

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CARLOS EDUARDO DA SILVA

**EFEITOS DA DISFUNÇÃO RENAL NA CICATRIZAÇÃO DE
ANASTOMOSES COLÔNICAS. ESTUDO EXPERIMENTAL
EM RATOS WISTAR.**

CURITIBA
2017

CARLOS EDUARDO DA SILVA

**EFEITOS DA DISFUNÇÃO RENAL NA CICATRIZAÇÃO DE
ANASTOMOSES COLÔNICAS. ESTUDO EXPERIMENTAL
EM RATOS WISTAR.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Clínica Cirúrgica.

Co-orientador: Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

CURITIBA
2017

Silva, Carlos Eduardo da
Efeitos da disfunção renal na cicatrização de anastomoses
colônicas: estudo experimental em ratos Wistar / Carlos Eduardo
da Silva.– Curitiba, 2017.
81 f. il.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias.
Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Paraná.

1.Nefrectomia. 2.Uremia. 3.Proteína C. 4.Cicatrização. 5.Cólon.
6.Colágeno. 7.Neovascularização Fisiológica. 8.Miofibroblastos.
9.Ratos Wistar. NLM: WJ 368



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEIS MESTRADO E DOUTORADO

Ata do julgamento da 434ª Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, referente ao aluno **CARLOS EDUARDO DA SILVA**, com o trabalho intitulado: **"EFETOS DA DISFUNÇÃO RENAL NA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES COLÔNICAS. ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR"**. Área de Concentração: Nutrição e cicatrização em cirurgia; Linha de Pesquisa: Cicatrização e medida de resistência dos tecidos, tendo como orientador o Professor Doutor **Jorge Eduardo Fouto Matias**.

As sete horas e trinta minutos do dia dez de março de dois mil e dezessete, no auditório da CAD – sala 701 – 7º andar do prédio central do Hospital de Clínicas, reuniu-se, em sessão pública, a Banca Examinadora de Avaliação composta pelos seguintes doutores: João Carlos Domingues Repka, Rodrigo Ketzer Krebs, Luiz Sérgio Santos, sendo este último presidente da banca. Aberta a sessão, foi apresentada pelo Professor Doutor Jorge Eduardo Fouto Matias, Coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pelo candidato das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da dissertação como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Banca Examinadora de Avaliação convidou o candidato a apresentar oralmente resumo de sua dissertação no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pelo candidato, sucessivamente pelos componentes da Banca Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a banca examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto. O candidato foi considerado **APROVADO** considerando-se os parâmetros vigentes estabelecidos pelo programa e regidos pela legislação pertinente da instituição. Voltando à sala de sessão, o Senhor Presidente da Banca Examinadora leu os conceitos do Parecer Conjunto e deu por encerrada a sessão. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata, que será assinada pelos seguintes membros.


João Carlos Domingues Repka


Rodrigo Ketzer Krebs


Luiz Sérgio Santos



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEIS MESTRADO E DOUTORADO

**PARECER CONJUNTO DA BANCA EXAMINADORA
DA AVALIAÇÃO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Aluno: **CARLOS EDUARDO DA SILVA**

Titulo da Dissertação: **"EFEITOS DA DISFUNÇÃO RENAL NA
CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES COLÔNICAS. ESTUDO
EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR"**

CONCEITOS EMITIDOS

MEMBROS	CONCEITO	EQUIVALÊNCIA
João Carlos Domingues Repka	A	10
Rodrigo Ketzer Krebs	A	10
Luiz Sérgio Santos	A	10

CONCEITO FINAL DE AVALIAÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Conceito Final: A Equivalência: 10

Curitiba, 10 de março de 2017.

MEMBROS	ASSINATURA
João Carlos Domingues Repka	
Rodrigo Ketzer Krebs	
Luiz Sérgio Santos	

À minha amada esposa **Andressa Klauck**, pelo incentivo, paciência e por sempre acreditar no meu sucesso.

Aos meus pais **Carlos** e **Sueli**, razões da minha existência e exemplos para o meu crescimento.

A minha irmã **Kelley**, pilar essencial durante minha graduação.

Muito obrigado.

Ao programa de pós-graduação em **Clínica Cirúrgica** da **Universidade Federal do Paraná** pelo acolhimento.

Ao Professor **Jorge Eduardo Fouto Matias**, pelo empenho e colaboração fundamentais para concretização deste estudo.

Ao **Doutor João Carlos Domingues Repka**, co-orientador desta dissertação, meu eterno agradecimento pelo apoio, dedicação, amizade e sobretudo, pela oportunidade de crescimento.

Aos professores **Carlos José Franco de Souza** e **Pedro Ernesto Caron** que auxiliaram na realização técnica do projeto.

Aos meus colegas **Filipe Carlos Caron**, **Márcio Barreto**, **Luana Parminondi Rocha**, **Vinícius Abou Rejaile** e **Guilherme Moreira**, braços amigos nos cuidados e manejo com os animais.

Ao **Hospital Angelina Caron**, pela escola em Medicina e Cirurgia, pelo ambiente acolhedor e incentivador, pelo apoio para a execução deste projeto e subsídio para as análises histológicas e imunohistoquímica.

Muito obrigado.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e ao mesmo tempo,
participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

Madame Marie Curie.

RESUMO

A doença renal crônica (DRC) atinge mais de 500 milhões de pessoas em todo o mundo e no Brasil existem mais de 2 milhões de portadores de algum grau de disfunção renal. Neste contexto as toxinas urêmicas geradas na DRC estão relacionadas ao comprometimento da cicatrização tecidual, pelo retardo do processo inflamatório cicatricial, baixa proliferação de fibroblastos e células endoteliais, baixos níveis teciduais de hidroxiprolina e colágeno, tecido conectivo subcutâneo e tecido de granulação. Os objetivos do presente estudo são avaliar na cicatrização de anastomoses colônicas de ratos urêmicos, a formação de tecido de granulação, a maturação de colágeno, a densidade microvascular e de miofibroblastos, a viabilidade celular cicatricial e os parâmetros séricos uréia, creatinina e proteína C reativa (PCR). Utilizaram-se 20 ratos Wistar, com idades entre 143 a 152 dias e pesos de $249,02 \pm 13,80$ gramas separados aleatoriamente em dois grupos. No grupo simulação os ratos foram submetidos à simulação da nefrectomia 5/6 pela incisão lombar esquerda exposição e manipulação do rim esquerdo (D0), incisão lombar direita, exposição e manipulação do rim direito (D7), laparotomia mediana, colotomia e colorrafia (D14). No grupo uremia, os ratos foram submetidos à nefrectomia 5/6 pela ressecção ambos os polos renais do rim esquerdo (D0), nefrectomia total do rim do rim direito (D7), laparotomia mediana, colotomia e colorrafia (D14). O estudo foi interrompido no sétimo dia após colotomia/colorrafia e coletaram-se amostras de sangue para dosagens séricas de uréia, creatinina e PCR e ressecaram-se os segmentos colônicos incisados e rafiados para processamentos histológicos e histoquímicos através da coloração de hematoxilina eosina para avaliação do tecido de granulação considerando a intensidade da reação inflamatória cicatricial, crosta fibrinoleucocitária, proliferação angiofibroblástica e reepitelização das bordas. Empregou-se a histometria computadorizada para as avaliações de colágenos tipo I e III pela coloração de picrossírius, densidade microvascular pela marcação com anticorpo monoclonal anti-CD34, viabilidade celular pela pesquisa do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e a densidade de miofibroblastos com anticorpo monoclonal anti- α -actina. Empregaram-se os testes de ANOVA e T-Student com $p < 0,05$ para as comparações entre os grupos. O grupo de ratos submetidos à nefrectomia 5/6, em comparação ao grupo simulação, demonstraram aumentos da uréia sérica ($p < 0,0000$) e proteína c reativa ultrasensível ($p = 0,0142$), redução da: formação de tecido de granulação (reepitelização de bordas - $p = 0,0196$, proliferação angiofibroblástica - $p = 0,0379$), porcentagens de colágeno I ($p = 0,0009$) e colágeno III ($p = 0,016$), densidade microvascular ($p = 0,0074$), PCNA ($p < 0,0000$) e miofibroblastos ($p < 0,0001$). A uremia experimental induzida pelo modelo de nefrectomia 5/6 determina impacto negativo no processo de cicatrização colônica quando avaliado por formação de tecido de granulação, maturação de colágeno, densidade microvascular, proliferação celular e densidade de miofibroblastos.

DESCRITORES: Nefrectomia. Uremia. Proteína C reativa. Cicatrização. Cólon. Colágeno. Neovascularização Fisiológica. Miofibroblastos. Ratos Wistar.

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) affects more than 500 million people worldwide and in Brazil there are more than two million patients with some degree of renal dysfunction. In this context, the uremic toxins present in patients with CKD are related to worsening in tissue healing by delaying the inflammatory process, decreasing the tissular levels of fibroblasts and endothelial cell proliferation, decreasing the tissular levels of hydroxyproline and collagen, subcutaneous connective and granulation tissue. Our aims are evaluate in uremic rats, the intestinal healing granulation tissue formation, collagen maturation, microvascular and myofibroblasts density, cicatricial cell viability and quantify the serum levels of urea, creatinine and C-reactive protein (CRP). Twenty Wistar rats, aged 143 to 152 days, weighing $249,02 \pm 13,80$ grams were randomly separated into two groups. In the sham group rats were submitted to 5/6 nephrectomy simulation by left lumbar incision, left kidney exposure and manipulation (D0), right lumbar incision, right kidney exposure and manipulation (D7), median laparotomy, colotomy and colorrhaphy (D14). In the uremia group, rats were submitted to 5/6 nephrectomy by the resection of both left renal poles (D0), total nephrectomy of the right kidney (D7) and median laparotomy, colotomy and colorrhaphy (D14). The study was discontinued on the seventh day and blood samples were collected for serum urea, creatinine and CRP dosages and the incised and sutured colonic segments were resected. The resected samples were studied histologically by hematoxylin eosin stain for evaluation of granulation tissue. The intensity of the cicatricial inflammatory reaction, fibrinoleucocytic crust, angiofibroblastic proliferation and borders reepithelialization were considered. Through histochemical processing, microvascular density was evaluated by anti-CD34 monoclonal antibody marking, cell viability by cell proliferation nuclear antigen (PCNA) screening and myofibroblasts density with monoclonal anti- α -actin antibody. Computerized histometry was used for evaluations of collagens type I and III by the coloration of picrosirius. The ANOVA and Student T tests were used with $p < 0.05$ for comparisons between the groups. The group submitted to nephrectomy 5/6, compared to the sham group, urea increase ($p < 0.0000$) and higher ultra-sensitive C reactive protein ($p = 0,0142$). Decrease of granulation tissue formation (border repithelialization - $p = 0,0196$), angiofibroblast proliferation ($p = 0,0379$), mean collagen I ($p = 0,0009$) and collagen III ($p = 0,016$), microvascular density ($p = 0,0074$), PCNA ($p < 0,0000$) and myofibroblasts ($p < 0,0001$). The experimental uremia induced by nephrectomy 5/6 model establishes negative impact in the wound healing at large intestine when evaluated by granulation tissue formation and collagen maturation, microvascular and myofibroblastic cell densities, and cell viability.

KEYWORDS: Nephrectomy. Uremia. C-reactive protein. Wound Healing. Colon. Collagen. Neovascularization, Physiologic. Myofibroblasts. Rats, Wistar.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS FASES EVOLUTIVAS DA CICATRIZAÇÃO.....	20
FIGURA 2 - AMBIENTE CIRÚRGICO DEMONSTRANDO NO DETALHE “A” MONTAGEM DA MESA CIRÚRGICA E NO “B” O INSTRUMENTAL CIRÚRGICO	28
FIGURA 3 - PROCEDIMENTO ANESTÉSICO. NO DETALHE “A” A PESAGEM EM BALANÇA ELETRÔNICA DO RATO SEDADO E NO DETALHE “B” A INOCULAÇÃO DOS ANESTÉSICOS	29
FIGURA 4 - NEFRECTOMIA PARCIAL. NO DETALHE “A” TRICOTOMIA, DEGERMAÇÃO E FIXAÇÃO DO RATO NA PRANCHA CIRÚRGICA EM POSIÇÃO LATERAL. NO DETALHE “B” A INCISÃO LATERAL PARA O ACESSO DA CAVIDADE PERITONEAL. NO DETALHE “C” A LOCALIZAÇÃO INTRAPERITONEAL DO RIM. NO DETALHE “D” O TRACIONAMENTO DO RIM PARA FORA DA CAVIDADE PERITONEAL. NO DETALHE “E” A ABLAÇÃO DOS POLOS RENAIIS	30
FIGURA 5 - NEFRECTOMIA TOTAL. NO DETALHE “A” TRICOTOMIA, DEGERMAÇÃO E FIXAÇÃO DO RATO NA PRANCHA CIRÚRGICA EM POSIÇÃO LATERAL. NO DETALHE “B” A INCISÃO LATERAL PARA O ACESSO DA CAVIDADE PERITONEAL. NO DETALHE “C” A LOCALIZAÇÃO INTRAPERITONEAL E TRACIONAMENTO DO RIM. NO DETALHE “D” O TRACIONAMENTO TOTAL DO RIM PARA FORA DA CAVIDADE PERITONEAL. NO DETALHE “E” RIM EXCISIONADO	31
FIGURA 6 - COLOTOMIA E COLORRAFIA. ETAPAS DO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO, NO DETALHE “A” A LAPAROTOMIA MEDIANA COM AFASTADORES NAS BORDAS E EXPOSIÇÃO DAS ALÇAS INTESTINAIS, NO DETALHE “B” A LOCALIZAÇÃO DO COLON, NO DETALHE “C” A COLOTOMIA NO DETALHE “D” A COLORRAFIA E NO DETALHE “E” A FERIDA CIRÚRGICA SUTURADA EM DOIS PLANOS: MÚSCULO-APONEURÓTICO E CUTÂNEO	32
FIGURA 7 - DEMONSTRATIVO DA PUNÇÃO CARDÍACA PARA COLETA DE SANGUE E INDUÇÃO DA PARADA CÁRDIO-RESPIRATÓRIA	33
FIGURA 8 - COLETA DE AMOSTRAS DE INTESTINO. NO DETALHE “A” A CAVIDADE ABDOMINAL ABERTA E LOCALIZADA A CICATRIZ COLÔNICA, NO DETALHE “B” O SEGMENTO COLÔNICO RAFIADO AO SÉTIMO DIA DE EVOLUÇÃO CICATRICIAL, RESSECADO E PREPARADO PARA A FIXAÇÃO EM FORMALINA	34

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - DEMONSTRATIVO DA VARIAÇÃO PONDERAL ENTRE OS GRUPOS DE RATOS AVALIADOS	40
GRÁFICO 2 - DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS ARITMÉTICAS DAS DOSAGENS DE URÉIA. (MG/ML)	41
GRÁFICO 3 - DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS ARITMÉTICAS DAS DOSAGENS DE CREATININA. (MG/ML)	42
GRÁFICO 4 - DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS ARITMÉTICAS DAS DOSAGENS DE PROTEÍNA C REATIVA ULTRASSENSÍVEL. (MG/ML)	43
GRÁFICO 5 - DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS ARITMÉTICAS DOS ESCORES ATRIBUÍDOS AOS CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DO TECIDO DE GRANULAÇÃO CICATRICIAL INTESTINAL	44
GRÁFICO 6 - DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS ARITMÉTICAS DAS PORCENTAGENS DE COLÁGENOS TIPOS I E III NO TECIDO CICATRICIAL INTESTINAL	45
GRÁFICO 7 - DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS ARITMÉTICAS DAS QUANTIFICAÇÕES DAS DENSIDADES MICROVASCULARES NO TECIDO CICATRICIAL INTESTINAL	46
GRÁFICO 8 - DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS ARITMÉTICAS DAS QUANTIFICAÇÕES DO ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR NO TECIDO CICATRICIAL INTESTINAL	47
GRÁFICO 9 - DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS ARITMÉTICAS DAS QUANTIFICAÇÕES DE MIOFIBROBLASTOS NO TECIDO CICATRICIAL INTESTINAL	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	DEMONSTRATIVO DA ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS DO ESTUDO E PROCEDIMENTOS REALIZADOS	27
TABELA 2 -	CRITÉRIOS ADOTADOS PARA AS AVALIAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DA FORMAÇÃO DE TECIDO DE GRANULAÇÃO PELA COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA E EOSINA CONFORME DESCRIÇÃO DE STEVENS & LOWE (2002)	36
TABELA 3 -	DEMONSTRATIVO DAS AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS (P) DAS AVALIAÇÕES PONDERAIS ENTRE OS GRUPOS DE RATOS AVALIADOS	40
TABELA 4 -	DEMONSTRATIVO DAS AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS (P) DAS DOSAGENS DE URÉIA ENTRE OS GRUPOS DE RATOS AVALIADOS	41
TABELA 5 -	DEMONSTRATIVO DAS AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS (P) DOSAGENS DE CREATININA ENTRE OS GRUPOS DE RATOS AVALIADOS	42
TABELA 6 -	DEMONSTRATIVO DAS AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS (P) DOSAGENS DE PROTEÍNA C REATIVA ULTRASSENSÍVEL ENTRE OS GRUPOS DE RATOS AVALIADOS	43
TABELA 7 -	DEMONSTRATIVO DAS AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS (P) DOS CRITÉRIOS EMPREGADOS NAS AVALIAÇÕES DA FORMAÇÃO DO TECIDO DE GRANULAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DE RATOS AVALIADOS	44
TABELA 8 -	DEMONSTRATIVO DAS AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS (P) DAS PORCENTAGENS DE COLÁGENOS TIPOS I E III ENTRE OS GRUPOS DE RATOS AVALIADOS	45
TABELA 9 -	DEMONSTRATIVO DAS AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS (P) DAS QUANTIFICAÇÕES DAS DENSIDADES MICROVASCULARES NO TECIDO CICATRICAL INTESTINAL.....	46
TABELA 10 -	DEMONSTRATIVO DAS AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS (P) DAS QUANTIFICAÇÕES DO ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR ENTRE OS GRUPOS DE RATOS AVALIADOS	47
TABELA 11 -	DEMONSTRATIVO DAS AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS (P) DAS QUANTIFICAÇÕES DE MIOFIBROBLASTOS ENTRE OS GRUPOS DE RATOS AVALIADOS	48
TABELA 12 -	PESAGENS E COMPARAÇÕES ENTRE OS GRUPOS UREMIA (U) E SIMULAÇÃO (S)	68
TABELA 13 -	RESULTADOS INDIVIDUAIS DAS DOSAGENS DE URÉIA (MG/ML)	69
TABELA 14 -	RESULTADOS INDIVIDUAIS DAS DOSAGENS DE CREATININA (MG/ML)	70

