferentes doses de tacrolimus, houve aumento significativo da creatinina no grupo TAC10, sendo compatível com a toxicidade da droga em dose mais elevada. Os valores de creatinina encontrados, no entanto, estão dentro dos parâmetros de normalidade entre 0,3 e 0,6 mg/dl considerados por outros pesquisadores e biotérios (DINIZ *et al.*, 2006; DANTAS *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2010).

Pode-se observar que houve aumento progressivo dos níveis de uréia, sendo que para os animais que sofreram apenas isquemia renal (grupo *SHAM*) a uréia sérica foi maior que o controle, e a partir da introdução da droga acentuou-se a elevação, passando já para níveis anormalmente altos nos grupos TAC0.1 e TAC1, e ainda maiores no grupo TAC10. Castello Branco *et al.* (2011) e Spinelli *et al.* (2012) avaliando parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos normais, consideram valores de uréia normais entre 40 e 60 mg/dl, confirmando que no presente estudo houve alteração da função renal após introdução do tacrolimus, e piora progressiva com dose elevada da droga.

Quando comparadas as diferentes drogas, os animais submetidos à tratamento com micofenolato nas diferentes combinações apresentaram níveis mais elevados e limítrofes na dosagem de creatinina sérica. Os valores de uréia, também foram mais elevados tanto para TAC1, quanto para os grupos MMF, MMF/TAC1 e MMF/TAC0.5 quando comparados ao grupo *SHAM*. O achado demonstra que a utilização de tacrolimus em associação com MMF e em dose mais elevada proporciona piora da função renal.

Klawitter *et al.* (2014) e Piao *et al.* (2014) conduziram estudos com utilização de drogas imunossupressoras (tacrolimus, everolimus, micofenolato mofetil) isoladas e em associações, e em diferentes doses, com objetivo de avaliar as interações e a toxicidade renal. Ambos concluíram que a combinação de drogas e o aumento das doses, em especial para doses acima do terapêutico, há piora na função renal. Assim, o presente estudo está em concordância com os achados destes autores.

A morfometria renal aferida revelou que houve hipertrofia compensatória em todos os grupos com exceção de TAC10, quando comparados ao grupo CONTROLE, o qual permaneceu com os dois rins nativos. O volume renal apresentou ganho de 35% a 55% nos grupos *SHAM*, TAC0.1, TAC1, MMF, MMF/TAC1 e MMF/TAC0.5. Apenas TAC10 teve variação positiva em média de 13%

no volume renal. Com relação ao peso do órgão, da mesma forma apenas o grupo TAC 10 teve redução de 5%. Os demais grupos tiveram variação positiva na massa do órgão entre 20% e 30%.

Santos *et al.* (2006) estudou os resultados funcionais e morfológicos em rins de rato submetidos à redução de massa renal global, encontrando aumento de aproximadamente 90% de volume do rim remanescente após 8 semanas da nefrectomia contralateral. Seyer-Hansen, Gundersen e Osterby (1985) estudaram hipertrofia renal compensatória e encontraram ganho ponderal do órgão de 31% e 44% após quatro e 24 dias da nefrectomia, respectivamente. Neste mesmo estudo, houve aumento progressivo do volume glomerular (17% e 24%) e também do diâmetro, inicialmente, e comprimento, mais tardiamente, dos túbulos renais, sugerindo um aumento contínuo e progressivo das estruturas renais durante a hipertrofia compensatória. Pfaller *et al.* (1998) demonstrou achados semelhantes, confirmando alterações progressivas nas estruturas e regiões do rim após 10 e 21 dias da nefrectomia contralateral.

Lopes *et al.* (2004) avaliou ratos diabéticos e hiperglicêmicos submetidos à nefrectomia unilateral, e demonstrou que houve maior aumento tanto do peso dos animais quanto da massa renal nos animais hiperglicêmicos, confirmando que a hiperglicemia tem efeito estimulante isolado para a hipertrofia renal compensatória. Por outro lado, Mulrone *et al.* (1999) e Azurmendi *et al.* (2013) encontraram redução na hipertrofia vicariante do peso renal em ambiente de hipogonadismo quando compararam ratos hipogonádicos e normogonádicos submetidos à nefrectomia unilateral.

Assim, o presente estudo demonstrou que a hipertrofia renal compensatória não foi afetada pelo uso das medicações imunossupressoras no curto prazo, exceto no caso de doses elevadas do tacrolimus, o que demonstra um efeito nefrotóxico direto nesta situação. Tais achados são comparáveis aos encontrados pelos autores citados.

Com a análise glomerular por estereologia pode-se observar que não houve achado de esclerose glomerular ou fibrose/esclerose da cápsula de Bowman, os quais representam alterações clássicas de toxicidade renal crônica relacionada aos CNI (NAESENS; KUYPERS; SARWAL, 2009). Em estudo desta mesma linha experimental, Dias (2014) apresentou achados de histologia relacionados a nefrotoxicidade aguda e crônica com uso de tacrolimus, micofenolato e associações

de doses e drogas, concluindo que há aumento na vacuolização citoplasmática apenas após administração de doses elevadas do tacrolimus e que sugere efeito protetor do uso de micofenolato associado a dose baixa de tacrolimus. Tais dados dizem respeito à toxicidade aguda, em conformidade com o de outros autores (NAESENS; KUYPERS; SARWAL, 2009). Além disso, o autor ressalta que não houve diferença nos parâmetros histológicos relativos à toxicidade crônica devido ao tempo de exposição às drogas de 2 semanas. Lloberas *et al.* (2008) estudou exposição de ratos à tacrolimus, ciclosporina, sirolimus e associações das drogas, concluindo que tacrolimus em associação com sirolimus induz alterações celulares renais de toxicidade crônica somente após 30 dias de exposição, sendo estas mais discretas quando comparadas ao uso de ciclosporina (droga com maior perfil de toxicidade renal).

A aferição de densidade de volume glomerular e densidade numérica glomerular encontradas foi semelhante entre os grupos de avaliação da dose-resposta, e o cálculo de volume glomerular médio demonstrou que houve diferença entre os grupos *SHAM* frente a CONTROLE, TAC0.1 e TAC1. Tal achado, em conjunto com o fato de ter havido maior hipertrofia renal compensatória no grupo *SHAM*, sugere que a utilização de tacrolimus, mesmo em dose baixa, afeta a hipertrofia glomerular após a nefrectomia contralateral. Da mesma forma, quando comparados os grupos de associação de drogas, houve diferença estatística na densidade de volume glomerular entre CONTROLE e MMF/TAC0.5, e não houve diferença entre os grupos quando comparada a densidade numérica glomerular. Já o volume médio glomerular calculado mostrou ter havido maior hipertrofia compensatória nos grupos *SHAM* e MMF, sugerindo além de um efeito deletério do tacrolimus, possível efeito protetor do micofenolato mofetil quanto ao aumento de volume dos glomérulos na hipertrofia renal compensatória, uma vez que os animais do grupo MMF apresentaram o maior volume renal.

Shihab *et al.* (2003) avaliou efeito do micofenolato em nefrotoxicidade induzida por ciclosporina e concluiu que a droga melhora significativamente a arteriopatía aferente (uma característica de toxicidade aguda aos CNIs). Nesta mesma linha, Yang *et al.* (2002) confirmou melhora dos padrões histológicos de nefrotoxicidade após retirada de ciclosporina e introdução de micofenolato. Além disso, Fujihara *et al.* (1998) já mostrou em experimento de ablação renal que o

micofenolato não afeta a hipertrofia glomerular, porém diminui a esclerose glomerular e o infiltrado intersticial, ambos relacionados com nefrotoxicidade.

Por outro lado, Qi *et al.* (2011) estudando ratos com diabetes induzido, encontrou que o tacrolimus atua de forma a diminuir o aumento de volume glomerular que ocorre no diabetes.

Assim, apesar de os dados encontrados neste estudo não terem demonstrado claramente grande diferença entre os grupos, eles vão de encontro aos achados da literatura. Outro ponto de discussão é que talvez a estereologia ou mesmo a avaliação histomorfológica pura não sejam suficientes para avaliar com precisão as alterações relacionadas com nefrotoxicidade em modelo de exposição subaguda às drogas, como neste experimento. Neste ponto, Kidokoro *et al.* (2012) avaliando efeito nefrotóxico do tacrolimus em ratos, após 8 semanas não demonstrou alterações histológicas glomerulares ou tubulares significativas apesar de ter encontrado outros biomarcadores de injúria glomerular. E recentemente Shea, Stewart e Rouse (2013) conduziram estudo comparativo de histologia, análise de imagem digital e estereologia para detecção precoce de injúria renal induzida por cisplatina, encontrando que a estereologia possui menor sensibilidade que os outros métodos para detecção de lesões precoces relacionadas ao uso da cisplatina. Desta forma, as alterações aqui demonstradas poderiam se acentuar caso houvesse maior tempo de exposição às drogas, de forma a aumentar a sensibilidade do método utilizado.