TABELA 15 - RESULTADOS INDIVIDUAIS DAS DOSAGENS DE PROTEÍNA C REATIVA (MG/ML)	71
TABELA 16 - RESULTADOS DAS LEITURAS HISTOPATOLÓGICAS, EM TRIPLICATAS, DA AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE TECIDO DE GRANULAÇÃO	72
TABELA 17 - RESULTADOS INDIVIDUAIS DAS AVALIAÇÕES HISTOMÉTRICAS COMPUTADORIZADAS EM TRIPLICATAS PARA QUANTIFICAÇÃO PORCENTUAL DE COLÁGENOS I E III	74
TABELA 18 - RESULTADOS INDIVIDUAIS DAS AVALIAÇÕES HISTOMÉTRICAS COMPUTADORIZADAS EM TRIPLICATAS PARA QUANTIFICAÇÃO DA DENSIDADE MICROVASCULAR	76
TABELA 19 - RESULTADOS INDIVIDUAIS DAS AVALIAÇÕES HISTOMÉTRICAS COMPUTADORIZADAS EM TRIPLICATAS PARA QUANTIFICAÇÃO DO ANTÍGENO CELULAR DE PROLIFERAÇÃO NUCLEAR	78
TABELA 20 - RESULTADOS INDIVIDUAIS DAS AVALIAÇÕES HISTOMÉTRICAS COMPUTADORIZADAS EM TRIPLICATAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE MIOFIBROBLASTOS	80

LISTA DE ABREVIATURAS

EDTA	-	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
ANOVA	-	Análise de variância
PCNA	-	Antígeno nuclear de proliferação celular
COBEA	-	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DRC	-	Doença renal crônica
TNF α	-	Fator de necrose tumoral alfa
°C	-	Graus centígrados
IL	-	Interleucina
®	-	Marca registrada
MG/ML	-	Miligramas por mililitros
NADH	-	Nicotinamida adenosina dinucleotídeo
ON	-	Óxido nítrico
pH	-	Potencial hidrogeniônico
PCR	-	Proteína C reativa
p	-	Significância estatística
PBS	-	Tampão fosfatos
GLDH	-	Urease/glutamato-desidrogenase
TGF β	-	Fator de crescimento beta
HE	-	Hematoxilina-eosina
ERO	-	Espécie reativa derivada do oxigênio
DMSA	-	Ácido dimercaptosuccínico
NX	-	Nefrectomia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	DISFUNÇÃO RENAL	16
2.2	ANASTOMOSES INTESTINAIS	19
2.3	MODELOS EXPERIMENTAIS PARA INDUÇÃO DE DISFUNÇÃO RENAL	24
3	MÉTODO	27
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	27
3.2	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	28
3.2.1	Ambiente de experimentação	28
3.2.2	Anestesia	28
3.2.3	Procedimentos cirúrgicos	29
3.2.3.1	Nefrectomia 5/6	29
3.2.3.1.1	Nefrectomia parcial	29
3.2.3.1.2	Nefrectomia total	31
3.2.3.2	Colotomia e colorrafia	32
3.3	COLETA DE AMOSTRAS	33
3.4.	AVALIAÇÕES	34
3.4.1	AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	35
3.4.1.1	Dosagem de uréia.....	35
3.4.1.2	Dosagem de creatinina.....	35
3.4.1.3	Dosagem de proteína C reativa ultrasensível	35
3.4.2	AVALIAÇÕES MICROSCÓPICAS.....	35
3.4.2.1	Avaliação da formação de tecido de granulação	36
3.4.2.2	Avaliação histométrica da porcentagem de colágeno dos tipos I e III	36
3.4.2.3	Avaliação da densidade microvascular	37
3.4.2.4	Avaliação tecidual do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)	38
3.4.2.5	Avaliação da densidade de miofibroblastos	39
3.4.3	AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS	39
4	RESULTADOS	40
4.1	AVALIAÇÃO PONDERAL	40
4.2	AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	41
4.2.1	DOSAGENS DE URÉIA.....	41
4.2.2	DOSAGENS DE CREATININA.....	42

4.2.3	DOSAGENS DE PROTEINA C REATIVA ULTRASSENSÍVEL.....	43
4.3	AVALIAÇÕES MICROSCÓPICAS.....	44
4.3.1	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO TECIDO DE GRANULAÇÃO	44
4.3.2	AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA DA PORCENTAGEM DE COLÁGENO DOS TIPOS I E III	45
4.3.3	AVALIAÇÃO DA DENSIDADE MICROVASCULAR	46
4.3.4	AVALIAÇÃO TECIDUAL DO ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA)	47
4.3.5	AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE MIOFIBROBLASTOS	48
5	DISCUSSÃO	49
5.1	O MODELO EXPERIMENTAL	49
5.2	AVALIAÇÃO DO TECIDO DE GRANULAÇÃO	52
5.3	QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENOS I E III	52
5.4	DENSIDADE MICROVASCULAR	54
5.5	AVALIAÇÃO TECIDUAL DO ANTÍGENO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA)	54
5.6	DENSIDADE DE MIOFIBROBLASTOS	55
5.7	DOSAGENS SÉRICAS DE URÉIA, CREATININA E PCR	56
5.8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
6	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61
	APÊNDICES	68
Apêndice 1	PESAGENS E COMPARAÇÕES ENTRE OS GRUPOS UREMIA (U) E SIMULAÇÃO (S)	68
Apêndice 2	DOSAGENS DE URÉIA.....	69
Apêndice 3	DOSAGENS DE CREATININA.....	70
Apêndice 4	DOSAGENS DE PROTEINA C REATIVA.....	71
Apêndice 5	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA FORMAÇÃO DE TECIDO DE GRANULAÇÃO	72
Apêndice 6	AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA COMPUTADORIZADA PARA QUANTIFICAÇÃO PORCENTUAL DE COLÁGENOS I E III	73
Apêndice 7	AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA COMPUTADORIZADA DA DENSIDADE MICROVASCULAR	75
Apêndice 8	AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA COMPUTADORIZADA DO ANTÍGENO CELULAR DE PROLIFERAÇÃO NUCLEAR (PCNA).....	77
Apêndice 9	AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA COMPUTADORIZADA DE MIOFIBROBLASTOS	79
	ANEXO	81
Anexo 1	PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA EM ANIMAIS	81

1 Introdução

A cicatrização é processo complexo, que começou a ser entendido em maior amplitude nos últimos anos. Contudo, ainda há que se estender o seu conhecimento face às inovadoras medidas preventivas e curativas à disposição dos cirurgiões, diminuindo assim a possibilidade de complicações no manuseio dos doentes que necessitam agressão cirúrgica para cura dos seus males.

Sabendo-se que a cicatrização é desenvolvida por um conjunto harmônico de eventos celulares e bioquímicos locais, comuns a vários setores do organismo, pode-se afirmar que estes influenciam os seus mecanismos intermediários básicos como hemostasia, inflamação, proliferação celular e remodelamento da ferida.

Neste contexto as toxinas urêmicas, geradas na disfunção renal, são as responsáveis pela progressão da doença renal crônica (DRC), através da indução da perda da função renal residual, desencadeando respostas inflamatória sistêmica e vascular e desta forma, ampliando a disfunção endotelial renal. Outros efeitos adversos da DRC referem-se à menor atividade fagocitária dos polimorfonucleares, comprometimento da cicatrização tecidual, pelo retardo do processo inflamatório cicatricial, baixa proliferação de fibroblastos e células endoteliais, baixos níveis teciduais de hidroxiprolina e colágeno, tecido conectivo subcutâneo e tecido de granulação.

A doença renal crônica (DRC) é caracterizada pela diminuição lenta e progressiva da função renal, atualmente atinge mais de 500 milhões de pessoas em todo o mundo e no Brasil existem mais de 2 milhões de portadores de algum grau de disfunção renal, segundo estimativas da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN).

Entre os procedimentos cirúrgicos, as operações gastrintestinais figuram entre os realizados com maior frequência. Em pacientes portadores de DRC quando necessitam de alguma abordagem cirúrgica intestinal, que mesmo sob condições urêmicas, será esta a única decisão a ser tomada pelo cirurgião na busca de uma solução para o paciente, como ocorre em situações de urgência ou nos casos de transplantes renais e reno-pancreáticos. Entre as complicações cirúrgicas gastrointestinais, as mais descritas são as falhas na cicatrização anastomótica representada por 3,4% a 12% de deiscências, tendo como causas o fornecimento inadequado de oxigênio, a tensão mecânica elevada na sutura, as

deficiências nutricionais, os agentes farmacológicos, os processos inflamatórios e infecciosos e os distúrbios metabólicos como o ambiente urêmico secundário à DRC.

Embora esteja disponível um grande número de informações científicas sobre a indução cirúrgica de disfunção renal em ratos, são ainda escassas as que estudam os efeitos da uremia na cicatrização intestinal. Diante disso, o presente estudo investiga de forma experimental em ratos urêmicos, a cicatrização de anastomoses colônicas sob parâmetros histopatológicos, imunoistoquímicos e por histometria computadorizada, a maturação de colágeno, a densidade microvascular e de miofibroblastos e a viabilidade celular cicatricial.

1.1 OBJETIVOS:

1.1.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar em um modelo experimental de uremia, aspectos específicos da cicatrização de anastomose colônica.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1.1.2.1 Avaliar a formação do tecido de granulação cicatricial;

1.1.2.2 Quantificar a maturação de colágenos dos tipos I e III;

1.1.2.3 Avaliar a densidade cicatricial microvascular através do marcador anti-CD34;

1.1.2.4 Avaliar a viabilidade celular através do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA);

1.1.2.5 Avaliar a densidade cicatricial de miofibroblastos através do marcador anti- α -actina.

2 Revisão da Literatura

2.1 DISFUNÇÃO RENAL

Os rins são órgãos fundamentais para manutenção da homeostase, portanto a diminuição progressiva da função renal implica em comprometimento de todos os demais órgãos. Dados epidemiológicos nacionais revelam que em julho de 2012, o número total estimado de pacientes portadores de DRC, em terapia dialítica, foi de 97.586, com taxas de prevalência e incidência de 503 e 177 pacientes por milhão da população, respectivamente¹. Em 2014, nos EUA a taxa anual de mortalidade foi de aproximadamente 111 por mil pacientes, e a incidência de novos casos alcança a marca de 120 mil pacientes².

A característica fisiopatológica principal da DRC é a perda progressiva e irreversível da função renal, pela diminuição da taxa da filtração glomerular e aumento sérico das escórias nitrogenadas (uréia, creatinina e ácido úrico)³, tendo como definição taxa de filtração glomerular menor que 60 ml/min/1,73 m² de superfície de área corporal por três meses ou mais, independente da causa ou tipo de lesão renal⁴. A determinação do nível de clearance de creatinina é o método utilizado para definir a magnitude da DRC e podem ser empregados para essa finalidade os cálculos: MDRD “Modification of Diet in Renal Disease”⁵ e o Cockcroft-Gault⁶.

Como causas de DRC que ainda predominam no nosso meio estão a hipertensão arterial sistêmica e o Diabetes Mellitus, e é considerada como doença grave associada com diversas co-morbidades e alterações metabólicas podendo levar o paciente à morte⁵. Além disso, requer grandes gastos da parte do governo, na maioria das vezes relacionada ao tratamento de pacientes nos estágios mais avançados da doença⁶. As opções de tratamento nesta fase da doença são a terapia substitutiva renal, hemodiálise ou diálise peritoneal e para casos selecionados, o transplante renal⁷.

Sabe-se que estas toxinas urêmicas compreendem mais de 130 compostos separados em três categorias de acordo com as propriedades físicas como peso molecular, solubilidade, capacidade de ligação à proteínas^{8,9}. Alternativamente, as toxinas urêmicas podem ser classificadas de acordo com o local de origem, como as produzidas por metabolismo endógeno, as produzidas por metabolismo microbiano e aquelas ingeridas por

fontes exógenas¹⁰. A uremia em pacientes com DRC é a consequência primária da inadequada remoção e subsequente acúmulo de produtos normalmente metabolizados e excretados pelos rins, associada a efeitos negativos em quase todos os órgãos e sistemas^{11,12,13}.

As toxinas urêmicas são as responsáveis pela progressão da DRC e perda da função renal residual, porém nenhum momento específico demarca o início da uremia em pacientes com perda progressiva da função renal¹⁴. A uréia é quantitativamente o soluto mais importante excretado pelo rim e foi o primeiro soluto orgânico detectado no sangue de pacientes com falência renal, no entanto atualmente considera-se que a uréia apenas constitui a menor parte da doença urêmica¹⁵.

Em estudo realizado em cães, foi observado que lesões extra-renais, causadas pela uremia ocorrem de forma inconstante e imprevisível, sendo mais evidentes e acentuadas nos sistemas gastrointestinais, cardiovascular, respiratório e esquelético¹⁶.

A alta concentração de toxinas urêmicas circulantes pode desencadear resposta inflamatória sistêmica e vascular e desta forma, induzir disfunção endotelial. A ação da uremia em pacientes em hemodiálise pode estar associada a danos vasculares intensos¹⁷. A DRC nestes pacientes está associada à menor atividade fagocitária dos polimorfonucleares, sugerindo a presença de um fator no soro urêmico, responsável por esta diminuição¹⁸.

Outros efeitos adversos da uremia foram verificados na cicatrização tecidual, pela baixa proliferação de fibroblastos, baixos níveis teciduais de hidroxiprolina e colágeno¹⁹. Também está associada ao retardo do processo inflamatório da cicatrização, menor formação de colágeno e de tecido conectivo celular subcutâneo em ratos²⁰ e também a inibição da proliferação de fibroblastos, células endoteliais e tecido de granulação²¹.

O mecanismo pelo qual a uremia diminui a proliferação de fibroblastos, no processo cicatricial, foi definido como uma forma de microinflamação associada a acidose e estresse oxidativo, sendo este evidenciado pelos elevados níveis séricos de mieloperoxidase, produtos avançados de oxidação e lipoxidação protéica²². A maioria dos estudos que abordam distúrbios de cicatrização em pacientes com DRC têm múltiplos fatores

morbígenos como úlceras diabéticas periféricas associadas à doença arterial oclusiva com isquemia e neuropatia senso-motora^{23,24}.

A maior causa de mortalidade em pacientes com DRC é de origem cardiovascular, atingindo um índice anual em torno de, aproximadamente, 9%, ou seja, de 10 a 20 vezes maior se comparado à população geral, mesmo quando o ajuste é feito para outros fatores de risco, como idade, raça, sexo e presença de diabetes mellitus (DM)²⁵.

A disfunção renal é associada ao aumento da resposta inflamatória²⁶ gerada pelo aumento do estresse oxidativo²⁷ comum tanto em insuficiência renal leve²⁸ como em estados avançados de DRC²⁹. Diferentes marcadores de inflamação têm sido evidenciados na DRC, entre estes a interleucina 6 (IL6), o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e a proteína C reativa (PCR), a qual tem sido, desde sua descoberta, amplamente utilizada como um marcador de inflamação³⁰ pela sua confiabilidade, baixo custo e disponibilidade³¹.

Pacientes com DRC apresentam níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, indicando assim uma associação entre DRC e síndrome metabólica. A interação fisiopatológica entre rim e coração leva a síndrome cardiorenal e subsequentes lesões vasculares, gerando assim danos cardíacos seguido de doença cardiovascular (DCV)³² que é a principal causa de morte prematura em indivíduos com DRC³³.

A disfunção endotelial é uma consequência comumente descrita em indivíduos em diferentes tipos e fases de doença renal, já que a inflamação, um evento proveniente da uremia, é catalisador na modulação de doenças vasculares, por converter o endotélio em uma superfície pró-inflamatória e pró-coagulante, tornando a vasculatura mais vulnerável aos efeitos de outros fatores de risco³¹. A partir da lesão iniciada pelo acúmulo das toxinas urêmicas o organismo inicia uma cascata de sinalização, com o aumento de diversas citocinas buscando promover a regeneração vascular endotelial³⁴.

A presença da uremia no paciente proporciona um ambiente repleto de ativadores e inibidores³⁵ das vias de sinalização para ativação e/ou produção de óxido nítrico (ON), tanto vascular quanto no próprio rim. Isso porque o ON-mensageiro é sintetizado fisiologicamente nos rins, exercendo importantes funções de homeostase e excreção renal³⁶. A disfunção endotelial é um evento comumente descrito na falência renal, seja ela aguda ou crônica,

assim como em estágio final de doença renal, principalmente em indivíduos submetidos a processo dialítico²⁷.

2.2 ANASTOMOSES INTESTINAIS

As operações gastrointestinais figuram entre os procedimentos cirúrgicos mais freqüentemente realizados na maioria dos hospitais. Infelizmente, apesar de toda a técnica cirúrgica empregada, do maior entendimento do processo de cicatrização do tubo gastrointestinal³⁷, do conhecimento do efeito de fatores locais e sistêmicos sobre este processo e na vigência das melhores condições pré-operatórias nas cirurgias eletivas, as deiscências das anastomoses intestinais são descritas em 3,4% a 12% das anastomoses realizadas. As fístulas intestinais ocorrem em cerca de 3% a 5% dos casos. Estas complicações estão associadas a altas taxas de morbi-mortalidade³⁸. A falha na cicatrização anastomótica figura entre complicações freqüentes e fístulas em 3,5% a 37% das cirurgias abdominais eletivas, com mortalidade variando entre 6,25 a 48%³⁷.

Existem vários estudos a respeito de condições que possam interferir na freqüência da deiscência de anastomoses colônicas, como fatores inerentes à técnica cirúrgica, condições locais, uso de agentes farmacológicos e condições gerais do paciente. Certas condições gerais podem prejudicar o processo de cicatrização, tais como hipertensão arterial, hipovolemia, isquemia intestinal, baixa tensão de oxigênio, neoplasia maligna avançada, desidratação, desnutrição e uremia entre outras³⁹.

Há situações em que é necessária a realização de cirurgia com anastomose de cólon em pacientes portadores de disfunção renal, prevalentemente em cirurgias de urgência quando não existe possibilidade de sua correção ou em casos de transplantes reno-pancreáticos⁴⁰.

O processo cicatricial na normalidade segue uma coordenada cascata de eventos celulares, moleculares e bioquímicos que interagem para que ocorra a reconstituição tecidual, identificados como fase de hemostasia, fase inflamatória, fase de proliferação celular e fase de remodelamento³⁷.

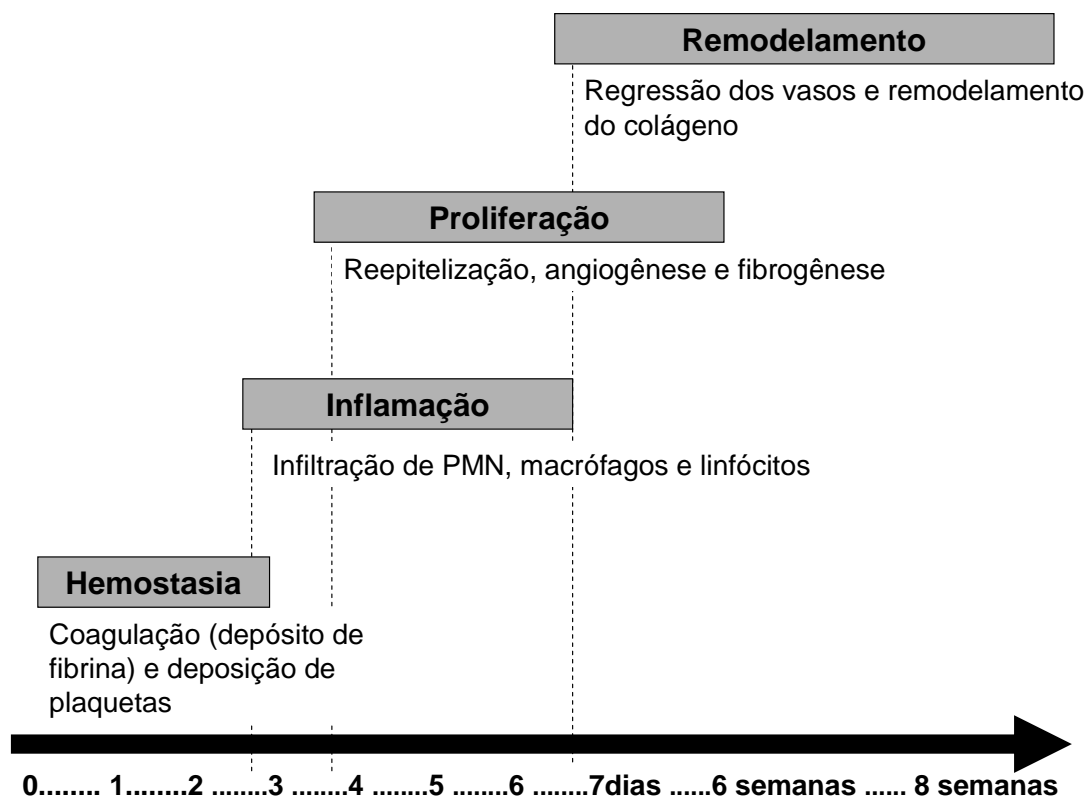


FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS FASES EVOLUTIVAS DA CICATRIZAÇÃO
FONTE: ADAPTADO DE GIAQUINTO e MOTA, 2005³⁸.

Para avaliar a cicatrização das anastomoses intestinais em estudos experimentais, são aplicados critérios clínicos, mecânicos, histológicos e bioquímicos. Os critérios clínicos consideram a evolução pós-operatória do animal e os achados intra-abdominais após sua morte, seja ela em meio à fase de experimentação, ou provocada no término desta para a coleta de dados. Esses critérios indicam o sucesso ou insucesso da anastomose e refletem a presença de deiscência anastomótica⁴¹. Neste contexto são avaliados o ganho ou perda de peso e a evolução pós-operatória em relação à ocorrência de óbitos. Na exploração da cavidade abdominal, os dados mais freqüentemente avaliados são a quantificação e qualificação de aderências pós-operatórias e possíveis complicações anastomóticas (deiscência, abscesso anastomótico e estenose)³⁷.

Quanto aos critérios mecânicos a avaliação da resistência das anastomoses intestinais por métodos mecânicos tem sido realizada mais freqüentemente por duas técnicas, a avaliação da pressão de explosão “*Bursting pressure*” e a avaliação da tensão de explosão “*Bursting wall tension*”. A primeira é a medida da pressão intraluminal no momento

da explosão e a última é a medida da tensão circular da anastomose no momento da explosão⁴².

Os parâmetros histológicos permitem avaliar processo de cicatrização conforme critérios estruturais da matriz cicatricial. São empregados para essa finalidade: a avaliação da formação de tecido de granulação, síntese e maturação de colágeno, a angiogênese, a viabilidade celular, a infiltração de células de interesse ao processo cicatricial como os miofibroblastos.

Conforme descrito anteriormente o processo cicatricial é organizado em fases que se interpõem e na fase proliferativa da cicatrização, que segue a fase inflamatória, o aumento da permeabilidade vascular decorrente da inflamação e ação de prostaglandinas, leva a formação de um infiltrado celular, rico em macrófagos e fibroblastos. A partir do quarto dia do início do processo cicatricial o ambiente começa a ser invadido por novo estroma, gerando o tecido de granulação. Esse tecido consiste na combinação de elementos celulares, incluindo os fibroblastos, células inflamatórias e destaca-se a angiogênese com a formação de novos capilares, diminuindo perda de líquidos pela ferida e criando uma barreira contra infecções. Simultaneamente os fibroblastos iniciam a síntese de proteínas como o colágeno. Nesta etapa, os mediadores envolvidos são as interleucinas 1 e 6 (IL1 e IL6), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o fator beta de transformação do crescimento celular (TGF- β)⁴³.

Para a avaliação da formação do tecido de granulação emprega-se a coloração com hematoxilina-eosina (HE) de Harris e as leituras microscópicas consideram como critérios a intensidade da reação inflamatória, a formação de crosta fibrinoleucocitária pela observação de depósitos de fibrina e células sanguíneas na superfície da ferida, a proliferação angiofibroblástica, através da avaliação morfológica de neovascularização (angiogênese), a proliferação de fibroblastos e da reepitelização das bordas^{43,44}.

O colágeno é uma proteína estrutural encontrada em grandes quantidades em todos os animais. Nos seres humanos, representa um terço do total de proteínas, e três quartos do peso seco da pele é composto por ele. É o componente mais abundante na matriz

extracelular. Existem descritos vinte e oito tipos diferentes de colágenos, que são compostos por pelo menos 46 diferentes cadeias polipeptídicas identificadas nos vertebrados⁴⁵.

O colágeno é organizado em fibras insolúveis de grande resistência, compostas por três cadeias polipeptídicas, torcidas sobre si mesmas, formando uma tripla hélice. Cada uma delas possui uma seqüência repetida de três resíduos de amino ácidos que são a prolina, a hidroxiprolina e a glicina. O que mantém as fitas unidas são pontes de hidrogênio entre os resíduos de prolina e hidroxiprolina, que estabilizam essas cadeias, sendo que a hidroxiprolina compõe 14% do colágeno⁴⁶.

Sabendo-se disso, quantificar a hidroxiprolina tecidual permite a análise da evolução cicatricial, já que a hidroxiprolina não deriva da ingestão alimentar, mas da hidrólise da prolina e o colágeno é a única proteína do organismo animal que contém hidroxiprolina em quantidade significativa^{47,48}.

Dentre as técnicas histológicas atuais de coloração para o colágeno, a técnica que utiliza o corante sirius red F3BA se destaca pela maior seletividade para tecido conjuntivo e por ser mais adequado para a leitura em microscopia de luz polarizada. A adição de ácido pícrico previne a coloração de estruturas que não contenham colágeno⁴⁹.

Na coloração "picrosirius red" (PCS), a reação do corante com as fibras de colágeno determina disposição paralela das moléculas do corante em relação às fibras colágenas, o que aumenta a sua birrefringência. Esta birrefringência apresenta diferentes padrões de cores e tonalidades que se correlaciona com o tipo de colágeno. Isto permite a diferenciação das fibras colágenas em tipo I e tipo III⁵⁰.

Para a avaliação da densidade vascular em um tecido tem sido amplamente utilizado como indicadora a marcação imunoistoquímica com o anticorpo monoclonal contra o CD34, que é uma glicoproteína transmembranar, de cadeia única com peso molecular de 116 kDa⁵¹. É expresso em células imaturas progenitoras, linfóides e mielóides do tecido hematopoético, células endoteliais capilares, fibroblastos embrionários e raras células gliais do sistema nervoso e sua função é desconhecida. Tem maior capacidade de destacar vasos sanguíneos e praticamente não detecta os linfáticos, sendo expresso tanto em pequenos como em grandes vasos, com a mesma intensidade em tecidos normais e neoplásicos⁵².

Porém, outros anticorpos marcadores podem ser usados para identificação da microvascularização, como o anti-CD31, anti-F VIII e anti-CD105⁵³.

Outra forma histológica de avaliação da cicatrização é a quantificação do antígeno de proliferação celular (PCNA), como indicador de proliferação e viabilidade celular na cicatriz. A proliferação celular pode ser definida como o aumento do número de células resultante da complementação do ciclo celular. Este engloba uma cascata de eventos, processados de maneira ordenada, assegurando a duplicação fiel dos componentes celulares em uma seqüência lógica e a divisão destes componentes em duas células filhas⁵⁴.

A concentração do PCNA é variável durante as etapas do ciclo celular, sendo maior na fase G1 tardia, com pico na fase G1/S, estando praticamente ausente nas fases G2 e M e pode não ser específico da fase S ou, necessariamente, estar relacionado com o ciclo celular, podendo estar associado ao reparo do DNA ou ser expresso por influência de fatores de crescimento em células que não estejam no ciclo celular⁵⁵.

O PCNA é uma proteína nuclear de 36kd, co-fator da polimerase delta, com importante papel na replicação do DNA é considerado um agente intimamente associado à replicação celular, sua distribuição no ciclo celular aumenta a partir da fase G1, atingindo o pico máximo em S, diminuindo a partir da fase G2, e passando a exibir níveis tão baixos na fase M e em células quiescentes, que não é identificado por métodos imunohistoquímicos⁵⁶.

A quantificação de miofibroblastos é realizada por meio de imunoistoquímica, utilizando-se o anticorpo anti- α -actina muscular lisa (actina α -sm). Estudos comprovam a importância dos miofibroblastos no processo cicatricial e demonstraram que existe relação direta entre o nível de actina α -sm e a capacidade contrátil dos miofibroblastos⁵⁷. Estudos experimentais realizados recentemente demonstraram correlação direta entre a força máxima de tração, considerado padrão-ouro, e a quantificação de vasos e miofibroblastos na avaliação da cicatrização dos tecidos^{37,53}.

2.3 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA INDUÇÃO DE DISFUNÇÃO RENAL

Os modelos animais podem ser utilizados em todos os campos da pesquisa biológica desde que os mecanismos patológicos sejam suficientemente similares àqueles de uma doença humana, atuando assim como modelo. Devem obrigatoriamente permitir a avaliação de fenômenos biológicos naturais, induzidos ou comportamentais, que possam ser comparados aos fenômenos humanos em questão. Na ciência médica, os modelos experimentais aceleraram os conhecimentos da fisiologia, da etiopatogenia das doenças, da ação de medicamentos e dos efeitos das intervenções cirúrgicas⁵⁸. Modelos animais de disfunção renal aproximam-se da condição humana e são importantes para a compreensão da doença e para desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas^{59,60}.

Para indução de disfunção renal, foram pioneiras as publicações de Tuffier em 1889 e Bradford em 1892 que descreveram experimentos em cães nos quais eram retirados fragmentos de um dos rins e a ablação do rim contralateral. A partir destes estudos, foram então publicados outros modelos para estudar a doença renal através da redução cirúrgica da massa renal a 2/3 ou 3/4 em diferentes espécies de animais. Posteriormente, em 1932 Chanutin e colaboradores foram os que desenvolveram a nefrectomia 5/6 em ratos, tendo como resultados o desenvolvimento progressivo de poliúria, albuminúria, retenção de escóreas nitrogenadas, hipertrofia renal do rim remanescente, hipertensão arterial e hipertrofia cardíaca⁶¹.

A nefrectomia parcial vem sendo desde então amplamente reproduzida, sendo o principal modelo animal para induzir insuficiência renal progressiva por reduzir o número de néfrons. A grande marca destes estudos é o desenvolvimento de uremia e insuficiência renal crônica e suas complicações similarmente com as condições humanas⁶².

A tática mais frequentemente empregada é executada em dois tempos, a qual remove primeiramente 2/3 de um dos rins, seguida por nefrectomia total do rim contralateral após intervalo de tempo que varia conforme os estudos avaliados, sendo mais comumente após uma ou duas semanas⁶³.

As formas de abordagem desta técnica possuem variantes, desde ligadura dos ramos arteriais causando infarto do tecido renal ou ablação dos polos renais assim como o

uso das duas técnicas associadas. A ligadura não é factível em camundongos devido o tamanho do ramo arterial o qual dificulta a técnica^{64,65}.

Esses procedimentos, independente da técnica utilizada causam grave prejuízo da função renal devido a diminuição da quantidade de néfrons, resultando em proteinúria, hipertensão, e diminuição da taxa de filtração glomerular e conseqüentemente da função renal. Histologicamente, ocorre severa glomeruloesclerose e dano tubulointersticial⁶².

Um modelo que não se baseia em nefrectomia e que também é utilizado para demonstrar alterações no tecido renal é feito através da indução de isquemia parcial, com estenose de 80% do tronco arterial de um dos rins causa atrofia tubular e infiltrado intersticial⁶⁶.

A reprodução de insuficiência renal crônica também foi obtida através de crioterapia dos polos renais por diferentes períodos de tempo (20, 30 e 60 min) e posterior nefrectomia contralateral, como forma alternativa para diminuir o risco de sangramento como na redução cirúrgica da massa de nefróns⁶³. A eletrocoagulação dos polos renais associado a nefrectomia contralateral também foi descrita como modelo experimental de insuficiência renal crônica, com o intuito de evitar grandes perdas volêmicas permitindo seguimento por longo período de tempo⁶⁷.

Os modelos que utilizam roedores ainda permanecem como os que mais se aproximam da doença em humanos e também pela facilidade de acesso a estes animais em quantidade e qualidade adequadas bem como pela facilidade de alojamentos em grandes quantidades. Todavia, a sobrevivência dos animais é muito reduzida face às agressões cirúrgicas inerentes ao próprio modelo de nefrectomia 5/6⁵⁹.

Estudo utilizando outros animais como o coelho, pode oferecer melhor perspectiva de massa renal residual e que visam causar IRC, em face de seu tamanho, volemia e aspectos morfofuncionais que se assemelham ao *anima nobile*⁶⁸. A dificuldade em manter os ratos por período longo em observação após a nefrectomia, considerando a perda volêmica e buscando alternativas para desenvolver modelos animais de insuficiência renal em outras espécies, foi descrita a indução de disfunção renal provocada por isquemia e reperusão de apenas um rim, através do clampeamento do pedículo renal⁶⁹. A isquemia do

tecido renal por ligadura dos ramos arteriais causando diminuição na taxa de filtração glomerular também já foi objeto de estudo em cães⁷⁰ e também através da obstrução ureteral bilateral⁷¹.

Independente da técnica, estes modelos devem reproduzir a diminuição da taxa de filtração glomerular com a diminuição do volume de massa renal, representando os diferentes estágios da evolução progressiva da insuficiência renal e suas conseqüências⁶⁵.

3 Método

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este projeto foi aprovado em 21 de junho de 2010 pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais do Hospital e Maternidade Angelina Caron, conforme parecer nº 08/10 CEP/HAC (anexo 1).

Utilizaram-se 20 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar, com idades entre 143 a 152 dias e pesos de $249,2 \pm 13,80$ gramas, provenientes do biotério da Universidade Federal do Paraná, mantidos durante o experimento nas dependências da Coordenação de Ensino e Pesquisa do Hospital e Maternidade Angelina Caron. Após o recebimento, os animais foram submetidos à triagem através de inspeção da pelagem para investigação de ectoparasitas, sinais de diarreia e lesões cutâneas. Foram mantidos em sala específica para manutenção de animais de laboratório a qual dispõem de exaustão forçada de ar, temperatura controlada entre 19 a 23°C e ciclos de iluminação automaticamente regulados a cada 12 horas.