Finalmente, foram realizadas análises bioquímicas objetivando detectar correlação entre estresse oxidativo e uso dos imunossupressores, associado à isquemia/reperfusão renal. Kedzierska *et al.* (2011) realizou experimento com ratos Wistar sob múltiplos regimes de imunossupressão por período de 6 meses e concluiu que todas as drogas utilizadas induzem a dano tubular renal e aumento dos marcadores de estresse oxidativo. Perrea *et al.* (2006) conduziu pesquisa com associação de imunossupressores e dosagem de produtos da peroxidação lipídica, demonstrando que tacrolimus está associado com melhor perfil de metabolismo dos radicais livres quando comparado à ciclosporina. Saad, Arafah e Najjar (2007) demonstraram que o micofenolato aumenta níveis de glutatona reduzida e diminui produtos da lipoperoxidação em modelo de nefrotoxicidade induzida por cisplatina.

Assim, foram dosadas a concentração de tióis não-proteicos, cujo principal representante intracelular é a Glutatona reduzida (GSH), a qual apresenta papel

central na detoxificação celular frente a drogas indutoras de radicais livres de oxigênio; a concentração de hidroperóxidos, cuja dosagem está relacionada à oxidação de lipídios, em especial das membranas celulares, e que é um dos marcadores mais sensíveis de lesão celular induzida pelo estresse oxidativo; e a concentração de carbonilas proteicas, que reflete o dano oxidativo irreversível na estrutura das proteínas intracelulares, ocasionando perda parcial ou total de sua função biológica e levando ao aumento da degradação destas proteínas modificadas.

Os resultados encontrados mostram que houve um aumento progressivo na concentração de GSH quando do aumento da dose de tacrolimus, na curva dose-resposta, sendo, no entanto, encontrada diferença estatística apenas na comparação das doses de 10 mg/kg/dia com 0,1 mg/kg/dia. Tal fato deve ter ocorrido em virtude do tempo de exposição à droga não ter sido suficientemente longo. Edkins, Rybak e Hoffman (1992) já demonstraram aumento de até 2 vezes na concentração de GSH do rim de ratos após 7 dias de administração de tacrolimus a 2,5 mg/kg/dia. Por outro lado, Tada *et al.* (2002) demonstrou aumento de GSH em 28 dias de tratamento com tacrolimus a 5 mg/kg/dia em ratos nefrectomizados.

Quando comparados os grupos de associação de drogas, houve aumento significativo nos níveis de GSH do grupo MMF. Sarangi *et al.* (2010) relata aumento da GSH em ratos tratados com micofenolato após intoxicação por mercúrio, sugerindo que tal aumento é fator protetor para a célula. Da mesma forma, Saad, Arafah e Najjar (2007) apontam que aumento do GSH é um dos mecanismos celulares para combater o estresse oxidativo a nível celular.

A concentração de hidroperóxidos e a de carbonilas proteicas não mostrou diferença estatística na comparação dos grupos de dose-resposta ao tacrolimus, inferindo que não houve lipoperoxidação e nem carbonilação proteica significativas nestes grupos. Com relação à comparação de associação de drogas, no entanto, pode-se observar que os grupos MMF e MMF/TAC0.5 mostraram significativa redução na concentração de hidroperóxidos quando comparados aos demais, inferindo assim uma menor lipoperoxidação. De maneira similar, a concentração de carbonilas proteicas foi estatisticamente menor no grupo MMF, e também houve diferença entre os grupos TAC1 e MMF/TAC1, sugerindo menor dano oxidativo às proteínas no grupo de micofenolato puro e efeito sinérgico de tacrolimus e

micofenolato aumentando a carbonilação de proteínas, se comparadas as drogas isoladamente.

Estudos recentes confirmam papel central do estresse oxidativo na nefrotoxicidade pelo uso de imunossupressores. Kidokoro *et al.* (2012) utilizou tacrolimus por 8 semanas em ratos e concluiu que há injúria glomerular causada por estresse oxidativo mediada pela ativação de NAD(P)H oxidase. Piao *et al.* (2014) administrou tacrolimus e everolimus em diferentes doses e associação por 4 semanas, concluindo que há dano renal pelo aumento do estresse oxidativo tecidual e que a interação das drogas tem efeito tóxico sinérgico. E, por fim, Klawitter *et al.* (2014) realizou experimento em ratos Wistar empregando tacrolimus e diferentes doses e em associação com micofenolato, por 4 semanas, avaliando ao final a resposta tecidual e metabólica, concluiu que o micofenolato em associação com tacrolimus produz efeito sinérgico negativo induzindo estresse oxidativo e injúria tubular renal.

Desta forma, os achados do presente estudo demonstram que houve reação celular no sentido de proteção contra dano oxidativo através do aumento de GSH quando utilizada dose tóxica de tacrolimus, e que o micofenolato parece exercer fator protetor pelo aumento do GSH e também pelas menores lipoperoxidação e carbonilação de proteínas. Quando comparados estes resultados com a literatura, existe alguma divergência, em especial pelo fato de que não se confirmou o efeito sinérgico negativo na associação das drogas e mesmo que a administração das drogas alterou pouco, e não significativamente, os biomarcadores de estresse oxidativo. Um fato relevante a ser considerado é que o tempo de exposição foi menor e pode ter contribuído significativamente para que as alterações não apresentassem diferença mais marcante.

## 5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de imunossupressores e sua toxicidade relativa tem sido alvo de estudo para melhorar a sobrevida dos órgãos transplantados e reduzir os efeitos deletérios causados pela droga, tanto no órgão quanto no hospedeiro.

Há indícios relevantes de que um dos mecanismos de toxicidade renal pelos imunossupressores esteja relacionado com a geração de EROs e pelo dano celular direto e indireto causado por estes metabólitos.

Desta forma, o presente estudo vem contribuir para a elucidação desta relação, e reforça que no curto prazo, a toxicidade subaguda relacionada com as drogas tacrolimus e micofenolato mofetil não produz danos celulares significativos ao rim, em especial aos glomérulos, e não induz dano oxidativo às principais estruturas macromoleculares das células renais (lipídios e proteínas).

Neste sentido, sugere-se que novos estudos nesta linha podem contribuir para elucidar os efeitos nefrotóxicos dos imunossupressores.

## 6 CONCLUSÕES

Este estudo permite concluir que:

a) A avaliação da função renal pela dosagem de creatinina e uréia mostrou que há nefrotoxicidade relacionada com uso de tacrolimus, principalmente em doses elevadas, e este efeito resultou em maiores alterações nos níveis de uréia e menores na creatinina; da mesma forma, há alteração da função renal com o uso de micofenolato mofetil, e há piora da função renal na associação das drogas;

b) O tacrolimus em dose elevada inibe a hipertrofia renal compensatória; e não há alteração histológica glomerular neste período de tempo de exposição às drogas; A estereologia glomerular demonstrou haver inibição na hipertrofia glomerular compensatória frente às drogas, quando avaliado o volume médio glomerular;

c) As drogas induziram reação celular de proteção frente ao estresse oxidativo através do aumento de tióis não-proteicos (GSH), não sendo detectada alteração de peroxidação de lipídios nem carbonilação de proteínas significativas com uso de tacrolimus mesmo em doses elevadas; sugere também fator protetor do micofenolato mofetil na lipoperoxidação e na carbonilação de proteínas.

## REFERÊNCIAS

- ABBUD FILHO, M.; RAMALHO, H. J.. Revisão / atualização em transplante renal. Novos agentes imunossupressores. **J. Brás. Nefrol.**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 215-223, 1997.
- ABTO – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS. **Registro Brasileiro de Transplantes 2014**. Disponível em: <<http://www.abto.org.br/abtov03/default.aspx?mn=476&c=0&s=157&pop=true>>. Acesso em: 15/08/2014.
- AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.. Effects of chronic high fat diets on renal function and cortical structure in rats. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 55, n. 2, p. 187-195, 2003.
- ARIMA, H. *et al.* Comparative studies of the enhancing effects of cyclodextrins on the solubility and oral bioavailability of tacrolimus in rats. **J. Pharm. Sci.**, v. 90, n. 6, p. 690-701, 2001.
- ASTELLAS PHARMA US INC: Prograf Package Insert. Deerfield, IL, **Astellas Pharma US Inc**, 2005.
- AZURMENDI, P. J. *et al.* Sexual hormones modulate compensatory renal growth and function. **Medicina (B Aires)**, v. 73, n. 6, p. 513-9, 2013.
- BARBER, A. A.; BERNHEIM, F. Lipid peroxidation: its measurement, occurrence, and significance in animal tissues. **Adv. Gerontol. Res.**, v. 2, p. 355-403, 1967.
- BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr., Campinas**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAUN, F. *et al.* Increased mycophenolic acid exposure in stable kidney transplant recipients on tacrolimus as compared with those on sirolimus: implications for pharmacokinetics. **Clin Pharmacol Ther.**, v. 86, n. 4, p. 411-5, 2009.
- BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E. **Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics**. Elsevier Health Sciences, 2012.
- CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. **Guide to the care and use of experimental animals**. 1993. Disponível em: <[http://www.ccac.ca/en\\_/standards/guidelines](http://www.ccac.ca/en_/standards/guidelines)>. Acesso em: 20/07/2014.
- CASOTTI, G. Effects of season on kidney morphology in house sparrows. **J. Exp. Biol.**, v. 204, n. 6, p. 1201-1206, 2001.