Os ratos foram separados em dois grupos com pesos estatisticamente similares (tabela 1) e distribuídos em grupos de quatro ratos em caixas de polipropileno com sepilho, as quais eram substituídas a cada 24 horas. Os ratos recebiam ração específica para a espécie (Nuvilab - Quimitia S.A.®) e água *ad libitum*. Permaneceram nessas condições por sete dias de observação que antecederam os experimentos e também durante os mesmos, que foram executados em um único ciclo de atividades.

TABELA 1 - DEMONSTRATIVO DA ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS DO ESTUDO E PROCEDIMENTOS REALIZADOS:

Grupos	n	Pesos / p	Procedimentos
Simulação	10	$249,2 \pm 18,8g$	D0: Incisão lombar esquerda. D7: Incisão lombar direita. D14: Laparotomia mediana, colotomia e colorrafia. D21: Encerramento do experimento e coleta de amostras.
Uremia	10	$248,8 \pm 7,1g$	D0: Incisão lombar esquerda e nefrectomia parcial. D7: Incisão lombar direita e nefrectomia total direita. D14: Laparotomia mediana, colotomia e colorrafia. D21: Encerramento do experimento e coleta de amostras.

Legenda: n= número de ratos; p= significância estatística; D= dia.

3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

3.2.1 AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO

Praticaram-se os procedimentos cirúrgicos em laboratório exclusivo para cirurgias experimentais, devidamente sanitizado e climatizados sendo os instrumentos, os acessórios e os procedimentos executados em condições de esterilidade.

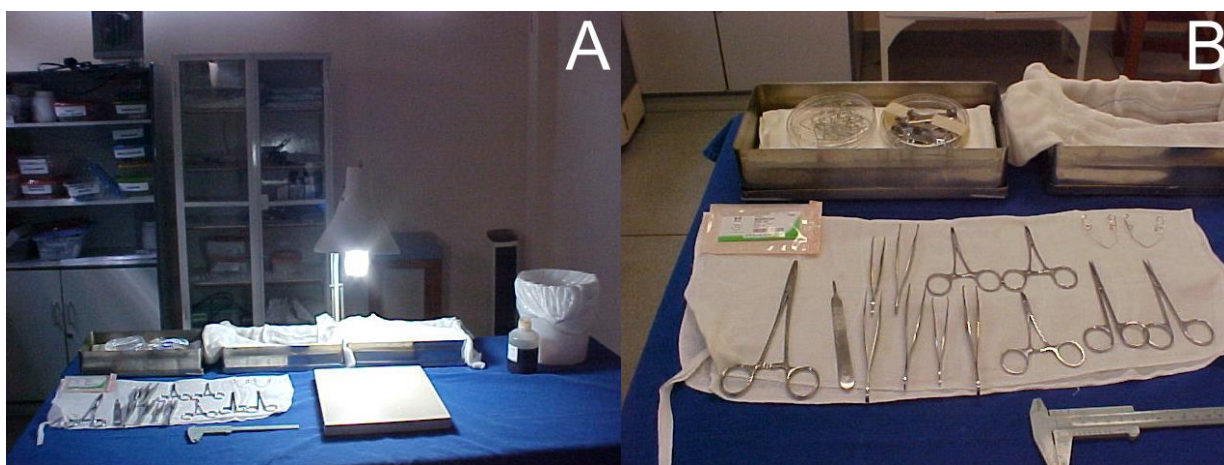


Figura 2 - Ambiente cirúrgico demonstrando no detalhe “A” montagem da mesa cirúrgica e no “B” o instrumental cirúrgico. Referência: Autor

3.2.2 ANESTESIA

A anestesia foi administrada em dois tempos, primeiramente os ratos foram submetidos à sedação por inalação de Isoflurano (Isothane-Baxter[®]) em circuito fechado, pesados em balança analítica (Coleman[®] modelo SK280251) e os pesos registrados em protocolo específico (apêndice 1 – tabela 12).

A seguir, a partir dos pesos individuais eram calculadas as doses dos anestésicos cloridrato de cetamina (Ketamin-Cristalia[®]) na dose de 100mg/kg, associada a 10mg/kg de cloridrato de xilasina (Xilazin-Syntec[®])⁷².

Foram utilizadas duas seringas descartáveis de 1ml (BD-Plastiplak®) e agulhas hipodérmicas (BD-Plastiplak®) para cada rato, sendo cada um dos anestésicos inoculados separados por via intra-muscular em ambas as panturrilhas posteriores (figura 3).

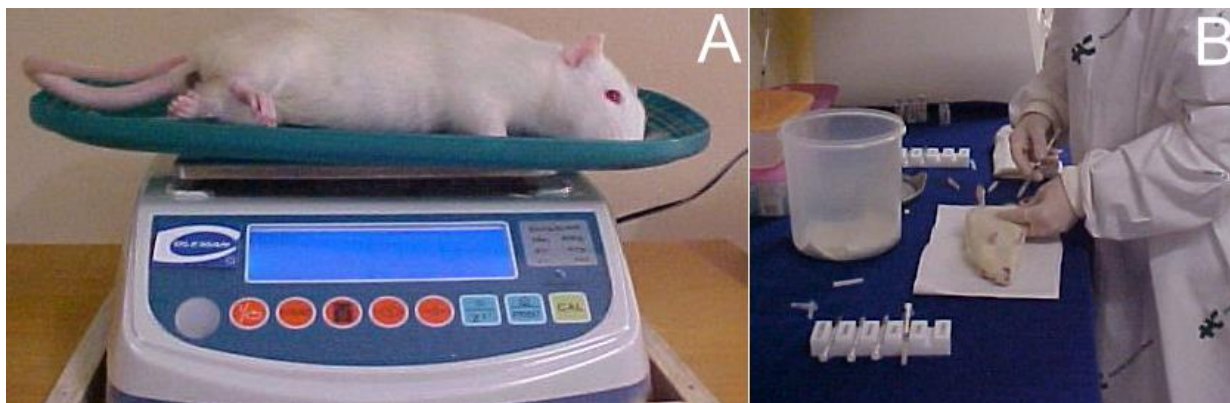


Figura 3 - Procedimento anestésico. No detalhe “A” a pesagem em balança eletrônica do rato sedado e no detalhe “B” a inoculação dos anestésicos. Referência: Autor

3.2.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

3.2.3.1 Nefrectomia 5/6

Para a indução da uremia nos ratos do grupo uremia empregou-se a metodologia cirúrgica denominada de nefrectomia 5/6, descrita por Viana e colaboradores (1981)⁷³ a qual consiste nas seguintes etapas: nefrectomia parcial, na qual são ressecados ambos os polos renais, e sete dias após procedida a nefrectomia total do rim contralateral.

3.2.3.1.1 Nefrectomia parcial

Conforme demonstrado na figura 4, para início dos procedimentos cirúrgicos colocavam-se campos cirúrgicos fenestrados esterilizados. No D0, no grupo uremia procedia-se a nefrectomia parcial, por meio de incisão lombar esquerda de cerca de três centímetros de extensão acessava-se a cavidade peritoneal para a exposição do rim esquerdo que era tracionado para fora da cavidade, descapsulado preservando-se a glândula adrenal e procedida a ablação dos polos renais com eletrocoagulador de plasma

de Argônio (Argon 4 - WEN®) e ponteira eletro-cirúrgica multifuncional (Griff código 07994 - WEN®), correspondente a aproximadamente 2/3 de massa renal, preservando o hilo, a vascularização e os ureteres.

No grupo simulação era feita somente incisão de cerca de quatro centímetros de extensão acessava-se a cavidade peritoneal e expunha-se o rim, que era tracionado para fora da cavidade. Em ambos os grupos, o fechamento da parede era feito por sutura contínua com fio monofilamentar de nylon 3.0 (Mononylon® 3.0, Ethicon) em dois planos: músculo-aponeurótico e cutâneo. No pós-operatório foi administrada dipirona por via oral, na dose de 20mg/kg e 10ml de solução salina isotônica por via subcutânea e mantidos sob aquecimento até a recuperação anestésica.

A seguir os ratos eram relocados em suas caixas, devidamente identificadas e receberam ração e água *ad libitum* até sétimo dia de evolução pós-cirúrgica.

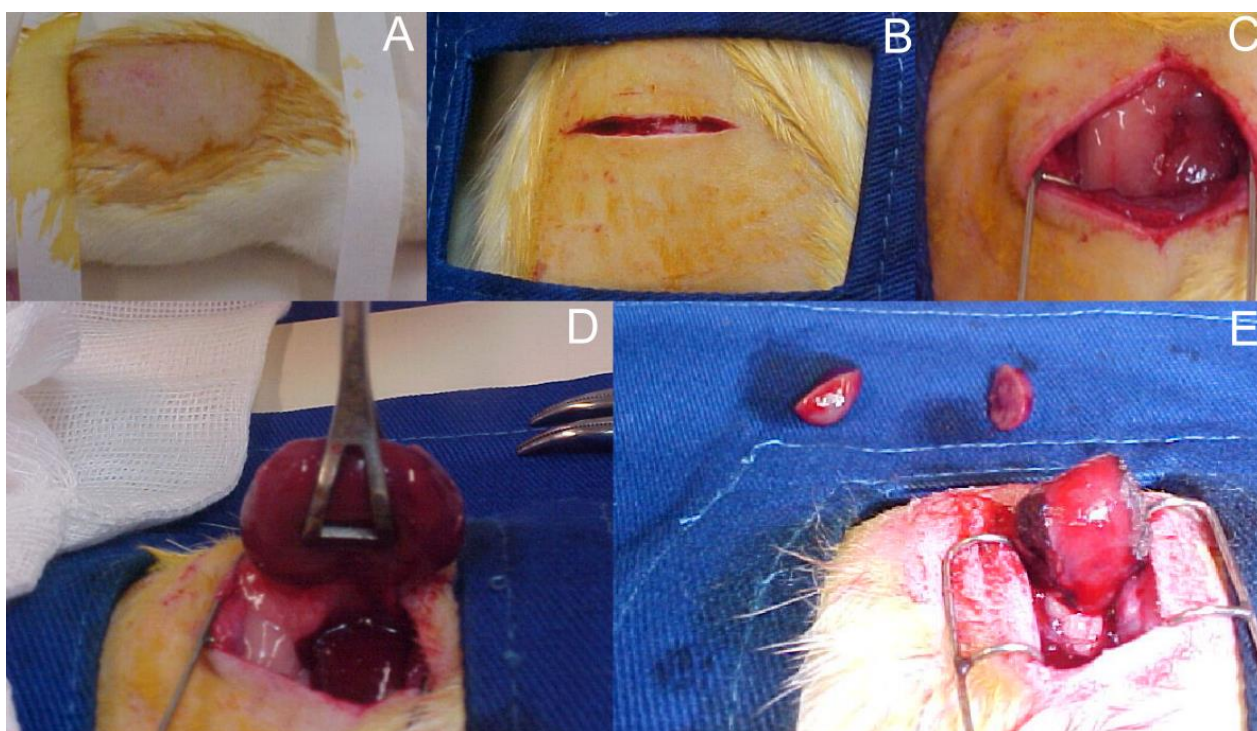


Figura 4 - Nefrectomia parcial esquerda. No detalhe “A” tricotomia, degermação e fixação do rato na prancha cirúrgica em posição lateral. No detalhe “B” a incisão lateral para o acesso da cavidade peritoneal. No detalhe “C” a localização intraperitoneal do rim. No detalhe “D” o tracionamento do rim para fora da cavidade peritoneal. No detalhe “E” a ablação dos polos renais. Referência: Autor

3.2.3.1.2 Nefrectomia total

Conforme demonstrado na figura 5, no D7, os ratos eram novamente pesados e submetidos à sedação e anestesia conforme anteriormente descrito, e era tricotomizado o flanco direito, degermação com álcool-iodado e colocavam-se campos cirúrgicos fenestrados esterilizados. Por meio de incisão lombar direita de cerca de quatro centímetros de extensão acessava-se a cavidade peritoneal para a exposição do rim direito que, no grupo simulação era tracionado para fora da cavidade. No grupo uremia, o rim era ressecado totalmente após ser descapsulado, preservando-se a glândula adrenal. O fechamento da parede em ambos os grupos e o atendimento pós-operatório foram feitos conforme anteriormente descrito e os ratos eram mantidos por uma semana⁵⁸.

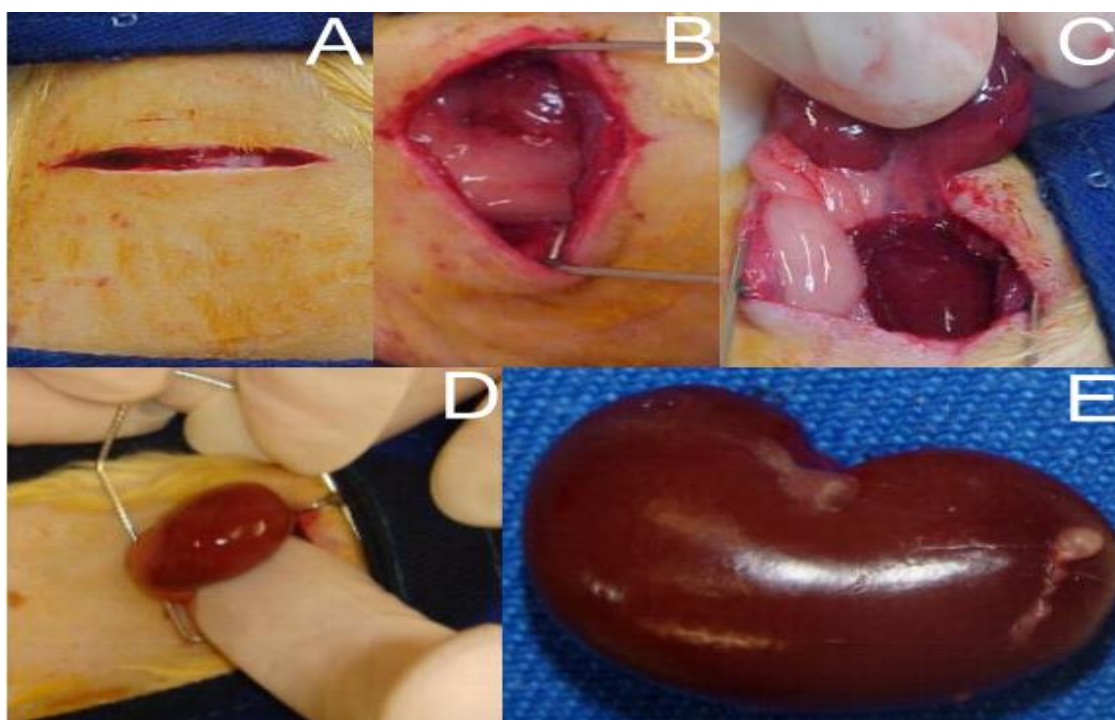


Figura 5 – Nefrectomia total direita. No detalhe “A” tricotomia, degermação e fixação do rato na prancha cirúrgica em posição lateral. No detalhe “B” a incisão lateral para o acesso da cavidade peritoneal. No detalhe “C” a localização intraperitoneal e tracionamento do rim. No detalhe “D” o tracionamento total do rim para fora da cavidade peritoneal. No detalhe “E” rim excisionado. Referência: Autor.

3.2.3.2 Colotomia e colorrafia

Conforme demonstrado na figura 6, no D14, em ambos os grupos uremia e simulação, após a confirmação da indução anestésica, procediam-se: tricotomia ampla do abdômen e degermação da área tricotomizada com álcool-iodado, colocação de campos cirúrgicos fenestrados esterilizados. Por meio de laparotomia mediana de cerca de quatro centímetros de extensão executava-se a abertura da pele e tecido muscular. Procedia a colotomia por secção completa do cólon, a aproximadamente cinco centímetros distais da válvula íleo-cecal, atentando sempre para a preservação dos vasos cólicos, conforme demonstrado no detalhe C da figura 6. A seguir, executava-se a reconstrução da secção colônica por anastomose término-terminal em plano único total, com oito pontos separados de fio monofilamentar de nylon 6.0 (Mononylon® 6.0, Ethicon). O fechamento da parede era feito por sutura contínua com fio monofilamentar de nylon 3.0 (Mononylon® 3.0, Ethicon) em dois planos: músculo-aponeurótico e cutâneo, conforme ilustrado na figura 6.

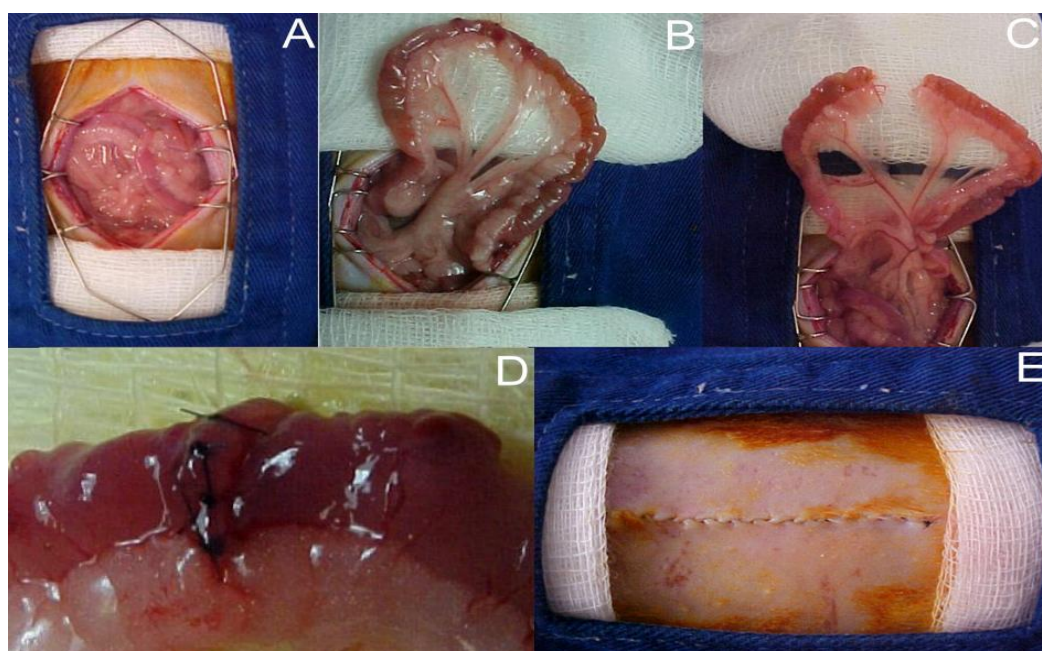


Figura 6 - Colotomia e colorrafia. Etapas do procedimento cirúrgico, no detalhe “A” a laparotomia mediana com afastadores nas bordas e exposição das alças intestinais, no detalhe “B” a localização do colon, no detalhe “C” a colotomia no detalhe “D” a colorrafia e no detalhe “E” a ferida cirúrgica suturada em dois planos: músculo-aponeurótico e cutâneo. Referência: autor

Após o fechamento, a ferida cirúrgica era limpa com solução fisiológica esterilizada (Eurofarma[®]) e novamente aplicado álcool-iodado. Administravam-se dipirona por via oral, na dose de 20mg/kg, 10ml de solução fisiológica por via subcutânea na região dorsal e os ratos eram mantidos sob aquecimento até a recuperação anestésica.

A seguir eram recolocados em caixas devidamente identificadas e durante as 24 horas seguintes eram mantidos com ração e água *ad libitum* até o sétimo dia de evolução pós-cirúrgica (D21).

3.3 COLETA DE AMOSTRAS

No sétimo dia de evolução pós-colotomia e colorrafia (D21), os ratos foram novamente pesados em balança analítica (Coleman[®] modelo SK280251) e submetidos à sedação por inalação de halotano (Tanohalo-Cristália[®]) em circuito fechado, anestesiados por injeção intramuscular com cloridrato de cetamina (Ketamin-Cristalia[®]) na dose de 100mg/kg.

A seguir foi procedida punção cardíaca com a coleta de 8 a 10 ml de sangue, volume este correspondente a uma punção exangüinativa e indutora de parada cárdio-respiratória (figura 7). As mostras de sangue eram imediatamente enviadas ao laboratório para dosagens séricas de uréia, creatinina e proteína C reativa.



Figura 7 - Demonstrativo da punção cardíaca para coleta de sangue e indução da parada cárdio-respiratória. Referência: autor

Ainda sob plano anestésico e com evidência de morte procedia-se à abertura ampla da cavidade abdominal e inventário da cavidade, localização do segmento colônico incisado e rafiado que era ressecado, estendido em papel filtro, lavado com solução tampão fosfatos (PBS) pH 7,4 e fixadas em formalina (figura 8).

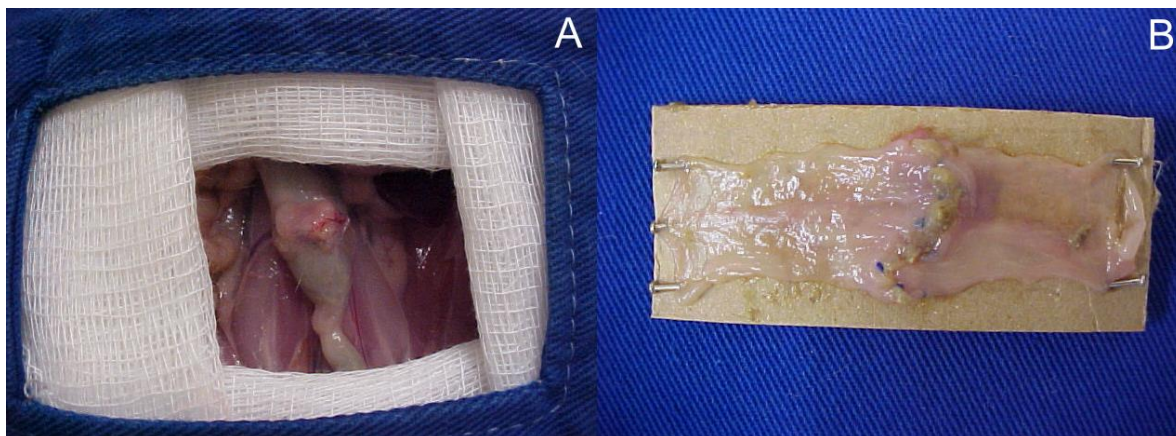


Figura 8 – Coleta de amostras de intestino. No detalhe “A” a cavidade abdominal aberta e localizada a cicatriz colônica, no detalhe “B” o segmento colônico rafiado ao sétimo dia de evolução cicatricial, ressecado e preparado para a fixação em formalina. Referência: autor

3.4. AVALIAÇÕES

Para a avaliação da evolução do modelo experimental do presente estudo serão utilizadas pesagens iniciais e periódicas nos dias D0, D2, D4, D7, D9, D12, D14, D17 e D19, bem como a observação dos animais avaliando a busca de alimento, água e deambulação como indicadores de normalidade em comparação entre os grupos (apêndice 1 - página 68). A evidência da indução do estado urêmico foi feita pelas dosagens séricas de uréia, creatinina e proteína C reativa ultrasensível ao final do período de estudo.

O processo de cicatrização da anastomose colônica foi avaliado através da análise de formação de tecido de granulação, formação de colágenos tipos I e III, densidade microvascular, proliferação celular e densidade de miofibroblastos.

3.4.1 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS

3.4.1.1 Dosagem de Uréia^{74,75}

Foi utilizado método automatizado com o equipamento Dimension – RXL - Siemens® com reativos específicos para dosagens de uréia, (apêndice 2 - página 69).

3.4.1.2 Dosagem de Creatinina⁷⁴

Foi utilizado método automatizado com o equipamento Dimension – RXL - Siemens® com reativos específicos para dosagens de creatinina, (apêndice 3 - página 70).

3.4.1.3 Dosagem de Proteína C Reativa Ultrassensível⁷⁴

Foi utilizado método automatizado com o equipamento Dimension – RXL - Siemens® com reativos específicos para dosagens de proteína c reativa ultrassensível, (apêndice 4 - página 71).

3.4.2 AVALIAÇÕES MICROSCÓPICAS

Todas as avaliações microscópicas foram executadas em triplicatas e os resultados individuais e a validação estão disponíveis nos apêndices. As amostras foram fixadas em formalina tamponada, os fios de sutura foram retirados e então as amostras submetidas ao processamento histológico automatizado seguindo as fases de desidratação, diafanização e emblocamento. Eram realizadas secções perpendiculares ao maior eixo da sutura, em triplicatas para cada uma das determinações histológicas, com micrótomo a 4 µm de espessura e fixados em lâminas para serem coradas conforme a avaliação a ser feita. A formação do tecido de granulação pela coloração de hematoxilina e eosina foi executada por microscopia⁴⁴. Empregou-se a técnica de histometria computadorizada para as avaliações de: colágenos tipo I e III pela coloração de picrosirius⁵⁰, densidade microvascular pela marcação com anticorpo monoclonal anti-CD34^{76,77}, viabilidade celular pela pesquisa do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)^{56,77} e a densidade de miofibroblastos com anticorpo monoclonal anti-actina α ^{57,77}.

3.4.2.1 Avaliação da formação de tecido de granulação⁴⁴

Esta avaliação foi procedida por três patologistas independentes, sendo os cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (HE) de Harris e considerando a intensidade da reação inflamatória cicatricial mediante avaliação da formação de crosta fibrinoleucocitária pela observação de depósitos de fibrina e células sanguíneas na superfície da ferida, proliferação angiofibroblástica, através da avaliação morfológica de neovascularização (angiogênese), da proliferação de fibroblastos e da reepitelização das bordas dedicando-se especial atenção ao avanço do epitélio em torno da ferida. A esses achados foram atribuídos graus 0, 1 e 2 para a ausência de reação, reação em grau discreto e moderado respectivamente conforme demonstrado na tabela 2.

Para a obtenção dos resultados, as leituras foram tabuladas e submetidas à validação pela aplicação de critérios estatísticos sendo que se os valores das diferentes leituras não apresentassem diferença significativa ($p > 0,05$) então esses resultados eram considerados válidos e era calculada a média das leituras daquele critério naquele grupo de ratos (tabela 7). Os valores individuais das três leituras para cada critério avaliado e a média de cada amostra estão disponibilizados na tabela 16 (apêndice 5 - página 72).

TABELA 2 - CRITÉRIOS ADOTADOS PARA AS AVALIAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DA FORMAÇÃO DE TECIDO DE GRANULAÇÃO PELA COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA E EOSINA CONFORME DESCRIÇÃO DE STEVENS & LOWE (2002)⁷⁴.

Critérios	Gradações		
	Ausente	Discreta	Moderada
Crosta fibrinoleucocitária	0	1	2
Reepitelização de bordas	0	1	2
Proliferação angiofibroblástica	0	1	2

3.4.2.2 Avaliação histométrica da porcentagem de colágeno dos tipos I e III⁵⁰

Os cortes histológicos foram submetidos à coloração de Picrosirius-Red-F3BA cuja metodologia detalhada está disponibilizada no apêndice 6. Eram analisados por meio de microscópio óptico em aumento de 400 vezes, utilizando-se fonte de luz polarizada. As

imagens eram captadas por câmera fotográfica e transmitidas a um monitor colorido e digitalizadas.

Realizou-se a análise histométrica das imagens mediante o aplicativo Image Pro-Plus versão 4.5 para Windows para a identificação do tipo de colágeno, baseado em cores. As cores vermelho, amarelo e laranja correspondiam a colágeno tipo I, enquanto que os tons de verde correspondem ao colágeno tipo III. O resultado foi expresso em área percentual de colágeno tipo I e tipo III em cada local do corte histológico.

Para a obtenção dos resultados, foram procedidas três leituras de campos diferentes em cada lâmina, as quais foram tabuladas e submetidas à validação pela aplicação de critérios estatísticos. Se os valores das três leituras não apresentassem diferença significativa ($p > 0,05$), então era calculada a média entre as mesmas. Os valores individuais das três leituras para cada critério avaliado e a média de cada amostra estão disponibilizados na tabela 17 (apêndice 6 - página 74).

3.4.2.3 Avaliação da densidade microvascular^{76,77}

Do material embocado em parafina foram obtidos cortes de 4 μ m de espessura estendidos em lâminas de vidro e submetidos aos anticorpos anti-CD34. A marcação dos cortes histológicos com anticorpo anti-CD34, permite a quantificação da densidade microvascular cicatricial cuja metodologia detalhada está disponibilizada no apêndice 7. O antígeno CD34 é uma proteína transmembrana encontrada na superfície de células endoteliais, que atua na ligação com receptores específicos de adesão celular. O CD34 é expresso difusamente nos microvasos cicatriciais e seus níveis de expressão podem se correlacionar à qualidade do processo cicatricial⁵¹.

Foi empregado o método da imunoperoxidase com o uso da técnica da estreptavidina-biotina, com controles positivo e negativo, seguindo a especificação do fabricante (Biotin anti-CD34 antibody clone QBEnd/10[®], Dako Corporation Glostrup Denmark) diluído a 1:350⁷⁷. As reações foram consideradas positivas, quando se detectou reação marrom, excluindo-se as prováveis áreas de coloração de fundo com padrão de

reação nuclear, sendo que qualquer célula endotelial ou grupo de células endoteliais de coloração marrom, independentemente do tamanho, claramente separada de outros elementos imunocorados, eram considerados um microvaso. Os resultados foram expressados em densidade tecidual de microvasos em uma área de 7.578,94 μ^2 , como média de três leituras em diferentes campos microscópicos. Os valores individuais das três leituras para cada critério avaliado e a média de cada amostra estão disponibilizados na tabela 18 (apêndice 7 - página 76).

3.4.2.4 Avaliação tecidual do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) ^{56,77}

Os cortes foram submetidos à reação imunoistoquímica pela técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase (Biotin anti-PCNA antibody clone PC10®, Dako) descrita no apêndice 8, para a pesquisa do antígeno nuclear da proliferação celular (PCNA)⁷⁷. Os cortes foram desparafinizados, hidratados e mergulhados em tampão fosfato. Após a recuperação antigênica com tampão citrato e bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 0,3%, os anticorpos primários monoclonais anti-PCNA foram aplicados sobre os cortes e incubados durante a noite. Em seguida, os cortes foram enxaguados em tampão fosfato e anticorpo secundário biotilado foi aplicado e incubado por 60 minutos. Após novo enxágüe, o complexo estreptavidina-peroxidase foi aplicado e a reação imunoistoquímica foi revelada com a aplicação de diaminobenzidina. Após contracoloração com hematoxilina, os cortes foram desidratados, diafanizados e cobertos com lamínulas de vidro com bálsamo do Canadá.

As reações foram consideradas positivas, quando se detectou reação marrom, excluindo-se as prováveis áreas de coloração de fundo com padrão de reação nuclear.

A marcação imunoistoquímica pelo antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) relata o ciclo protéico celular, que aumenta durante a fase G1, atinge o máximo na fase S e persiste com diminuição detectável na fase G2 do ciclo celular. Este método permite a avaliação da proliferação celular. Assim, quantificam-se os núcleos celulares da superfície epitelial e das criptas das glândulas, corados de azul, os quais representam células em repouso e os

corados de marrom, que identificam as células em proliferação da fase G1 tardia até a fase M da G2.

Com microscópio óptico e aumento de 1000 X (imersão), utilizando o programa de captura de imagens Image Pro-Plus versão 4.5 – Mídia Cybernetics, contaram-se os núcleos positivos e negativos de dois campos à direita e dois à esquerda da linha de anastomose e de duas criptas glandulares, à direita e à esquerda, nos cortes e obteve-se o percentual dos núcleos positivos e negativos, ou seja, em replicação e em repouso. Cada campo tinha uma área de 7.578,94 μm^2 . Os valores individuais das três leituras para cada critério avaliado e a média de cada amostra estão disponibilizados na tabela 19 (apêndice 8 - página 78).

3.4.2.5 Avaliação da densidade de miofibroblastos^{57,77}

Do material embocado em parafina foram obtidos cortes de 3 μm^2 de espessura estendidos em lâminas de vidro e submetidos aos anticorpos monoclonais anti- α -actina muscular lisa para a identificação de miofibroblastos conforme descrito no apêndice 6. Foi empregado o método da imunoperoxidase⁷⁷ com o uso da técnica da estreptavidina-biotina, com controles positivo e negativo, seguindo a especificação do fabricante (Biotin anti- α SMA antibody clone PJC10[®], Dako Corporation Glostrup Denmark) diluído a 1:400. As reações foram consideradas positivas, quando se detectou reação marrom, excluindo-se as prováveis áreas de coloração de fundo, com padrão de reação nuclear. A análise foi realizada por histometria computadorizada, conforme descrito no apêndice 6. Os resultados foram expressados em densidade tecidual de miofibroblastos em uma área de 7.812,26 μm^2 . Os valores individuais das três leituras para cada critério avaliado e a média de cada amostra estão disponibilizados na tabela 20 (apêndice 9 - página 80).

3.4.3 AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS

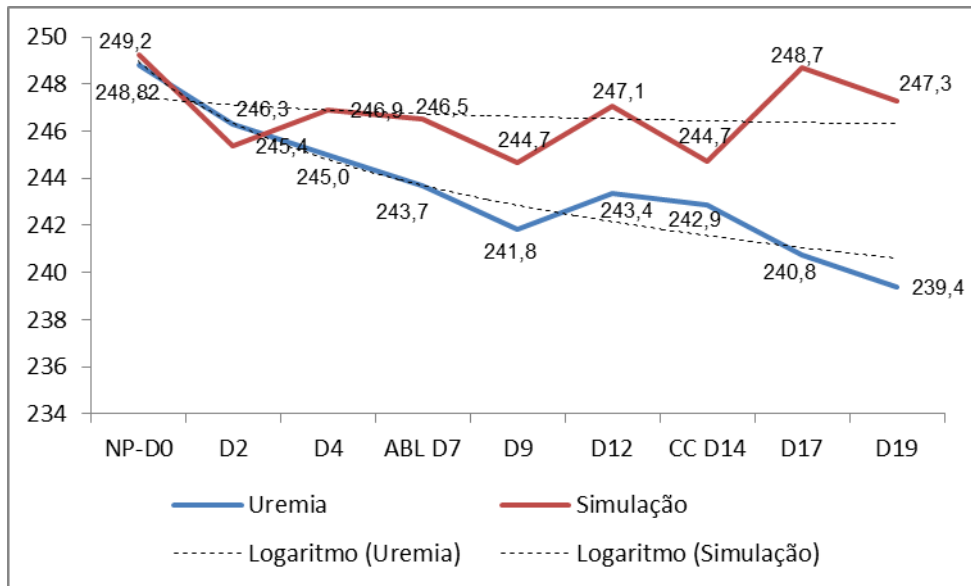
Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e empregaram-se os testes de ANOVA e T-Student com $p < 0,05$ para as comparações entre os grupos através do software *GraphPadInStat*.

4 Resultados

4.1. AVALIAÇÃO PONDERAL

Na tabela 12 do apêndice 1 estão demonstrados os resultados individuais das pesagens e das análises estatísticas. Conforme demonstrado no gráfico 1, os ratos do grupo uremia apresentaram maior perda de peso durante o experimento, porém sem diferenças estatísticas nos momentos das pesagens (tabela 12 – página 68).

GRÁFICO 1: DEMONSTRATIVO DA VARIAÇÃO PONDERAL ENTRE OS GRUPOS DE RATOS AVALIADOS



Legenda NP: Nefrectomia parcial, U: Grupo Uremia, S: Grupo Simulação, ABL: Ablação renal, CC: Colotomia e colorrafia.