CASTELLO BRANCO, A. C. S. *et al.* Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. **Rev. Bras. Cienc. Saúde**, Salvador, v. 15, n. 2, p. 209-214, 2011.

CATTA-PRETA, M. *et al.* Adult cardiorenal benefits from postnatal fish oil supplement in rat offspring of low-protein pregnancies. **Life Sci.**, v. 80, n. 3, p. 219-229, 2006.

CHANCE, B; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.**, v. 59, n. 3, p. 527-605, 1979.

CIBULSKYTE, D. *et al.* Renal effects of long-term ciclosporin A treatment in a large animal model. **Nephron. Exp. Nephrol.**, v. 105, n. 4, p. e91-e97, 2007.

CONNOR, S. C. *et al.* Effects of feeding and body weight loss on the 1H-NMR-based urine metabolic profiles of male Wistar Han rats: implications for biomarker discovery. **Biomarkers**, v. 9, n. 2, p. 156-179, 2004.

CURI, R. *et al.* Reversibility of metabolic changes induced by feeding schedule in rats. **Physiology & behavior**, v. 45, n. 2, p. 249-254, 1989.

DALLE-DONNE, I. *et al.* Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **J. Cel. Mol. Med.**, v. 10, n. 2, p. 389-406, 2006.

DANTAS, J. A. *et al.* Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Sci. Health Sci**, v. 28, n. 2, 2006.

DIAS, P. H. G. F. **Efeito da imunossupressão com tacrolimus e micofenolato mofetil na histologia e na função renal de ratos com rim único submetidos à isquemia e reperfusão.** Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

DICKINSON, H. *et al.* Maternal dexamethasone treatment at midgestation reduces nephron number and alters renal gene expression in the fetal spiny mouse. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 292, n. 1, p. R453-461, 2007.

DINIZ, M. F. F. M. *et al.* Padronização do parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos Swiss e ratos Wistar. **Rev. Bras. Cienc. Saúde**, Salvador, v. 10, n. 2, p. 171-176, 2006.

DRAGAN, Y. P. *et al.* Comparison of the effects of tamoxifen and toremifene on liver and kidney tumor promotion in female rats. **Carcinogenesis**, v. 16, n. 11, p. 2733-2741, 1995.

EAU – EUROPEAN ASSOCIATION OF UROLOGY. **Guidelines on Renal Transplantation.** Disponível em: <[http://www.uroweb.org/guidelines/online-guidelines/?no\\_cache=1](http://www.uroweb.org/guidelines/online-guidelines/?no_cache=1)>. Acessado em: 18/07/2014.

EDKINS, R. D.; RYBAK, L. P.; HOFFMAN, D. W. Comparison of cyclosporine and FK506 effects on glutathione levels in rat cochlea, brain, liver and kidney. **Biochem Pharmacol.**, v. 43, n. 4, p. 911-3, 1992.

EKBERG, H. *et al.* Relationship of tacrolimus exposure and mycophenolate mofetil dose with renal function after renal transplantation. **Transplantation.**, New York, v.92, n. 1, p. 82-7, 2011.

FINKEL, T. Oxygen radicals and signaling. **Current Opinion in Cell Biology**, n. 10, p. 248-253, 1998.

FRIMAT, L. *et al.* Impact of cyclosporine reduction with MMF: a randomized trial in chronic allograft dysfunction. The 'reference' study. **Am. J. Transplant.**, Hoboken, v. 6, n. 11, p. 2725-34, 2006.

FUJIHARA, C. K. *et al.* Mycophenolate mofetil attenuates renal injury in the rat remnant kidney. **Kidney Int.**, St. Louis, v. 54, n. 5, p. 1510-9, 1998.

HALLORAN, P. F. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 351, n. 26, p. 2715-2729, 2004.

HERRERO, I. *et al.*, Prevention of cold ischaemia-reperfusion injury by an endothelin receptor antagonist in experimental renal transplantation. **Nephrol Dial Transplant.**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 872-80, 1999.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FATIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quím. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

INTERNATIONAL STEREOLOGY SOCIETY. Disponível em: <<http://www.stereology.org>>. Acesso em: 18/06/2014.

IWASAKI, K. Metabolism of tacrolimus (FK506) and recent topics in clinical pharmacokinetics. **Drug Metab Pharmacokinet.**, v. 22, n. 5, p. 328-35, 2007.

JABLONSKI, P. *et al.* An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia. **Transplantation.**, New York, v. 35, n. 3, p. 198-204, 1983.

JAIN, S.; BICKNELL, G. R.; NICHOLSON, M. L. Tacrolimus has less fibrogenic potential than cyclosporin A in a model of renal ischaemia-reperfusion injury. **Br. J. Surg.**, v. 87, n. 11, p. 1563-1568, 2000.

JIANG, Z-Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202, p. 384-389, 1992.

JIANG, Z-Y.; WOOLLARD, A. C. S.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxides measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v. 26, p. 853-856, 1991.

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

KALLURI, H. V.; HARDINGER, K. L. Current state of renal transplant immunosuppression: Present and future. **World J Transplant.**, v. 2, n. 4, p. 51-68, 2012

KEDZIERSKA, K. *et al.* Oxidative stress indices in rats under immunosuppression. **Transplant Proc.**, Houston, v. 43, n. 10, p. 3939-45, 2011.

KIDOKORO, K. *et al.* Tacrolimus induces glomerular injury via endothelial dysfunction caused by reactive oxygen species and inflammatory change. **Kidney Blood Press. Res.**, v. 35, n. 6, p. 549-557, 2012.

KILINC, S. *et al.* The effects of preoperative immunosuppressive therapy on ischemia and reperfusion (I/R) injury in healthy rats. **Int Urol Nephrol.**, n. 46, p. 389–393, 2014

KLAWITTER, J. *et al.* Mycophenolate Mofetil Enhances the Negative Effects of Sirolimus and Tacrolimus on Rat Kidney Cell Metabolism. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e86202, 2014.

LEVINE, R.L. *et al.* Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.**, v. 233, p. 346–357, 1994.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LLOBERAS, N. *et al.* Different renal toxicity profiles in the association of cyclosporine and tacrolimus with sirolimus in rats. **Nephrol Dial Transplant.**, Oxford, n. 23, p. 3111–19, 2008

LOPES, G. S. *et al.* Effect of unilateral nephrectomy on renal function of diabetic rats. **Histol Histopathol.**, v. 19, n. 4, p. 1085-8, 2004.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.. Fisiologia e fisiopatologia: estereologia do rim: determinação do Vv, Nv e volume médio do glomérulo. **J. Bras. Nefrol**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 103-109, 2000.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **An. Acad. Bras. Cienc.**, Rio de Janeiro, v. 75, n. 4, p. 469-486, 2003.

MEDEIROS, F. J.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Renal cortex remodeling in streptozotocin-induced diabetic spontaneously hypertensive rats treated with olive oil, palm oil and fish oil from Menhaden. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 75, n. 6, p. 357-365, 2006.

MULRONEY, S. E. *et al.* Gender differences in renal growth and function after uninephrectomy in adult rats. **Kidney Int.**, St. Louis, v. 56, n. 3, p. 944-53, 1999.

NAESENS, m.; KUYPERS, D. R. J.; SARWAL, M. Calcineurin Inhibitor Nephrotoxicity. **Clin J Am Soc Nephrol.**, n. 4, p. 481–508, 2009

NANIDIS, T. G. *et al.* Laparoscopic versus open live donor nephrectomy in renal transplantation: a meta-analysis. **Ann Surg.**, v. 247, n. 1, p. 58-70, 2008.

NÁPRSTKOVÁ, I. *et al.* Quantitative analysis of embryonic kidney impairment by confocal microscopy and stereology: effect of 1, 2-dibromoethane in the chick mesonephros. **Br. Poult. Sci.**, v. 46, n. 6, p. 661-667, 2005.

NEVES, S. M. P. *et al.* Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. São Paulo, 2013.

NINOVA, D. *Et al.* Acute nephrotoxicity of tacrolimus and sirolimus in renal isografts: differential intragraft expression of transforming growth factor-beta1 and alpha-smooth muscle actin. **Transplantation.**, New York, v. 15, n. 78, p. 338-44, 2004.

NYENGAARD, J. R. Stereologic methods and their application in kidney research. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 10, n. 5, p. 1100-1123, 1999.