TABELA 3: DEMONSTRATIVO DAS AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS (P) DAS AVALIAÇÕES PONDERAIS ENTRE OS GRUPOS DE RATOS AVALIADOS

Grupos	NP-D0	D2	D4	ABL D7	D9	D12	CC D14	D17	D19
Uremia	248,8± 7,1	246,3± 12,2	245,0± 10,1	243,7± 10,1	241,8± 10,3	243,4± 9,8	242,9± 7,5	240,8± 7,4	239,4± 8,7
Simulação	249,2± 18,8	245,4± 18,7	246,9± 18,6	246,5± 18,6	244,7± 18,4	247,1± 18,4	244,7± 18,2	248,7± 18,7	247,3± 18,0
p	0,9504	0,8964	0,7763	0,6731	0,6759	0,8271	0,7695	0,2277	0,2292

4.2 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS

4.2.1 DOSAGENS DE URÉIA

Na tabela 13 do apêndice 2 estão demonstrados as validações e os resultados individuais das dosagens de uréia. Conforme demonstrado no gráfico 2, os ratos do grupo uremia apresentaram uremia significativamente maior que o grupo simulação ($p < 0,0000$) (tabela 13 - página 69).

GRÁFICO 2: DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS ARITMÉTICAS DAS DOSAGENS DE URÉIA (mg/ml)

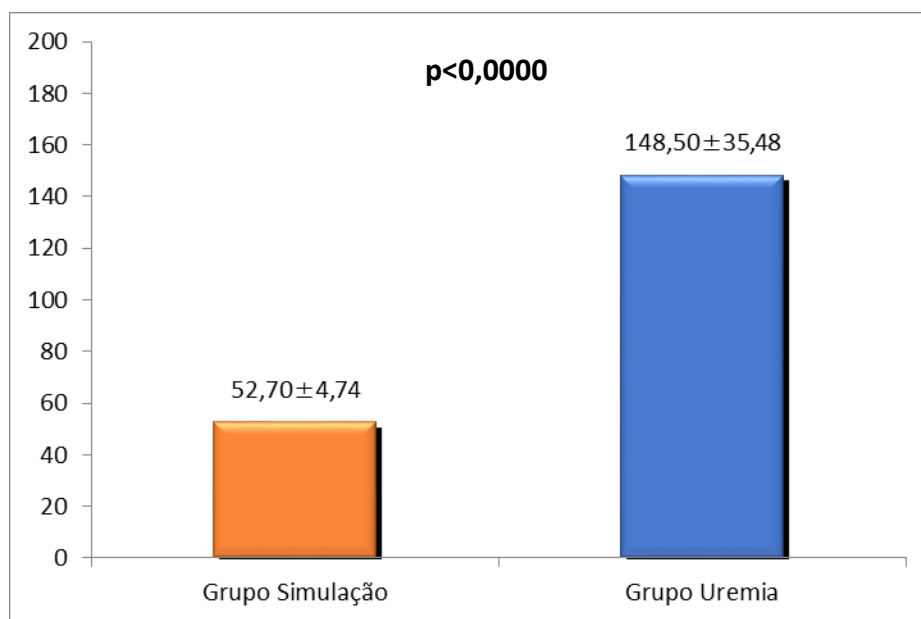


TABELA 4: DEMONSTRATIVO DAS AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS (P) DAS DOSAGENS DE URÉIA ENTRE OS GRUPOS DE RATOS AVALIADOS

Grupos	Grupo Simulação	Grupo Uremia
Média	52,70	148,50
Desvio Padrão	4,74	35,48
p	$p < 0,0000$	

4.2.2 DOSAGENS DE CREATININA

Na tabela 14 do apêndice 3 estão demonstrados as validações e os resultados individuais das dosagens de creatinina. Conforme demonstrado no gráfico 3, os ratos do grupo uremia apresentaram valores médios de creatinina maiores que o grupo simulação, contudo sem significância estatística ($p=0,0904$) (tabela 14 - página 70).

GRÁFICO 3: DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS ARITMÉTICAS DAS DOSAGENS DE CREATININA (mg/ml)

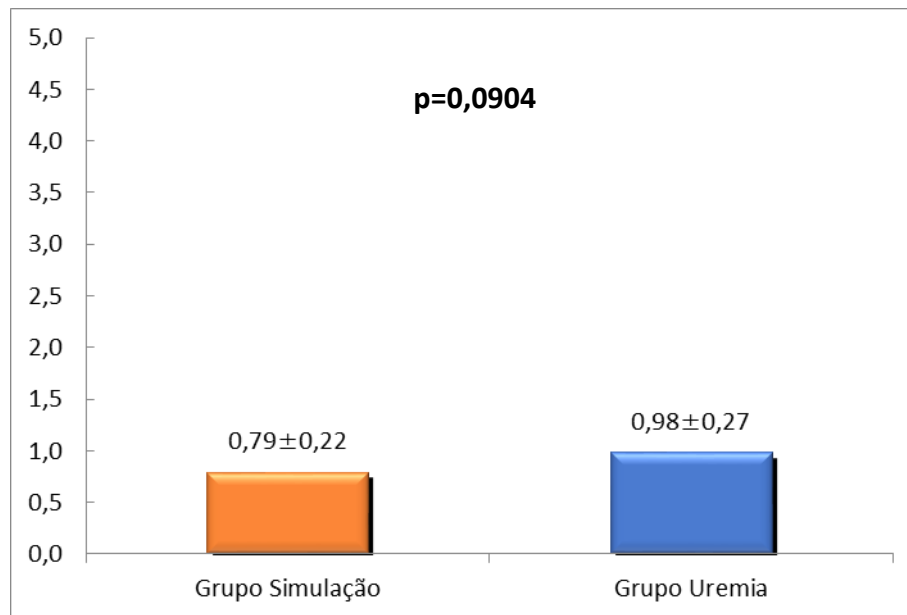


TABELA 5: DEMONSTRATIVO DAS AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS (P) DOSAGENS DE CREATININA ENTRE OS GRUPOS DE RATOS AVALIADOS

Grupos	Grupo Simulação	Grupo Uremia
Média	0,79	0,98
Desvio Padrão	0,22	0,27
p	0,0904	

4.2.3 DOSAGENS DE PROTEÍNA C REATIVA ULTRASSENSÍVEL

Na tabela 15 do apêndice 4 estão demonstrados as validações e os resultados individuais das dosagens de proteína C reativa ultrasensível. Conforme demonstrado no gráfico 4, os ratos do grupo uremia apresentaram valores de proteína C reativa ultrasensível significativamente maiores que o grupo simulação ($p=0,0142$) (tabela 15 - página 71).

GRÁFICO 4: DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS ARITMÉTICAS DAS DOSAGENS DE PROTEÍNA C REATIVA ULTRASSENSÍVEL (mg/ml).

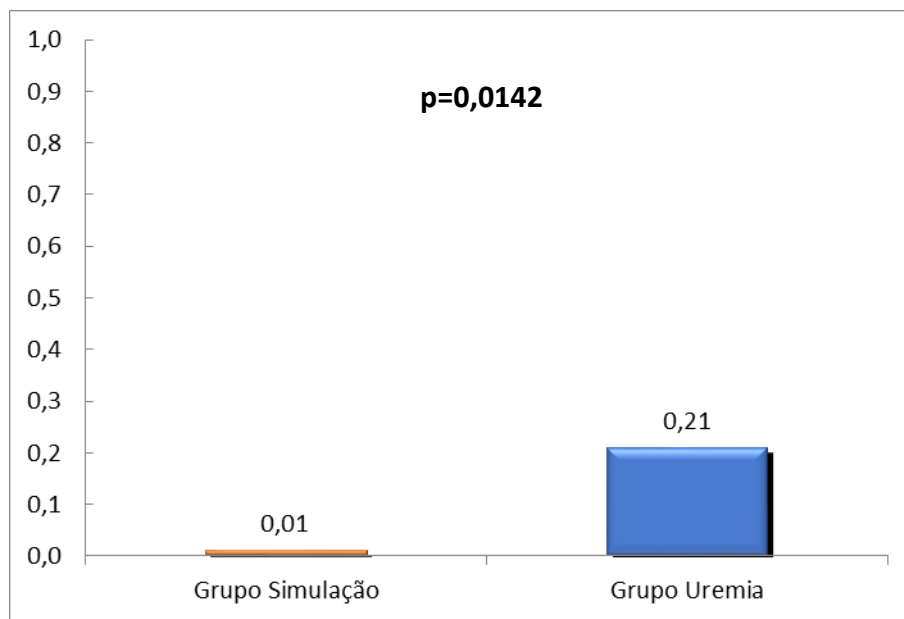


TABELA 6: DEMONSTRATIVO DAS AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS (P) DOSAGENS DE PROTEÍNA C REATIVA ULTRASSENSÍVEL ENTRE OS GRUPOS DE RATOS AVALIADOS

Grupos	Grupo Simulação	Grupo Uremia
Média	0,01	0,21
Desvio Padrão	0,00	0,23
p	0,0142	

4.3 AVALIAÇÕES MICROSCÓPICAS

4.3.1 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO TECIDO DE GRANULAÇÃO

Na tabela 16 do apêndice 5 estão demonstrados as validações e os resultados individuais das avaliações histopatológicas obtidas nos critérios empregados para a avaliação do tecido de granulação. Conforme demonstrado no gráfico 5, os ratos do grupo uremia apresentaram resultados significativamente piores que o grupo simulação quanto à reepitelização de bordas ($p=0,0196$) e quanto à proliferação angiofibroblástica ($p=0,0379$) (tabela 16 – página 72).

GRÁFICO 5: DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS ARITMÉTICAS DOS ESCORES ATRIBUÍDOS AOS CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DO TECIDO DE GRANULAÇÃO CICATRICIAL INTESTINAL.

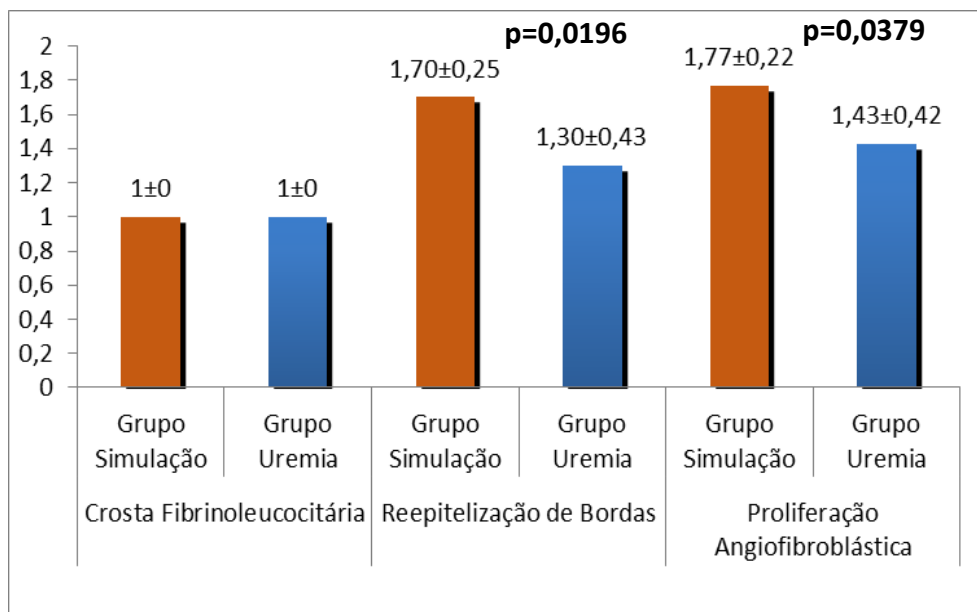


TABELA 7: DEMONSTRATIVO DAS AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS (P) DOS CRITÉRIOS EMPREGADOS NAS AVALIAÇÕES DA FORMAÇÃO DO TECIDO DE GRANULAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DE RATOS AVALIADOS

Grupos	Crosta Fibrinoleucocitária		Reepitelização de Bordas		Proliferação Angiofibroblástica	
	Grupo Simulação	Grupo Uremia	Grupo Simulação	Grupo Uremia	Grupo Simulação	Grupo Uremia
Média	1	1	1,70	1,30	1,77	1,43
Desvio Padrão	0	0	0,25	0,43	0,22	0,22
p	não se aplica		0,0196		0,0379	

4.3.2 AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA DA PORCENTAGEM DE COLÁGENO DOS TIPOS I E III

Na tabela 17 do apêndice 6 estão demonstrados as validações e os resultados individuais das avaliações histométricas obtidas nas quantificações percentuais dos colágenos I e III. Conforme demonstrado no gráfico 6, os ratos do grupo uremia apresentaram resultados significativamente piores que o grupo simulação quanto à média das porcentagens de colágeno I ($p=0,0009$) e quanto ao colágeno III ($p=0,016$) (tabela 17 - página 74).

GRÁFICO 6: DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS ARITMÉTICAS DAS PORCENTAGENS DE COLÁGENOS TIPOS I E III NO TECIDO CICATRICIAL INTESTINAL.

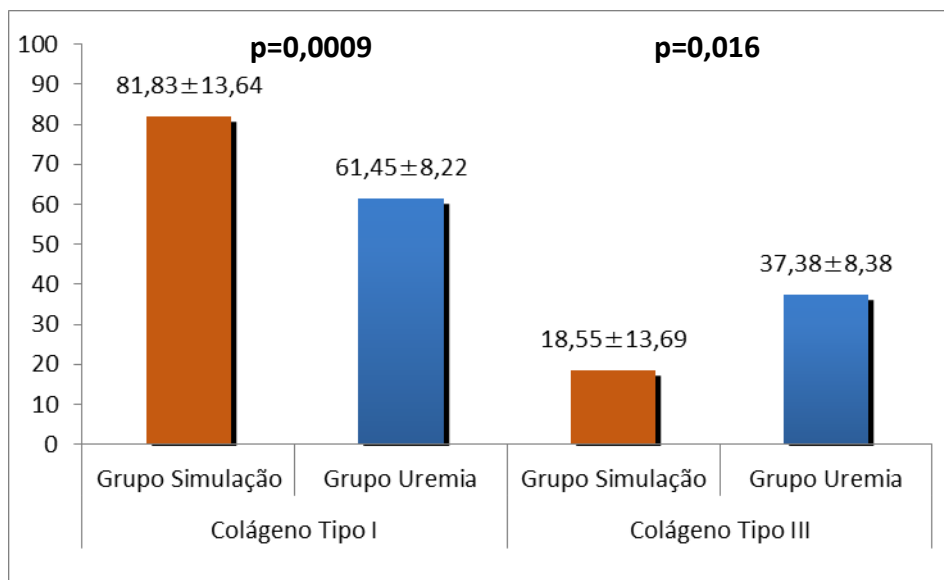


TABELA 8: DEMONSTRATIVO DAS AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS (P) DAS PORCENTAGENS DE COLÁGENOS TIPOS I E III ENTRE OS GRUPOS DE RATOS AVALIADOS

Grupos	Colágeno Tipo I		Colágeno Tipo III	
	Grupo Simulação	Grupo Uremia	Grupo Simulação	Grupo Uremia
Média	81,83	61,45	18,55	37,38
Desvio Padrão	13,64	8,22	13,69	8,38
p	0,0009		0,016	

4.3.3 AVALIAÇÃO DA DENSIDADE MICROVASCULAR

Na tabela 18 do apêndice 7 estão demonstrados as validações e os resultados individuais das avaliações histométricas obtidas nas quantificações da densidade microvascular. Conforme demonstrado no gráfico 7, os ratos do grupo uremia apresentaram resultados significativamente piores que o grupo simulação ($p=0,0074$) (tabela 18 - página 76).

GRÁFICO 7: DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS ARITMÉTICAS DAS QUANTIFICAÇÕES DAS DENSIDADES MICROVASCULARES NO TECIDO CICATRICIAL INTESTINAL.

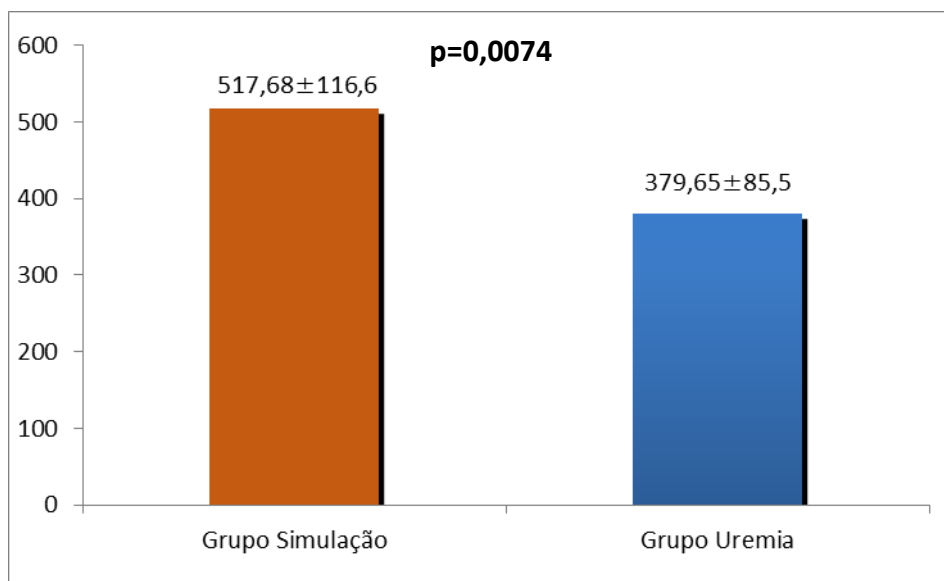


TABELA 9: DEMONSTRATIVO DAS QUANTIFICAÇÕES DAS DENSIDADES MICROVASCULARES NO TECIDO CICATRICIAL INTESTINAL ENTRE OS GRUPOS DE RATOS AVALIADOS.