OECD 407. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.** Organization for Economic, 2008. Disponível em: <[http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects\\_20745788](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788)>. Acesso em 15/07/2014.

OECD 425. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.** Organization for Economic, 2006. Disponível em: <[http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects\\_20745788](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788)>. Acesso em 15/07/2014.

OKABE, H. *et al.* Evaluation of increased bioavailability of tacrolimus in rats with experimental renal dysfunction. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 54, n. 1, p. 65-70, 2002.

PASCUAL, M. *et al.* Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 346, n. 8, p. 580-590, 2002.

PIAO, S. G. *et al.* Combined Treatment of Tacrolimus and Everolimus Increases Oxidative Stress by Pharmacological Interactions. **Transplantation**, New York, v. 15, n. 98, p. 22-8, 2014.

PERREA, D. N. *et al.* Correlation between oxidative stress and immunosuppressive therapy in renal transplant recipients with an uneventful postoperative course and stable renal function. **Int Urol Nephrol.**, v. 38, n. 2, p. 343-8, 2006.

PFALLER, W. *et al.* Quantitative morphology of renal cortical structures during compensatory hypertrophy. **Exp Nephrol.**, v. 6, n. 4, p. 308-19, 1998.

QI, X. M. *et al.* FK506 ameliorates renal injury in early experimental diabetic rats induced by streptozotocin. **Int Immunopharmacol.**, v. 11, n. 10, p. 1613-9, 2011.

RAJNOCH, J. *et al.* Regulators of angiogenesis in renal ischemia/reperfusion injury in normotensive and hypertensive rats: effect of tacrolimus. **Transplant Proc.**, v. 37, n. 1, p. 352-4, 2005.

RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cell Signal.**, v. 24, n. 5, p. 981-90, 2012.

REGAZZI, M. B.; ALESSIANI, M.; RINALDI, M. New strategies in immunosuppression. **Transplant Proc.**, Houston, v. 37, n. 6, p. 2675-8, 2005.

SAAD, S. Y.; ARAFAH, M. M.; NAJJAR, T. A. Effects of mycophenolate mofetil on cisplatin-induced renal dysfunction in rats. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 59, n. 4, p. 455-60, 2007.

SAMPAIO, K. M. O. R.; ARAÚJO, R. B. Ultrasonographic measurement of linear characteristics and renal volumetry in dogs. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, São Paulo, v. 54, n. 3, p. 248-254, 2002.

SANTOS, L. S. *et al.* Surgical reduction of the renal mass in rats: morphologic and functional analysis on the remnant kidney. **Acta Cir Bras.**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 252-7, 2006.

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

SARANGI, S. C. *et al.* Protective effect of mycophenolate mofetil on mercuric chloride-induced nephrotoxicity in rats. **Methods Find Exp Clin Pharmacol.**, v. 32, n. 4, p. 219-25, 2010.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SEYER-HANSEN, K.; GUNDERSEN, H. J.; OSTERBY, R. Stereology of the rat kidney during compensatory renal hypertrophy. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand A.**, v. 93, n. 1, p. 9-12, 1985.

SHEA, K.; STEWART, S.; ROUSE, R. Assessment Standards: Comparing Histopathology, Digital Image Analysis, and Stereology for Early Detection of Experimental Cisplatin-induced Kidney Injury in Rats. **Toxicol Pathol.**, 2013 Nov 6.

SHIHAB, F. S. *et al.* Mycophenolate mofetil ameliorates arteriopathy and decreases transforming growth factor-beta1 in chronic cyclosporine nephrotoxicity. **Am J Transplant.**, v. 3, n. 12, p. 1550-9, 2003.

SCHUMER, M. *et al.* Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. **Am. J Pathol.**, Philadelphia, v. 140, n. 4, p. 831, 1992.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **Am. J. Med.**, Tucson, v. 91, n. 3, p. S31-S38, 1991.

SIMON, N. *et al.* Tacrolimus and sirolimus decrease oxidative phosphorylation of isolated rat kidney mitochondria. **Br J Pharmacol.**, Hoboken, v. 138, n. 2, p. 369-76, 2003.

SPINELLI, M. O. *et al.* Perfil bioquímico dos animais de laboratório do biotério da Faculdade de Medicina da USP. **RESBCAL**, São Paulo, v. 1, n. 1, 2012.

SRINIVAS, T. R.; MEIER-KRIESCHE, H. U. Minimizing immunosuppression, an alternative approach to reducing side effects: objectives and interim result. **Clin J Am Soc Nephrol.**, Washington, n. 3, Suppl 2, p. S101-16, 2008.

SRINIVAS, T. R.; KAPLAN, B.; MEIER-KRIESCHE, H. U. Mycophenolate mofetil in solid-organ transplantation. **Expert Opin Pharmacother.**, Gubelstrasse, v. 4, n. 12, p. 2325-45, 2003.

STERIO, D. C. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. **J. Microsc.**, Hoboken, v. 134, n. 2, p. 127-136, 1984.

SUTHANTHIRAN, M.; STROM, T. B. Renal transplantation. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 331, n. 6, p. 365-376, 1994.

TADA, H. *et al.* Effects of thymic hormone on reactive oxygen species-scavengers and renal function in tacrolimus-induced nephrotoxicity. **Life Sci.**, v. 70, n. 10, p. 1213-23, 2002.

THOMPSON, R. H. *et al.* Comparison of warm ischemia versus no ischemia during partial nephrectomy on a solitary kidney. **Eur Urol.**, Sheffield, v. 58, n. 3, p. 331-6, 2010.

TOMANARI, G. Y.; PINE, A. S.; SILVA, M. T. A. Ratos wistar sob regimes rotineiros de restrição hídrica e alimentar. **Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 57-71, 2003.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a "era do teste dl50 ". **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiania, v. 3, n. 2, 2007.

VAN GELDER, T. *et al.* Comparison of the effects of tacrolimus and cyclosporine on the pharmacokinetics of mycophenolic acid. **Ther. Drug Monit.**, Philadelphia, v. 23, n. 2, p. 119-128, 2001.

VENKATARAMANAN, R. *et al.* Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. **Clin. Pharmacokinet.**, Berlin, v. 29, n. 6, p. 404-430, 1995.

WARNER, H. R. Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. **Free Radic. Biol. Med.**, Amsterdam, v. 17, n. 3, p. 249-258, 1994.

WEIBEL, E. R.; KISTLER, G. S.; SCHERLE, W. F. Practical stereological methods for morphometric cytology. **J Cell Biol.**, New York, n. 30, p. 23-38, 1966.

WEIGHT, S. C.; BELL, P. R.; NICHOLSON, M. L. Renal ischaemia-reperfusion injury. **Br J Surg.**, Hoboken, v. 83, n. 2, p. 162-70, 1996.

WINTOUR, E. M. *et al.* Reduced nephron number in adult sheep, hypertensive as a result of prenatal glucocorticoid treatment. **J. Physiol.**, Hoboken, v. 549, n. 3, p. 929-935, 2003.

YANG, C. W. *et al.* Cyclosporine withdrawal and mycophenolate mofetil treatment effects on the progression of chronic cyclosporine nephrotoxicity. **Kidney Int.**, St. Louis, v. 62, n. 1, p. 20-30, 2002.

ZEIER, M. *et al.* Effects of testosterone on glomerular growth after uninephrectomy. **Nephrol. Dial. Transplant.**, Oxford, v. 13, n. 9, p. 2234-2240, 1998.

ZHOU, X. *et al.* Hydrogen peroxide mediates FK506-induced cytotoxicity in renal cells. **Kidney Int.**, St. Louis, v. 65, n. 1, p. 139-47, 2004.

## DOCUMENTOS CONSULTADOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Teses, dissertações, monografias e outros trabalhos acadêmicos**. 2. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007. (Normas para apresentação de documentos científicos, 2).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Citações e notas de rodapé**. 2. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007. (Normas para apresentação de documentos científicos, 3).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Referências**. 2. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007. (Normas para apresentação de documentos científicos, 4).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Redação e editoração**. 2. ed. Curitiba: Editora UFPR, 2007. (Normas para apresentação de documentos científicos, 9).

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: 20/08/2014.

DeCS-BVS: Descritores em Ciências da Saúde – Biblioteca Virtual em Saúde. Disponível em: <<http://decs.bvs.br/>>. Último acesso em: 20/08/2014.

Dicionário Priberam da Língua Portuguesa. Disponível em <<http://www.priberam.pt/DLPO/>>. Último acesso em: 20/08/2014.

## ANEXOS

## ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS/UFPR.



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

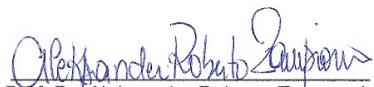
**APROVADO:** 10/07/2009 – R.O. 06/2009

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

**TÍTULO:** Estudo experimental da cicatrização vesical em ratos submetidos a 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

## ANEXO 2 – DADOS DAS DOSAGENS BIOQUÍMICAS

GRUPO	ANIMAL	TACROLIMUS (ng/ml)	ALBUMINA (g/dl)	CREATININA (mg/dl)	UREIA (mg/dl)
TAC0.1	1	0,2	2,5	0,4	83
	2	0,5	3,2	0,3	75
	3		2,4	0,3	60
	4	0,3	2,7	0,3	68
	5	0,2	2,6	0,4	68
	6	0,01	2,8	0,3	62
	7	0,2	2,6	0,3	68
	8	0,5	2,6	0,4	74
	9	0,2	2,7	0,3	75
	10	0,6	2,6	0,4	77
TAC1	1	0,5	2,8	0,4	75
	2	0,9	2,9	0,4	80
	3	0,3	2,8	0,3	70
	4	0,5	2,6	0,4	75
	5	0,3	2,6	0,4	60
	6	0,6	3,1	0,4	74
	7	0,2	2,9	0,4	71
	8	0,8	2,7	0,4	77
	9	0,3	3,3	0,3	79
	10	0,5	3,3	0,3	65
TAC10	1	2,8	2,5	0,5	86
	2	3,7	2,9	0,5	113
	3	2,4	3	0,5	89
	4	1,2	2,4	2,3	704
	5	1,6	2,7	0,4	83
	6	2,1	2,3	0,5	95
	7	1,8	2,7	0,6	87
	8	1,9	2,7	0,5	108
	9	2,5	2,7	0,5	96
MMF	1		2,9	0,56	55
	2		2,5	0,64	45
	3		2,5	0,6	55
	4		2,6	0,63	56
	5		2,8	0,61	53
	6		2,6	0,74	68
	7		2,6	0,5	67
	8		3,1	0,4	65
	9		2,9	0,4	56
	10		2,9	0,4	61

continua

## conclusão

MMF/TAC1	1	0,6	2,3	0,7	63
	2	0,2	3	0,71	75
	3	0,1	2,8	0,66	56
	4	0,2	2,8	0,66	64
	5	0,6	2,4	0,73	74
	6	0,2	2,8	0,7	70
	7	0,4	2,4	0,56	62
	8	0,5	2,6	0,4	70
	9	0,5	2,9	0,4	63
	10	0,6	2,8	0,4	69
	11	0,3	2,9	0,4	67
MMF/TAC0.5	1	0,2	2,8	0,7	54
	2	0,2	2,9	0,67	78
	3	0,1	3,1	0,7	66
	4	0,4	2,4	0,6	50
	5	0,1	3	0,57	51
	6	0,2	2,7	0,66	58
	7	0,5	2,9	0,72	59
	8	0,1	2,9	0,4	69
	9	0,4	2,9	0,4	69
	10	0,2	2,9	0,4	61
SHAM	1		2,8	0,4	59
	2		2,8	0,5	55
	3		2,9	0,4	48
	4		2,9	0,4	58
	5		3	0,4	53
	6		2,9	0,4	48
	7		2,8	0,4	59
	8		3	0,4	50
CONTROLE	1		2,8	0,3	42
	2		2,8	0,3	45
	3		2,7	0,3	44
	4		3	0,3	44
	5		2,9	0,3	41
	6		2,8	0,54	48
	7		2,8	0,57	51
	8		2,6	0,67	45
	9		2,7	0,43	44
	10		2,8	0,49	45

## ANEXO 3 – DADOS DA MORFOMETRIA RENAL

GRUPO	ANIMAL	DIMENSÕES (mm)			VOLUME (cm <sup>3</sup> )	PESO (g)
		C	L	E		
TAC1	1	19,4	12,2	8	0,99026912	1,41
	2	19,2	12,2	8,1	0,992310912	1,27
	3	19,3	10,7	9,3	1,004443989	1,39
	4	20	11	10	1,1506	1,39
	5	21,2	11,8	8,5	1,11208628	1,56
	6	19,1	12	8,2	0,98294712	1,35
	7	20	13	9,1	1,237418	1,6
	8	20,2	14	9	1,3311396	1,75
	9	20,3	11,5	9,4	1,14768689	1,39
	10	20	11,4	9	1,073196	1,4
TACO.1	1	19,9	12,2	11,3	1,434805522	1,46
	2	20,9	13,2	10	1,4428524	1,69
	3	20,4	12	8,5	1,0882584	1,52
	4	20	13	9,7	1,319006	1,61
	5	21	12,1	8	1,0631544	1,78
	6	22	12,7	9,7	1,41742414	1,78
	7	19,4	12,6	8,7	1,112226444	1,41
	8	20	11,2	9,3	1,0895136	1,59
	9	20	11,35	9	1,068489	1,43
	10	18,5	11,7	9,5	1,075431825	1,32
TAC10	1	19,4	11	9	1,0044738	1,28
	2	18,3	12	7,5	0,861381	1,1
	3	23	14,2	7,6	1,29816968	1,47
	4	20,3	12,2	10,5	1,36002489	1,66
	5	18,6	10,4	8,2	0,829586784	1,16
	6	18,5	11,4	8,9	0,98167623	1,07
	7	18,7	12	9,3	1,09145916	1,12
	8	17,55	10,6	7	0,68105583	1,04
	9	17,7	11,55	6,6	0,705668733	1,02
MMF	1	20,4	12,2	9,5	1,23656028	1,56
	2	20,4	12,6	10	1,3443192	1,79
	3	20	12	10	1,2552	1,67
	4	22	12,4	10,4	1,48381376	1,8
	5	21,1	11,4	9	1,13222178	1,68
	6	19,8	12,4	9,8	1,258388208	1,68
	7	20	11,3	10	1,18198	1,23
	8	19,7	12,3	10	1,2672813	1,12
	9	20,6	11,3	10	1,2174394	1,33
	10	21,4	12,3	10,3	1,417939818	1,46

continua

## conclusão

MMF/TAC1	1	18,3	11,5	9,2	1,01260122	1,59
	2	19,2	11,2	8,3	0,933467136	1,37
	3	21	12,3	10	1,350909	1,81
	4	20	11,6	8,2	0,9949552	1,42
	5	19,8	11,3	8,4	0,982934568	1,51
	6	20,2	12,5	9,2	1,214929	1,68
	7	22	13,2	10	1,518792	1,85
	8	18,3	10,4	9,4	0,935651184	1,04
	9	22	13,5	10,5	1,6309755	1,84
	10	18,9	12,6	10,1	1,257926922	1,07
	11	20,8	11,8	10,8	1,386343296	1,44
MMF/TAC0.5	1	20	12,6	9,5	1,252062	1,6
	2	22,3	11,7	8,8	1,200812184	1,87
	3	21,7	12,4	9,7	1,365069748	1,79
	4	19,8	10,7	8,6	0,952903908	1,63
	5	19,8	12,1	9,1	1,140233094	1,62
	6	20,4	11,8	9	1,13306904	1,59
	7	20,2	11	9,3	1,08075858	1,6
	8	20,5	11,8	10,2	1,29043974	1,34
	9	20,4	11	8	0,9388896	1,46
	10	20,5	11,4	8,5	1,03891335	1,4
SHAM	1	19,7	11,1	8,5	0,972097485	1,29
	2	22	14,7	11	1,8605202	1,78
	3	20,3	11,8	10	1,2527942	1,34
	4	20	11	8,4	0,966504	1,47
	5	19	11,3	8,6	0,96567766	1,39
	6	21	11	9,3	1,1235609	1,62
	7	21,6	12,7	11,6	1,664244576	1,63
	8	19,8	11,9	9,1	1,121386266	1,58
CONTROLE	1	18,8	11,5	7,2	0,81412272	1,25
	2	16,2	10	7	0,593082	1,27
	3	18,5	11,1	7	0,75178635	1,32
	4	18	10,35	6	0,5846094	0,97
	5	17,2	12	8	0,8635776	1,3
	6	18,7	11,5	8,8	0,98974612	1,14
	7	18,3	9,7	8	0,74270184	1,08
	8	18,5	11,1	8,7	0,934363035	1,19
	9	20,5	11,6	9,1	1,13176154	1,49
	10	19,2	10,5	7,3	0,76968864	1,14