Grupos	Grupo Simulação	Grupo Uremia
Média	517,68	379,65
Desvio Padrão	116,62	85,52
p	0,0074	

4.3.4 AVALIAÇÃO TECIDUAL DO ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA)

Na tabela 19 do apêndice 8 estão demonstrados as validações e os resultados individuais das avaliações histométricas obtidas nas quantificações do antígeno nuclear de proliferação celular. Conforme demonstrado no gráfico 8, os ratos do grupo uremia apresentaram resultados significativamente piores que o grupo simulação ($p < 0,0000$) (tabela 19 - página 78).

GRÁFICO 8: DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS ARITMÉTICAS DAS QUANTIFICAÇÕES DO ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR NO TECIDO CICATRICIAL INTESTINAL.

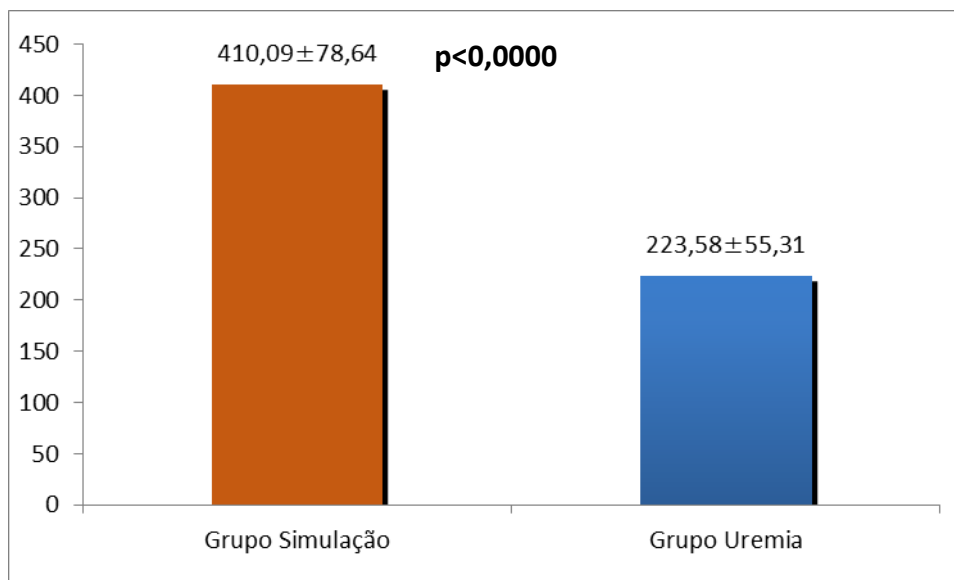


TABELA 10: DEMONSTRATIVO DAS AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS (P) DAS QUANTIFICAÇÕES DO ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR ENTRE OS GRUPOS DE RATOS AVALIADOS

Grupos	Grupo Simulação	Grupo Uremia
Média	410,09	223,58
Desvio Padrão	78,64	55,31
p	0,0000	

4.3.5 AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE MIOFIBROBLASTOS

Na tabela 20 do apêndice 9 estão demonstrados as validações e os resultados individuais das avaliações histométricas obtidas nas quantificações de miofibroblastos. Conforme demonstrado no gráfico 9, os ratos do grupo uremia apresentaram resultados significativamente piores que o grupo simulação ($< 0,0001$) (tabela 20 - página 80).

GRÁFICO 9: DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS ARITMÉTICAS DAS QUANTIFICAÇÕES DE MIOFIBROBLASTOS NO TECIDO CICATRICAL INTESTINAL.

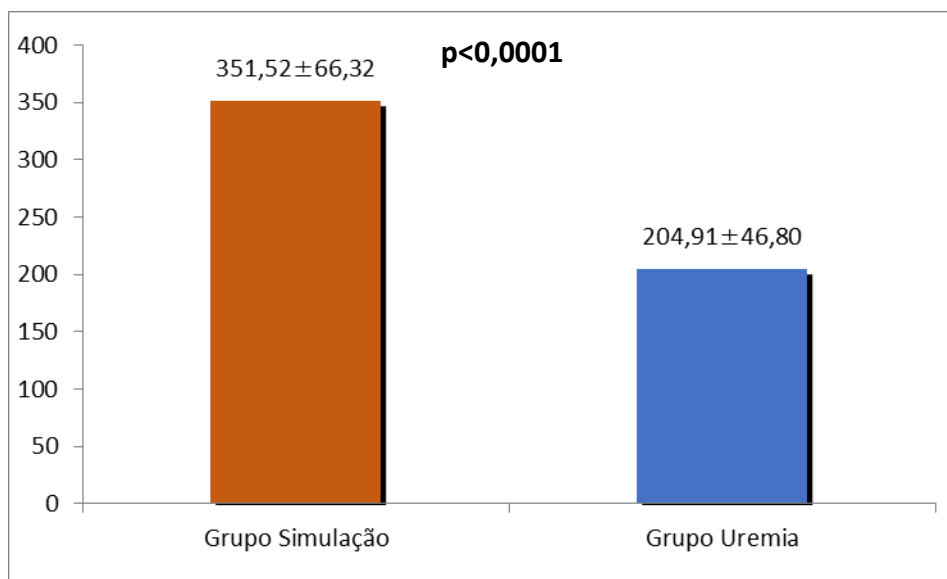


TABELA 11: DEMONSTRATIVO DAS AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS (P) DAS QUANTIFICAÇÕES DE MIOFIBROBLASTOS ENTRE OS GRUPOS DE RATOS AVALIADOS

Grupos	Grupo Simulação	Grupo Uremia
Média	351,52	204,91
Desvio Padrão	66,32	46,80
p	< 0,0001	

5 Discussão

5.1 O MODELO EXPERIMENTAL

A escolha do rato para este estudo foi feita por ser animal de pequeno porte adaptado ao ambiente laboratorial, aquisição acessível e fácil manejo em alojamento múltiplo e alimentação específica para espécie, bem como ser possível padronização de variáveis como raça, idade e sexo^{45,78,79}. No presente estudo foram utilizados 20 ratos da linhagem Wistar, com idades entre 143 a 152 dias e pesos de $249,2 \pm 13,80$ gramas, separados em dois grupos conforme descrito no apêndice 01. Ao serem comparadas estatisticamente as médias e os desvios padrões entre os pesos dos grupos simulação e uremia, verificou-se $p = 0,9504$, o que demonstra a homogeneidade de ambos os grupos no início do experimento. No entanto, ao serem comparados estes mesmos dados, as médias e os desvios padrões entre os pesos dos grupos simulação e uremia no 19^o dia, verificou-se $p = 0,2292$ demonstrando que não houve diferença significativa entre os grupos, porém com tendência para maior perda de peso nos animais do grupo uremia conforme tendência da evolução do modelo (gráfico 1) de perda de peso nestes animais e pela percepção de prostração, pouca busca por alimento e água, o que poderia levar ao comprometimento e ameaça ao estudo. De forma similar aos resultados obtidos no presente estudo, porém com nove meses de evolução da NX 5/6 isolada, ou seja, sem realização da colotomia, os ratos do grupo experimental não demonstraram perda ponderal quando comparados ao grupo simulação⁸⁰. Contrapondo-se aos resultados ora obtidos e também ao estudo anterior, animais submetidos a eletrocoagulação dos pólos renais com posterior nefrectomia contralateral, não demonstraram perda de peso significativa no terceiro mês após os procedimentos⁶⁰. Este fato pode ser inferido à metodologia empregada, pelo tempo de sobrevivência dos ratos e da não realização da colotomia.

O experimento cirúrgico do presente estudo foi realizado em três ciclos de atividades por uma equipe treinada para o propósito, sendo os procedimentos executados em condições de esterilidade, por um único cirurgião.

Com o objetivo de cumprir preceitos éticos no manejo e execução do presente estudo em ratos, adotou-se o princípio de que “experimentos que possam causar dor ou

angústia em animais desenvolver-se-ão sob sedação, analgesia ou anestesia adequadas”. Desta forma, o procedimento anestésico foi executado em duas fases, sendo a primeira uma sedação inalatória com isoflurano para que os ratos fossem corretamente pesados em balança de precisão e também para que não sofressem o estresse e a dor da inoculação dos anestésicos, por possível contenção inadequada. Na segunda fase foram empregados o cloridrato de cetamina associado ao cloridrato de xilasina. Essa associação cetamina-xilasina, por via intramuscular ou intraperitoneal é uma das mais utilizadas em animais de pequeno porte e mantém o animal em plano anestésico de 40 a 60 minutos, com possibilidade de reforço da dose, caso prolongue o tempo cirúrgico⁸¹.

Um fator importante para a indução adequada de um plano anestésico é a pesagem correta de cada rato, para que recebam corretamente a proporção ao peso das drogas anestésicas, sendo indispensável que o rato esteja pelo menos sedado para não se mobilizar durante a pesagem o que levaria a leitura errada do peso na balança. No presente estudo empregou-se balança eletrônica e os ratos estavam sedados no momento da pesagem. Conforme orientado pelo GUIDELINES ON ANESTHESIA AND ANALGESIA IN LABORATORY ANIMALS, o procedimento anestésico foi considerado adequado para o início do procedimento cirúrgico em média após quatro minutos da inoculação dos anestésicos.

Adotou-se o modelo experimental proposto por Vianna e colaboradores (1981), sendo realizado em três etapas⁷³. A primeira etapa corresponde a realização de nefrectomia parcial, após o rim ser descapsulado com preservação da glândula adrenal, seguida de ablação dos pólos renais à esquerda. Nesta etapa o diferencial do presente estudo daquele modelo, é a não realização da ablação de maior parte do parênquima oposto ao hilo renal e o uso de eletrocoagulador plasma de argônio para a ablação dos 2/3 de massa renal.

O eletrocoagulador plasma de argônio é um método de hemostasia de corrente elétrica monopolar ou bipolar de alta frequência que consiste na emissão do gás argônio ionizado pela extremidade do probe para a superfície do tecido sem necessidade de contato direto. Pode ser utilizado em sangramentos superficiais ou difusos de órgãos parenquimatosos, e para desvitalização térmica de tecidos patológicos. Estudos

experimentais têm demonstrado a superioridade desta modalidade de eletrocauterização devido a eficiência e limitado traumatismo aos tecidos. O limite de profundidade de acometimento do tecido está entre dois e três milímetros, com eficiente coagulação e concomitante possibilidade de utilização em órgãos mais delicados como intestino delgado e cólon⁸².

Completando a primeira etapa, foi realizada a nefrectomia direita após sete dias. Paralelamente, os animais do grupo controle eram submetidos à lombotomias, com os mesmos sete dias de intervalo, sem que fossem realizadas as nefrectomias. A segunda etapa consistiu em colotomia e colorrafia com apenas uma anastomose término-terminal. A última etapa foi realizada após 7 dias da anastomose colônica para coleta de sangue e retirada da anastomose para análise dos resultados.

A reprodução desta técnica em ratos similarmente ao realizado no presente estudo, foi realizado por FLECK e colaboradores (2006), demonstrando diminuição da taxa de filtração glomerular após 10 semanas do procedimento, com a particularidade da análise entre gêneros. O estudo verificou que houve diferença significativa entre os ratos machos e fêmeas, supondo uma maior fragilidade e suscetibilidade nas fêmeas⁸³.

Posteriormente, a mesma metodologia foi utilizada para avaliar às alterações morfológicas e histológicas em outras espécies. Estudo em que se realizou nefrectomia 5/6 em coelhos, foi possível constatar o aumento volumétrico do rim remanescente verificado por estudo cintilográfico (DMSA) e com diferença significativa entre os dados obtidos na 4ª e 16ª semana. As análises histopatológicas demonstraram fibrose subcapsular intersticial, dilatação de túbulos renais e ductos coletores, glomérulos com dilatação e áreas de escleroses, mineralização de membranas basais de túbulos renais no grupo experimental. Os resultados do estudo, além de demonstrar alterações morfológicas e histopatológicas do rim remanescente, reforçam a efetividade do modelo cirúrgico em causar disfunção renal⁶⁸. Estas alterações estruturais corroboram com análise histológica e imunoistoquímica de rins de ratos e macacos submetidos a NX 5/6 avaliados após 13 semanas do procedimento, que semelhante ao estudo anterior, revelou esclerose glomerular e fibrose intersticial na massa renal remanescente⁸⁴.

Apesar de outros modelos experimentais também serem eficientes em demonstrar injúria renal, a NX 5/6 tem algumas vantagens como: reproduzir a disfunção renal por perda de néfrons assim como em humanos, fornecer dados mais completos quanto a proteinúria e hipertensão secundária a diminuição da taxa de filtração glomerular, e comparar o dano renal em relação a quantidade de massa renal retirada. Quando realizada nefrectomia 1/2, 2/3 e 5/6 a análise dos efeitos bioquímicos e morfológicos do rim remanescente após ablação progressiva da massa renal, demonstra que hipertrofia renal compensatória, e a injúria glomerular estão intimamente relacionadas ao volume do rim remanescente, sendo portanto, mais evidentes quando uma maior fração de tecido renal é extraída^{85,86}.

5.2 AVALIAÇÃO DO TECIDO DE GRANULAÇÃO

No presente estudo a formação do tecido de granulação através da análise histopatológica foi significativamente pior no grupo uremia em relação ao grupo simulação quanto à reepitelização das bordas ($p=0,0196$) e da proliferação angiofibroblástica ($p=0,0379$).

Mc Dermott e colaboradores (1968) mostraram que o tecido de granulação estava reduzido em ratos urêmicos ao realizar análise histológica após cinco dias do procedimento para indução de disfunção renal, além de inibição da proliferação celular nos fibroblastos e nas células endoteliais do tecido de granulação²⁰.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENOS I E III

Não apenas a taxa absoluta do colágeno, representada pelo conteúdo em hidroxiprolina, mas também a forma de disposição de suas fibras, são responsáveis pela resistência tecidual. Até o presente já foram identificados 19 isoformas de colágeno sendo que o colágeno tipo I predomina e constitui 80 a 90% e os restantes 10 a 20% são do tipo III³⁸. O colágeno tipo I é o mais freqüente e predominante em ossos e tendões é considerado colágeno maduro. O tipo III é mais comumente encontrado em tecidos moles,

como vasos sanguíneos, derme e fáscia. Já o tecido de granulação expressa 30 a 40 % de colágeno do tipo III, sendo considerado colágeno imaturo. O colágeno mais importante é do tipo I, que é responsável não apenas pela manutenção da integridade da maioria dos tecidos em função das suas propriedades mecânicas⁸⁷, mas também por sua participação ativa na funcionalidade dos tecidos em função de sua interação com as células presentes na matriz extra-celular. Está presente em todos os vertebrados, e incluído na lista das maiores e mais complexas macromoléculas encontradas no reino animal, juntamente com outras macromoléculas formam a matriz extra-celular.

O método empregado para a avaliação e diferenciação de tipos de colágeno, foi o da polarização com picrossírius que relata a porcentagem das fibras, classificadas em maduras ou imaturas de acordo com a sua coloração e permite avaliação quantitativa de fibras colágenas, sendo utilizado amplamente em estudos de cicatrização de anastomoses intestinais e outros tecidos³⁷.

Russel e colaboradores (1972) após 10 semanas de nefrectomia e isquemia renal segmentar contralateral em ratos, demonstrou que há evidente alteração na formação da matriz mineral óssea e na maturação de colágeno, no grupo com uremia⁸⁸.

Em estudo para avaliar a força tênsil e formação de colágeno em ratos após cinco, 10 e 15 dias de uremia, evidenciou-se uma considerável e significativa redução da força tênsil e também no acúmulo de colágeno, verificado através da quantificação de hidroxiprolina no 10^o e 15^o dia⁸⁹.

No presente estudo, verificou-se que os ratos do grupo uremia apresentaram resultados significativamente piores que o grupo simulação quanto a média de colágeno tipo I ($p=0,0009$) e quanto ao colágeno tipo III ($p=0,016$).

5.4 DENSIDADE MICROVASCULAR

No presente estudo o grupo uremia demonstrou densidade microvascular tecidual significativamente pior ($p=0,0074$) que o grupo simulação.

Angiogenese é o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir da vascularização existente previamente, está presente em condições fisiológicas e patológicas, tanto benignas quanto malignas. A produção de novos vasos é essencial na(n) reparo de feridas, sendo observado nos tecidos em processo de cicatrização e caracterizado por um processo complexo que envolve múltiplas etapas: vasodilatação, permeabilidade endotelial, ruptura da conexão das células endoteliais, proliferação e migração dessas células e por fim subsequente remodelamento formando condutos para passagem dos nutrientes⁹⁰.

A formação da neovascularização pode ser quantificada pela avaliação imunoistoquímica da densidade de microvasos, através de identificação de proteínas expressas na superfície das células endoteliais marcadas por anticorpos monoclonais⁹¹. O anticorpo monoclonal CD34 pode ser utilizado para a marcação imunoistoquímica da densidade microvascular⁹².

Na literatura, a uremia demonstrou ser fator importante na inibição da proliferação celular do endotélio e do processo de reparo cicatricial através da presença de duas dentre várias toxinas urêmicas, a p-cresol e a indoxil-sulfato⁹³.

5.5 AVALIAÇÃO TECIDUAL DO ANTÍGENO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA)

Após avaliações histométricas obtidas na quantificação do antígeno nuclear de proliferação celular o presente estudo demonstrou uma menor quantidade deste antígeno com significância estatística, nos ratos do grupo uremia quando comparada ao grupo simulação ($p=0,0000$).

O PCNA desempenha papel importante no metabolismo dos ácidos nucléicos. É uma proteína sintetizada principalmente durante a fase S do ciclo celular sendo essencial para a replicação, transcrição e montagem da cromatina comossômica⁹⁴.