## ANEXO 4 – DADOS DA ESTEREOLOGIA

LAMINA	POI	Vv	Q	Nv	Vglom	LAMINA	POI	Vv	Q	Nv	Vglom
cr1 1	6	0,1428571	2	141,44272	0,00101	g1r1 1	7	0,166667	3	141,4427157	0,00117833
cr1 2	5	0,1190476	2		0,00084167	g1r1 2	5	0,119048	2		0,00084167
cr1 3	4	0,0952381	1		0,00067333	g1r1 3	4	0,095238	1		0,00067333
cr1 4	3	0,0714286	2		0,000505	g1r1 4	2	0,047619	2		0,00033667
cr1 5	5	0,1190476	2		0,00084167	g1r1 5	5	0,119048	1		0,00084167
cr2 1	4	0,0952381	1	157,15857	0,000606	g1r2 1	5	0,119048	1	125,7268584	0,00094688
cr2 2	6	0,1428571	3		0,000909	g1r2 2	5	0,119048	2		0,00094688
cr2 3	4	0,0952381	2		0,000606	g1r2 3	5	0,119048	1		0,00094688
cr2 4	4	0,0952381	2		0,000606	g1r2 4	4	0,095238	2		0,0007575
cr2 5	7	0,1666667	2		0,0010605	g1r2 5	5	0,119048	2		0,00094688
cr3 1	5	0,1190476	1	110,011	0,00108214	g1r3 1	4	0,095238	2	157,158573	0,000606
cr3 2	5	0,1190476	1		0,00108214	g1r3 2	6	0,142857	3		0,000909
cr3 3	5	0,1190476	2		0,00108214	g1r3 3	5	0,119048	1		0,0007575
cr3 4	5	0,1190476	1		0,00108214	g1r3 4	5	0,119048	3		0,0007575
cr3 5	5	0,1190476	2		0,00108214	g1r3 5	6	0,142857	1		0,000909
cr4 1	4	0,0952381	2	141,44272	0,00067333	g1r4 1	7	0,166667	2	141,4427157	0,00117833
cr4 2	6	0,1428571	2		0,00101	g1r4 2	6	0,142857	2		0,00101
cr4 3	6	0,1428571	3		0,00101	g1r4 3	3	0,071429	1		0,000505
cr4 4	3	0,0714286	1		0,000505	g1r4 4	7	0,166667	2		0,00117833
cr4 5	5	0,1190476	1		0,00084167	g1r4 5	3	0,071429	2		0,000505
cr5 1	2	0,047619	2	110,011	0,00043286	g1r5 1	7	0,166667	1	125,7268584	0,00132563
cr5 2	3	0,0714286	1		0,00064929	g1r5 2	3	0,071429	1		0,00056813
cr5 3	4	0,0952381	1		0,00086571	g1r5 3	4	0,095238	2		0,0007575
cr5 4	4	0,0952381	1		0,00086571	g1r5 4	6	0,142857	2		0,00113625
cr5 5	4	0,0952381	2		0,00086571	g1r5 5	4	0,095238	2		0,0007575
cr6 1	6	0,1428571	2	125,72686	0,00113625	g1r6 1	6	0,142857	2	141,4427157	0,00101
cr6 2	3	0,0714286	1		0,00056813	g1r6 2	6	0,142857	1		0,00101
cr6 3	4	0,0952381	1		0,0007575	g1r6 3	6	0,142857	2		0,00101
cr6 4	5	0,1190476	2		0,00094688	g1r6 4	4	0,095238	1		0,00067333
cr6 5	5	0,1190476	2		0,00094688	g1r6 5	7	0,166667	3		0,00117833
cr7 1	4	0,0952381	1	94,295144	0,00101	g1r7 1	6	0,142857	1	94,2951438	0,001515
cr7 2	4	0,0952381	1		0,00101	g1r7 2	5	0,119048	1		0,0012625
cr7 3	5	0,1190476	1		0,0012625	g1r7 3	6	0,142857	2		0,001515
cr7 4	6	0,1428571	2		0,001515	g1r7 4	6	0,142857	1		0,001515
cr7 5	4	0,0952381	1		0,00101	g1r7 5	4	0,095238	1		0,00101
cr8 1	5	0,1190476	1	141,44272	0,00084167	g1r8 1	4	0,095238	2	141,4427157	0,00067333
cr8 2	3	0,0714286	1		0,000505	g1r8 2	4	0,095238	2		0,00067333
cr8 3	7	0,1666667	2		0,00117833	g1r8 3	4	0,095238	1		0,00067333
cr8 4	6	0,1428571	3		0,00101	g1r8 4	6	0,142857	2		0,00101
cr8 5	5	0,1190476	2		0,00084167	g1r8 5	7	0,166667	2		0,00117833
cr9 1	4	0,0952381	1	157,15857	0,000606	g1r9 1	5	0,119048	1	110,0110011	0,00108214
cr9 2	7	0,1666667	3		0,0010605	g1r9 2	4	0,095238	1		0,00086571
cr9 3	5	0,1190476	3		0,0007575	g1r9 3	7	0,166667	3		0,001515
cr9 4	6	0,1428571	1		0,000909	g1r9 4	4	0,095238	1		0,00086571
cr9 5	4	0,0952381	2		0,000606	g1r9 5	4	0,095238	1		0,00086571
cr10 1	7	0,1666667	1	157,15857	0,0010605	g1r10 1	5	0,119048	2	141,4427157	0,00084167
cr10 2	2	0,047619	1		0,000303	g1r10 2	3	0,071429	1		0,000505
cr10 3	5	0,1190476	2		0,0007575	g1r10 3	3	0,071429	1		0,000505
cr10 4	3	0,0714286	3		0,0004545	g1r10 4	6	0,142857	3		0,00101
cr10 5	6	0,1428571	3		0,000909	g1r10 5	6	0,142857	2		0,00101

continua

## continuação

LAMIN	POI	Vv	Q	Nv	Vglom	LAMINA	POI	Vv	Q	Nv	Vglom
g2r1 1	3	0,0714286	1	125,72686	0,00056813	g3r1 1	6	0,142857	1	110,0110011	0,00129857
g2r1 2	5	0,1190476	1		0,00094688	g3r1 2	6	0,142857	1		0,00129857
g2r1 3	4	0,0952381	2		0,0007575	g3r1 3	6	0,142857	2		0,00129857
g2r1 4	6	0,1428571	2		0,00113625	g3r1 4	4	0,095238	1		0,00086571
g2r1 5	4	0,0952381	2		0,0007575	g3r1 5	6	0,142857	2		0,00129857
g2r2 1	6	0,1428571	2	157,15857	0,000909	g3r2 1	4	0,095238	2	157,158573	0,000606
g2r2 2	5	0,1190476	2		0,0007575	g3r2 2	4	0,095238	1		0,000606
g2r2 3	7	0,1666667	2		0,0010605	g3r2 3	5	0,119048	2		0,0007575
g2r2 4	5	0,1190476	2		0,0007575	g3r2 4	5	0,119048	2		0,0007575
g2r2 5	5	0,1190476	2		0,0007575	g3r2 5	6	0,142857	3		0,000909
g2r3 1	5	0,1190476	2	141,44272	0,00084167	g3r3 1	6	0,142857	1	141,4427157	0,00101
g2r3 2	5	0,1190476	1		0,00084167	g3r3 2	6	0,142857	2		0,00101
g2r3 3	5	0,1190476	1		0,00084167	g3r3 3	4	0,095238	2		0,00067333
g2r3 4	9	0,2142857	3		0,001515	g3r3 4	5	0,119048	2		0,00084167
g2r3 5	4	0,0952381	2		0,00067333	g3r3 5	5	0,119048	2		0,00084167
g2r4 1	5	0,1190476	1	110,011	0,00108214	g3r4 1	5	0,119048	1	78,5792865	0,001515
g2r4 2	5	0,1190476	2		0,00108214	g3r4 2	3	0,071429	0		0,000909
g2r4 3	3	0,0714286	1		0,00064929	g3r4 3	6	0,142857	1		0,001818
g2r4 4	6	0,1428571	1		0,00129857	g3r4 4	5	0,119048	2		0,001515
g2r4 5	5	0,1190476	2		0,00108214	g3r4 5	4	0,095238	1		0,001212
g2r5 1	6	0,1428571	2	110,011	0,00129857	g3r5 1	6	0,142857	3	157,158573	0,000909
g2r5 2	4	0,0952381	1		0,00086571	g3r5 2	5	0,119048	1		0,0007575
g2r5 3	6	0,1428571	2		0,00129857	g3r5 3	6	0,142857	2		0,000909
g2r5 4	4	0,0952381	1		0,00086571	g3r5 4	5	0,119048	2		0,0007575
g2r5 5	5	0,1190476	1		0,00108214	g3r5 5	5	0,119048	2		0,0007575
g2r6 1	4	0,0952381	1	110,011	0,00086571	g3r6 1	4	0,095238	1	157,158573	0,000606
g2r6 2	5	0,1190476	1		0,00108214	g3r6 2	7	0,166667	3		0,0010605
g2r6 3	4	0,0952381	2		0,00086571	g3r6 3	3	0,071429	1		0,0004545
g2r6 4	6	0,1428571	2		0,00129857	g3r6 4	6	0,142857	3		0,000909
g2r6 5	5	0,1190476	1		0,00108214	g3r6 5	6	0,142857	2		0,000909
g2r7 1	4	0,0952381	2	172,87443	0,00055091	g3r7 1	6	0,142857	2	125,7268584	0,00113625
g2r7 2	7	0,1666667	2		0,00096409	g3r7 2	9	0,214286	3		0,00170438
g2r7 3	5	0,1190476	2		0,00068864	g3r7 3	4	0,095238	1		0,0007575
g2r7 4	4	0,0952381	2		0,00055091	g3r7 4	7	0,166667	1		0,00132563
g2r7 5	9	0,2142857	3		0,00123955	g3r7 5	5	0,119048	1		0,00094688
g2r8 1	5	0,1190476	2	141,44272	0,00084167	g3r8 1	3	0,071429	1	110,0110011	0,00064929
g2r8 2	5	0,1190476	2		0,00084167	g3r8 2	5	0,119048	1		0,00108214
g2r8 3	7	0,1666667	3		0,00117833	g3r8 3	3	0,071429	2		0,00064929
g2r8 4	4	0,0952381	1		0,00067333	g3r8 4	5	0,119048	1		0,00108214
g2r8 5	3	0,0714286	1		0,000505	g3r8 5	8	0,190476	2		0,00173143
g2r9 1	6	0,1428571	2	125,72686	0,00113625	g3r9 1	6	0,142857	2	110,0110011	0,00129857
g2r9 2	5	0,1190476	2		0,00094688	g3r9 2	6	0,142857	1		0,00129857
g2r9 3	4	0,0952381	1		0,0007575	g3r9 3	4	0,095238	2		0,00086571
g2r9 4	4	0,0952381	1		0,0007575	g3r9 4	4	0,095238	1		0,00086571
g2r9 5	4	0,0952381	2		0,0007575	g3r9 5	4	0,095238	1		0,00086571
g2r10 1		0		0	#DIV/0!	g3r10 1	7	0,166667	1	110,0110011	0,001515
g2r10 2		0			#DIV/0!	g3r10 2	5	0,119048	2		0,00108214
g2r10 3		0			#DIV/0!	g3r10 3	9	0,214286	2		0,00194786
g2r10 4		0			#DIV/0!	g3r10 4	4	0,095238	1		0,00086571
g2r10 5		0			#DIV/0!	g3r10 5	4	0,095238	1		0,00086571

## continuação

LAMINA	POI	Vv	Q	Nv	Vglom
g4r1 1	5	0,1190476	1	78,579287	0,001515
g4r1 2	6	0,1428571	1		0,001818
g4r1 3	6	0,1428571	1		0,001818
g4r1 4	3	0,0714286	0		0,000909
g4r1 5	6	0,1428571	2		0,001818
g4r2 1	5	0,1190476	2	110,011	0,00108214
g4r2 2	3	0,0714286	0		0,00064929
g4r2 3	4	0,0952381	2		0,00086571
g4r2 4	5	0,1190476	1		0,00108214
g4r2 5	8	0,1904762	2		0,00173143
g4r3 1	4	0,0952381	2	94,295144	0,00101
g4r3 2	3	0,0714286	0		0,0007575
g4r3 3	5	0,1190476	2		0,0012625
g4r3 4	5	0,1190476	1		0,0012625
g4r3 5	6	0,1428571	1		0,001515
g4r4 1	6	0,1428571	3	110,011	0,00129857
g4r4 2	5	0,1190476	0		0,00108214
g4r4 3	5	0,1190476	2		0,00108214
g4r4 4	5	0,1190476	1		0,00108214
g4r4 5	6	0,1428571	1		0,00129857
g4r5 1	4	0,0952381	2	141,44272	0,00067333
g4r5 2	5	0,1190476	1		0,00084167
g4r5 3	7	0,1666667	3		0,00117833
g4r5 4	6	0,1428571	1		0,00101
g4r5 5	7	0,1666667	2		0,00117833
g4r6 1	5	0,1190476	2	172,87443	0,00068864
g4r6 2	6	0,1428571	2		0,00082636
g4r6 3	7	0,1666667	3		0,00096409
g4r6 4	6	0,1428571	2		0,00082636
g4r6 5	6	0,1428571	2		0,00082636
g4r7 1	4	0,0952381	1	94,295144	0,00101
g4r7 2	5	0,1190476	1		0,0012625
g4r7 3	4	0,0952381	2		0,00101
g4r7 4	5	0,1190476	1		0,0012625
g4r7 5	4	0,0952381	1		0,00101
g4r8 1	5	0,1190476	1	110,011	0,00108214
g4r8 2	6	0,1428571	2		0,00129857
g4r8 3	5	0,1190476	1		0,00108214
g4r8 4	4	0,0952381	2		0,00086571
g4r8 5	5	0,1190476	1		0,00108214
g4r9 1	4	0,0952381	1	94,295144	0,00101
g4r9 2	5	0,1190476	1		0,0012625
g4r9 3	6	0,1428571	2		0,001515
g4r9 4	6	0,1428571	1		0,001515
g4r9 5	4	0,0952381	1		0,00101
g4r10	8	0,1904762	3	141,44272	0,00134667
g4r10	6	0,1428571	1		0,00101
g4r10	4	0,0952381	2		0,00067333
g4r10	5	0,1190476	1		0,00084167
g4r10	6	0,1428571	2		0,00101

LAMINA	POI	Vv	Q	Nv	Vglom
g5r1 1	7	0,166667	2	110,0110011	0,001515
g5r1 2	6	0,142857	2		0,00129857
g5r1 3	5	0,119048	1		0,00108214
g5r1 4	5	0,119048	1		0,00108214
g5r1 5	4	0,095238	1		0,00086571
g5r2 1	6	0,142857	2	141,4427157	0,00101
g5r2 2	4	0,095238	2		0,00067333
g5r2 3	4	0,095238	1		0,00067333
g5r2 4	5	0,119048	1		0,00084167
g5r2 5	7	0,166667	3		0,00117833
g5r3 1	6	0,142857	2	141,4427157	0,00101
g5r3 2	5	0,119048	2		0,00084167
g5r3 3	6	0,142857	2		0,00101
g5r3 4	7	0,166667	2		0,00117833
g5r3 5	3	0,071429	1		0,000505
g5r4 1	7	0,166667	1	141,4427157	0,00117833
g5r4 2	5	0,119048	1		0,00084167
g5r4 3	4	0,095238	3		0,00067333
g5r4 4	7	0,166667	2		0,00117833
g5r4 5	6	0,142857	2		0,00101
g5r5 1	5	0,119048	1	110,0110011	0,00108214
g5r5 2	6	0,142857	1		0,00129857
g5r5 3	4	0,095238	2		0,00086571
g5r5 4	5	0,119048	2		0,00108214
g5r5 5	4	0,095238	1		0,00086571
g5r6 1	4	0,095238	1	110,0110011	0,00086571
g5r6 2	7	0,166667	1		0,001515
g5r6 3	5	0,119048	2		0,00108214
g5r6 4	6	0,142857	2		0,00129857
g5r6 5	5	0,119048	1		0,00108214
g5r7 1	6	0,142857	1	172,8744303	0,00082636
g5r7 2	5	0,119048	3		0,00068864
g5r7 3	6	0,142857	1		0,00082636
g5r7 4	7	0,166667	3		0,00096409
g5r7 5	7	0,166667	3		0,00096409
g5r8 1	5	0,119048	1	157,158573	0,0007575
g5r8 2	6	0,142857	2		0,000909
g5r8 3	5	0,119048	1		0,0007575
g5r8 4	6	0,142857	3		0,000909
g5r8 5	6	0,142857	3		0,000909
g5r9 1	5	0,119048	1	94,2951438	0,0012625
g5r9 2	5	0,119048	1		0,0012625
g5r9 3	5	0,119048	1		0,0012625
g5r9 4	5	0,119048	2		0,0012625
g5r9 5	4	0,095238	1		0,00101
g5r10 1	5	0,119048	1	110,0110011	0,00108214
g5r10 2	5	0,119048	2		0,00108214
g5r10 3	5	0,119048	2		0,00108214
g5r10 4	4	0,095238	1		0,00086571
g5r10 5	4	0,095238	1		0,00086571
	4	0,095238	2	125,7268584	0,0007575
	6	0,142857	1		0,00113625
	4	0,095238	2		0,0007575
	4	0,095238	1		0,0007575
	5	0,119048	2		0,00094688

## conclusão

LAMIN	POI	Vv	Q	Nv	Vglom
g6r1 1	7	0,1666667	2	141,44272	0,00117833
g6r1 2	7	0,1666667	2		0,00117833
g6r1 3	8	0,1904762	3		0,00134667
g6r1 4	6	0,1428571	1		0,00101
g6r1 5	7	0,1666667	1		0,00117833
g6r2 1	7	0,1666667	1	110,011	0,001515
g6r2 2	5	0,1190476	1		0,00108214
g6r2 3	6	0,1428571	1		0,00129857
g6r2 4	5	0,1190476	2		0,00108214
g6r2 5	6	0,1428571	2		0,00129857
g6r3 1	5	0,1190476	2	157,15857	0,0007575
g6r3 2	6	0,1428571	2		0,000909
g6r3 3	5	0,1190476	2		0,0007575
g6r3 4	6	0,1428571	2		0,000909
g6r3 5	6	0,1428571	2		0,000909
g6r4 1	4	0,0952381	1	125,72686	0,0007575
g6r4 2	4	0,0952381	1		0,0007575
g6r4 3	7	0,1666667	2		0,00132563
g6r4 4	6	0,1428571	3		0,00113625
g6r4 5	4	0,0952381	1		0,0007575
g6r5 1	4	0,0952381	1	125,72686	0,0007575
g6r5 2	5	0,1190476	1		0,00094688
g6r5 3	6	0,1428571	2		0,00113625
g6r5 4	5	0,1190476	2		0,00094688
g6r5 5	5	0,1190476	2		0,00094688
g6r6 1	5	0,1190476	2	141,44272	0,00084167
g6r6 2	6	0,1428571	2		0,00101
g6r6 3	4	0,0952381	2		0,00067333
g6r6 4	5	0,1190476	2		0,00084167
g6r6 5	5	0,1190476	1		0,00084167
g6r7 1	5	0,1190476	2	110,011	0,00108214
g6r7 2	5	0,1190476	1		0,00108214
g6r7 3	4	0,0952381	1		0,00086571
g6r7 4	4	0,0952381	2		0,00086571
g6r7 5	7	0,1666667	1		0,001515
g6r8 1	4	0,0952381	1	125,72686	0,0007575
g6r8 2	7	0,1666667	1		0,00132563
g6r8 3	6	0,1428571	2		0,00113625
g6r8 4	4	0,0952381	2		0,0007575
g6r8 5	5	0,1190476	2		0,00094688
g6r9 1	5	0,1190476	1	125,72686	0,00094688
g6r9 2	5	0,1190476	2		0,00094688
g6r9 3	6	0,1428571	2		0,00113625
g6r9 4	6	0,1428571	2		0,00113625
g6r9 5	5	0,1190476	1		0,00094688
g6r10	7	0,1666667	3	204,30614	0,00081577
g6r10	4	0,0952381	2		0,00046615
g6r10	5	0,1190476	3		0,00058269
g6r10	5	0,1190476	2		0,00058269
g6r10	6	0,1428571	3		0,00069923

LAMINA	POI	Vv	Q	Nv	Vglom
sham1 1		0		0	
sham 1 2		0			
sham 1 3		0			
sham 1 4		0			
sham 1 5		0			
sham2 1	7	0,166667	1	110,0110011	0,001515
sham 2	7	0,166667	3		0,001515
sham 2	5	0,119048	0		0,00108214
sham 2	7	0,166667	2		0,001515
sham 2	5	0,119048	1		0,00108214
sham3 1	4	0,095238	1	94,2951438	0,00101
sham3 2	4	0,095238	1		0,00101
sham3 3	4	0,095238	1		0,00101
sham3 4	4	0,095238	2		0,00101
sham3 5	5	0,119048	1		0,0012625
sham4 1	5	0,119048	1	94,2951438	0,0012625
sham4 2	4	0,095238	1		0,00101
sham4 3	5	0,119048	1		0,0012625
sham4 4	6	0,142857	1		0,001515
sham4 5	6	0,142857	2		0,001515
sham5 1	4	0,095238	1	94,2951438	0,00101
sham5 2	6	0,142857	1		0,001515
sham5 3	6	0,142857	2		0,001515
sham5 4	3	0,071429	1		0,0007575
sham5 5	5	0,119048	1		0,0012625
sham6 1	6	0,142857	1	125,7268584	0,00113625
sham6 2	4	0,095238	1		0,0007575
sham6 3	4	0,095238	2		0,0007575
sham6 4	6	0,142857	2		0,00113625
sham6 5	4	0,095238	2		0,0007575
sham7 1	5	0,119048	1	141,4427157	0,00084167
sham7 2	4	0,095238	1		0,00067333
sham7 3	6	0,142857	2		0,00101
sham7 4	4	0,095238	1		0,00067333
sham7 5	8	0,190476	4		0,00134667
sham8 1	3	0,071429	0	62,8634292	0,00113625
sham8 2	4	0,095238	1		0,001515
sham8 3	5	0,119048	1		0,00189375
sham8 4	5	0,119048	1		0,00189375
sham8 5	6	0,142857	1		0,0022725
sham9 1		0		0	#DIV/0!
sham9 2		0			#DIV/0!
sham9 3		0			#DIV/0!
sham9 4		0			#DIV/0!
sham9 5		0			#DIV/0!
sham10 1		0		0	#DIV/0!
sham10 2		0			#DIV/0!
sham10 3		0			#DIV/0!
sham10 4		0			#DIV/0!
sham10 5		0			#DIV/0!

## ANEXO 5 – DADOS DAS DOSAGENS DE ESTRESSE OXIDATIVO

GRUPO	ANIMAL	GSH	LPO	PCO
TAC1	1	19,155499	0,00191815	0,00464868
	2	2,4994783	0,00144609	0,00490662
	3	2,2139079	0,00234324	0,00263479
	4	11,243335	0,00120499	0,00084412
	5	11,581307	0,00159701	0,00384511
	6	6,1983848	0,00097199	0,00381039
	7	4,021275	0,00125868	0,0027092
	8	1,9048378	0,00111849	0,00214372
	9	2,4373	0,0012941	0,00338876
	10	2,1194261	0,00128788	0,00626574
TAC0.1	1	2,25179	0,00130293	0,00310106
	2	4,3313697	0,00161023	0,00349293
	3	6,8029548	0,00133515	0,00516951
	4	6,7132064	0,00089365	0,00490166
	5	1,9916671	0,00101744	0,00126574
	6	1,6839491	0,00077418	0,00296217
	7	2,0569215	0,00112909	0,00332924
	8	13,713202	0,0007921	0,00110701
	9	2,0689234	0,00131819	0,00310106
	10	6,6942734	0,00183905	0,00329451
TAC10	1	14,324132	0,00136609	0,00231237
	2	4,7139926	0,00166549	0,00623102
	3	10,153953	0,00102606	0,00313578
	4	24,801346	0,00027235	0,0028084
	5	2,4939959	0,00177227	0,00320027
	6	9,9501424	0,00105406	0,00541257
	7	2,474164	0,00175838	0,00296217
	8	2,9775407	0,00197478	0,00458916
	9	8,3282019	0,00128077	0,00625582
MMF	1	1,4827799	0,00064787	0,0018957
	2	23,039223	0,00094095	0,0031209
	3	11,493868	0,00041005	-0,0001876
	4	10,338219	0,00116398	0,00401376
	5	11,874314	0,00067187	0,00120126
	6	15,611291	0,00086346	0,00335404
	7	16,644088	0,00074249	0,00190066
	8	6,1835005	0,0007054	0,00199987
	9	15,333704	0,00074589	0,00289769
	10	13,254586	0,00074768	0,00347308

continua

## conclusão

MMF/TAC1	1	4,0845142	0,00084873	0,0040832
	2	4,0923455	0,00108592	0,00570523
	3	2,7293364	0,00106812	0,00386495
	4	3,750935	0,00126996	0,0040088
	5	4,3001612	0,0025646	0,00430146
	6	2,7628407	0,00083146	0,00613678
	7	3,7287646	0,00082317	0,00585404
	8	11,825493	0,00197196	0,00510007
	9	3,8433429	0,00219541	0,00404848
	10	5,3649925	0,00248466	0,00506535
	11	2,578476	0,00132756	0,00571019
MMF/TAC0.5	1	2,0511232	0,00061472	0,0049711
	2	1,8866175	0,00093385	0,00407824
	3	2,3000235	0,00105118	0,00389471
	4	5,6181813	0,00055903	0,00314074
	5	2,0345419	0,00105738	0,0052092
	6	1,1407871	0,00049147	0,00241654
	7	1,9911594	0,00061121	0,00483717
	8	2,9290164	0,00133449	0,00527368
	9	1,8918235	0,00072134	0,00527368
	10	4,9950666	0,0006549	0,00579451
SHAM	1	10,202287	0,0016605	0,00394928
	2	7,4880708	0,00106401	0,00380047
	3	3,5764003	0,0017254	0,00649888
	4	2,3719	0,00105823	0,00363678
	5	2,3803486	0,0017632	0,00270424
	6	3,5947479	0,00139668	0,00405344
	7	2,0345564	0,00074983	0,00396912
	8	2,6160231	0,0008492	0,00453955
CONTROLE	1	1,9183226	0,00205702	0,00422705
	2	6,5523213	0,00268716	0,00519928
	3	1,0464477	0,0004972	-0,0003811
	4	22,346268	0,00335804	0,00579451
	5	3,4550412	0,00197565	0,00584412
	6	3,3904162	0,00173276	0,00393439
	7	2,9629873	0,00157338	0,00398896
	8	0,7479876	0,00074908	0,00157824
	9	4,6468404	0,00172923	0,00558122
	10	3,4674913	0,00056084	0,00441555