Em estudo que avaliou a atividade de proliferação de condrócito pela expressão de PCNA na zona de crescimento de cartilagem após 30 dias de nefrectomia subtotal 5/6 em ratos, foi possível concluir que o número de condrócitos em proliferação no platô de crescimento foi significativamente menor em ratos urêmicos quando comparados aos ratos controle⁹⁵.

5.6 DENSIDADE DE MIOFIBROBLASTOS

No presente estudo, as densidades teciduais de miofibroblastos foram significativamente piores no grupo uremia quando comparados ao grupo simulação ($p \leq 0,0001$). O método utilizado no presente estudo para a quantificação de miofibroblastos, por meio de imunistoquímica, utilizando-se o anticorpo anti- α -actina muscular lisa (actina α -sm) o qual é amplamente empregado para essa finalidade pois estudos comprovam a importância dos miofibroblastos no processo cicatricial e demonstram que existe relação direta entre o nível de actina α -sm e a capacidade contrátil dos miofibroblastos³⁷. Outro estudo experimental em ratos que investigou a densidade de miofibroblastos na cicatrização de feridas pelo mesmo método ora empregado concluiu que o metronidazol, aplicado de forma tópica nas feridas com cicatrização por segunda intenção, não interfere na contração da ferida e atrasa o aparecimento dos miofibroblastos⁹⁶.

A importância dos miofibroblastos no processo cicatricial decorre também pelo fato de que o processo de contração da ferida alcança a sua eficiência máxima durante a fixação dos fibroblastos e seu amadurecimento fenotípico para células produtoras de colágeno. Isto é devido à mudança de fenótipo dos fibroblastos das margens da ferida para miofibroblastos que são células intermediárias entre musculares lisas e fibroblastos. Apesar de seu mecanismo contrátil estar ainda por ser esclarecido, estas células são encontradas alinhadas ao redor de depósitos da nova matriz extracelular, fazendo uniões célula a célula

e gerando força de tensão. Auxilia também no processo de contração da ferida o ressecamento da sua crosta superficial que durante a desidratação diminui de tamanho e arrasta o tecido a ela aderido⁹⁷.

Destacam-se neste processo o efeito estimulatório das três isoformas TGF- β s como potentes estimuladores da expressão de proteínas da matriz extracelular além das integrinas. Além dos efeitos sobre a proliferação de fibroblastos, da sua ação sobre os queratinócitos e a deposição de matriz extracelular, participam também da diferenciação de miofibroblastos e do processo de angiogênese⁹⁸.

5.7 DOSAGENS SÉRICAS DE URÉIA, CREATININA E PCR.

No presente estudo a dosagem de uréia foi superior no grupo uremia em relação ao grupo simulação com significância estatística ($p < 0,0000$). O mesmo não foi observado com os dados da creatinina, que embora apresentou níveis séricos maiores no grupo uremia, não mostrou diferença estatística significativa ($p = 0,0904$).

A uréia é formada no fígado como o principal produto final do metabolismo de substâncias nitrogenadas e posteriormente é excretada pelos rins⁹⁹.

Estudos experimentais e clínicos têm demonstrado o efeito negativo da uremia na cicatrização de feridas²¹. Colin e colaboradores (1970) concluíram que ratos com uremia apresentavam atraso na cicatrização de anastomoses de intestino delgado e aponeurose. Portanto, a presença de toxinas urêmicas tem efeito negativo ao diminuir a proliferação celular, quantidade de hidroxiprolina na ferida operatória, assim como causa alteração na formação dos fibroblastos^{20,100}.

Outro ponto importante na cicatrização de feridas é a fase de hemostasia. Apesar da atividade plaquetária estar aumentada no soro de pacientes urêmicos através do aumento significativo da expressão da caspase-3 em comparação aos indivíduos normais, que pode, portanto, elevar o risco de formação de trombos, não há consenso a respeito dos efeitos das toxinas urêmicas no processo de coagulação. Estudo demonstra que a uremia provoca

aumento do tempo de formação do coágulo, porém sem conseguir provar a razão direta entre o a elevação das toxinas urêmicas e alteração nos fatores de coagulação^{15,72}.

A DRC está associada à um estado de inflamação crônica, evidenciado pela elevação de diversas citocinas como a IL-6 e concentrações alteradas de proteínas de fase aguda como a PCR. Outras toxinas urêmicas, particularmente a dimetilarginina, induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). Esses produtos tóxicos provocam uma carga inflamatória na DRC por meio da geração de um desequilíbrio entre a maior produção de ERO e uma capacidade antioxidante limitada ou diminuída¹⁰¹. A associação destas espécies reativas de oxigênio e a presença de marcadores pró inflamatórios, desencadeia um processo de inflamação crônica.

A uremia pode causar injúria da mucosa intestinal, edema, inflamação, ulceração com perda da barreira da mucosa e como consequência, pode ocorrer translocação bacteriana, fator sabidamente prejudicial ao processo de cicatrização¹⁰².

Efeitos deletérios da uremia no trato gastrointestinal foram observados através da desintegração das junções *tight*, fenômeno que pode contribuir com o processo inflamatório por causar defeitos na função de barreira das células intestinais aumentando a possibilidade de penetração de bactérias ou seus produtos tóxicos, enzimas digestivas e material de degradação de alimentos¹⁰³.

No presente estudo observou-se que os ratos do grupo uremia apresentaram valores de proteína C reativa ultrasensível, significativamente maiores que o grupo simulação ($p=0,0142$), sugerindo um processo inflamatório mais intenso no grupo uremia quando comparado ao grupo simulação.

5.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo experimental contribui com algumas questões importantes e promissoras com relação ao comportamento do processo de cicatrização de anastomoses intestinais em vigência de uremia. A DRC, por ser uma doença de alta prevalência e constituir um importante problema de saúde pública pela alta morbidade e elevados custos,

é objeto há tempos de muitos estudos que visam um entendimento da doença e de formas em tratá-la, ou ao menos, tratar suas consequências.

O processo cicatricial de qualquer tecido é uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que envolve, de forma harmoniosa, fenômenos bioquímicos e fisiológicos, a fim de garantir a reconstituição histológica e a restauração fisiológica do tecido lesionado, porém em pacientes com DRC esse processo mostra-se comprometido pelas diversas alterações metabólicas ocorridas ao longo da evolução da doença.

A concepção deste estudo partiu da observação no aumento do número de transplantes renais nos últimos anos e da possibilidade de demonstrar não só a efetividade do modelo cirúrgico utilizado, a nefrectomia 5/6, como forma de reproduzir disfunção renal por perda de néfrons, assim como ocorre nos seres humanos, mas também o efeito das toxinas urêmicas como causa de alteração do processo de cicatrização colônica.

A perda ponderal apresentada pelos ratos no presente estudo, apesar de não demonstrar significância estatística, pode ser sinal tanto da própria atividade das toxinas urêmicas como também da possível desidratação, desnutrição e resposta inflamatória, o que demonstra a necessidade de estudos com tempo pós colotomia/colorrafia mais prolongados, incluindo outras fases do processo cicatricial, e executados em ambiente controlado, como as gaiolas metabólicas.

Considerando o trabalho de Vianna e colaboradores em 1981⁷³, em um modelo similar de indução de uremia em ratos, avaliaram sob o ponto de vista anatomopatológico, o comportamento da cicatrização ao nível do intestino delgado e encontraram alterações macroscópicas e histológicas sugestivas de um desvio no processo normal de cicatrização intestinal. Interrogaram se essas alterações ocorreram em virtude de deficiência da síntese de colágeno ou por retardo na maturação do que se chamou naquele momento de colágeno jovem. Os resultados ora apresentados esclarecem que a uremia piora a maturação do colágeno e agregam ainda as informações de que ocorre piora na densidade de miofibroblastos, que são células produtoras de colágeno, também a angiogênese e a viabilidade celular cicatricial encontram-se comprometidas.

Com base nos resultados acredita-se que a colaboração desta pesquisa foi em estabelecer a relação negativa da uremia com o processo de cicatrização de anastomoses colônicas e sobre a necessidade de avanços no tratamento da doença renal crônica como melhora no âmbito das terapias de substituição renal, seja na forma mais eficiente do processo de hemodiálise para eliminação de maior quantidade possível de toxinas urêmicas, quanto na importância do transplante renal em retardar o avanço das alterações fisiológicas e histológicas nos órgãos e tecidos acometidos pela doença.

6 Conclusões

- O estado urêmico, induzido experimentalmente através da nefrectomia 5/6 é capaz de influenciar negativamente o processo de cicatrização ao nível do intestino grosso.
- A uremia compromete a formação de tecido de granulação evidenciada pela alteração na reepitelização das bordas e proliferação angiofibroblástica.
- A uremia retarda a maturação de colágeno do tipo I.
- A uremia induz a redução da densidade microvascular ao nível da anastomose colônica.
- A uremia reduz a viabilidade celular na área da cicatrização colônica.
- A uremia reduz a densidade de miofibroblastos presentes na cicatrização colônica.

Referências

1. Sesso RC, Lopes AA, Thomé FS, Lugon JR, Watanabe Y, Santos DR. Relatório do Censo Brasileiro de Diálise Crônica. *J Bras Nefrol* 2014;36(1):48-53.
2. United States Renal Data System (USRDS). *Chronic Kidney Disease in the United States and Volume 2: End-Stage Renal Disease in the United States*. 2016.
3. Bastos MG, Bregman R, Kirztain GM. Doença renal crônica: frequente e grave, mas também prevenível e tratável. *Rev Assoc Med Bras* 2010;56(2):248-253.
4. Levey AS, Atkins R, Coresh J, Cohen EP, Collins AJ, Eckardt KU et al. Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney Int* 2007; 72(3):247-259.
5. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of diet in renal disease study group. *Ann Intern Med* 1999;130:461-470.
6. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976;16:31-41.
7. Moreira HG, Sette JBC, Keiralla LCB, Alves SG, Pimenta E, Souza M et al. Diabetes mellitus, hipertensão arterial e doença renal crônica: estratégias terapêuticas e suas limitações. *Rev Bras Hipertens* 2008;15(2):111-116.
8. Underwood CF, Hildreth CM, Wyse BF, Boyd R, Goodchild AK, Phillips JK. Uraemia: an unrecognized driver of central neurohumoral dysfunction in chronic kidney disease. *Acta Physiol* 2016;219(1):305-323.
9. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, Argilés A, Baurmeister U, Brunet P et al. European Uremic Toxin Work Group (EUTox). Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int* 2003;63(5):1934-1943.
10. Barreto FC, Stinghen AEM, Oliveira RB, Franco ATB, Moreno AN, Barreto DV et al. The quest for a better understanding of chronic kidney disease complications: an update on uremic toxins. *J Bras Nefrol* 2014;36(2):221-235.
11. Meyer TW, Hostetter TH. Uremia. *N Engl J Med* 2007;357(27):1316-1325.
12. Cusomano AM, Rosa-Diez GJ, Gonzalez-Bedat MC. Latin American Dialysis and Transplant Registry: Experience and contributions to end-stage renal disease epidemiology. *World J Nephrol* 2016;5(5):389-397.
13. Moradi H, Sica DA, Zadeh KK. Cardiovascular Burden Associated with Uremic Toxins in Patients with Chronic Kidney Disease. *Am J Nephrol* 2013;38:136-148.
14. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis*. 2002;Suppl 1:S1-266.
15. Kirszajn GM, Souza E, Romão JR JE, Bastos MG, Meyer F, Andrada NC. Doença Renal Crônica (Pré-terapia Renal Substitutiva): Diagnóstico. Projeto Diretrizes AMB 2011.
16. Dantas AFM, Kommers GD. Lesões extra-renais de uremia em 72 cães. *Ciência Rural* 1997;27(2):301-306.
17. Ribeiro V, Bosquetti B, Gonçalves SM, Bucharles SGE, Rempel L, Maciel RAP et al. Soro urêmico inibe a expressão *in vitro* da quimiocina SDF-1: possível impacto da toxicidade urêmica na lesão endotelial. *J Bras Nefrol* 2014;36(2):123-131.
18. Ori M, Seguro AC, Rocha AS. Efeito inibidor do soro de ratos com insuficiência renal aguda e crônica sobre a atividade fagocitária "in vitro". *Rev Inst Med Trop*, 1990;32(6):409-413.

19. Shindo K, Kosaki G. Effects of chronic renal failure on wound healing in rats. *Jpn J Surg* 1982;12(1):46-51.
20. McDermott FT, Nayman CM, De Boer WGRM. The effect of acute renal failure upon wound healing: histological and autoradiographic studies in the mouse. *Annals of Sur*, 1968;168(1):142-146.
21. Maroz N, Simman R. Wound healing in patients with impaired kidney function. *J Am Coll Clin Wound Spec* 2013;5(1):2-7.
22. Heller A, Westphal SE, Bartsch P, Haase M, Mertens PR. Chronic kidney disease is associated with high abdominal incisional hernia rates and wound healing disturbances. *Int Urol Nephrol* 2014;46:1175-1181.
23. Baylis C. Arginine, arginine analogs and nitric oxide production in chronic kidney disease 2006;2(4):209-220.
24. Gagnon AL, Desai T. Dermatological disease in patients with CKD. *J Nephropathol* 2013;2(2):104-109.
25. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1998;32Suppl 3:S112-119.
26. Kusano KF, Nakamura, K, Kusano H, Nishii N, Banba K, Ikeda T et al. Significance of the level of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerosis. *Circ J* 2004;68(7):671-676.
27. Wesoly J, Sikorski K, Lee CK, Bluysen HA. Suppressor of cytokine signaling and accelerated atherosclerosis in kidney disease. *Acta Biochim Pol* 2010;57(3):251-260.
28. Shlipak MG, Fried LF, Crump C, Bleyer AJ, Manolio TA, Tracy RP et al. Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. *Circulation* 2003;107(1):87-92.
29. Pecoits-Filho R, Lindholm B, Stenvinkel P. End-stage renal disease: a state of chronic inflammation and hyperleptinemia. *Eur J Clin Invest* 2003;33(6):527-528.
30. Ballou SP, Kushner I. C-reactive protein and the acute phase response. *Adv Intern Med* 1982;27:345-372.
31. Carrero JJ, Stenvinkel P. Persistent inflammation as a catalyst for other risk factors in chronic kidney disease: a hypothesis proposal. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4Suppl 1:49-55.
32. Sheen YJ, Sheu WH. Metabolic syndrome and renal injury. *Cardiol Res Pract* 2010;2011:1-13.
33. Stinghen A, Pecoits-Filho R. Vascular damage in kidney disease: beyond hypertension. *Intern J Hypertens*. 2011;2011 ID 232683.
34. Becher MU, Nickenig G, Werner N. Regeneration of the vascular compartment. *Herz* 2010;35(5):342-351.
35. Vanholder R, Baurmeister U, Brunet P, Cohen G, Glorieux G, Jankowski J. European uremic toxin work group. A bench to bedside view of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol* 2008;19(5):863-870.
36. Bachmann S, Mundel P. Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function. *Am J Kidney Dis* 1994;24(1):112-129.
37. Campos ACL, Borges-Branco A, Groth AK. Cicatrização de feridas. *Arq Bras Cir DIG* 2007;20(1):51-58.
38. Giaquinto MGC, Mota DSC. Cicatrização de feridas. In: MARQUES RM. Técnica operatória e cirurgia experimental. 1 ed. [Rio de Janeiro]:Guanabara Koogan, 2005;55-70.

39. Maish GO, Shumate ML, Ehrlich HP, Cooney RN. Tumor Necrosis Factor Binding Protein Improves. Tumor necrosis factor binding protein improves incisional wound healing in sepsis. *J Surg Res* 1998;78(2):108-117.
40. White MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am*. 1997;77(3):509-28.
41. Wagner OJ, Egger B. Influential Factors in Anastomosis Healing. *Swiss Surg Bern* 2003;9(3):105-113.
42. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg* 2006;117(7 Suppl):1e-S-32e-S.
43. Orgill D, Demling RH. Current concepts and approaches to wound healing. *Crit. Care Med* 1998;16(9):899-908.
44. Stevens A, Lowe J. Respostas teciduais ao dano. *Patologia*. 2 ed. [São Paulo]: Manole, 2000;35-50.
45. Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses. III. Collagen metabolism in the colon after left colon resection. *Amer J of Surg* 1980;139(3):398-405.
46. Veit G, Kobbe B, Keene DR, Paulsson M, Koch M, Wagener R. Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. *J Biol Chem* 2006;281(6):3494-3504.
47. Kivirikko KI, Ristelli J. Biosynthesis of collagen and its alteration in pathological states: review article. *Med Biol* 1976;54(3):159-186.
48. Stetten MR. Some aspects of the metabolism of hydroxyproline, studied with the aid of isotopic nitrogen. *J Biol Chem, Baltimore* 1949;181:31-37.
49. Junqueira, LCU, Cossermelli W, Brentani R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn*, 1978;41(3):267-274.
50. Junqueira LCU, Montes GS, Sanchez EM. The influence of tissue thickness on the study of collagen by the picosirius-polarization method. *Histochemistry* 1982;74(1):153-156.
51. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer* 2002;38(12):1564-1579.
52. Hasan J, Byers R, Jayson GC. Intra-tumoral microvessel density in human solid tumors. *Br J Cancer* 2002;86(10):1566-1577.
53. Guimarães MVTN, Moreira GHG, Rocha LP, Nicoluzzi JEL, Souza CJF, Repka JCD. L-arginine action in cutaneous flap evolution under nicotine exposure in rats. *Rev Col Bras Cir* 2013;40(1):49-54.
54. Levine AJ, Perry ME, Chang A, Silver A, Dittmer D, Wu M et al. The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of p53 tumour suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Câncer* 1994;69(3):409-416.
55. Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM. Expression of proliferating cell nuclear (PCNA)/ cyclin during cell cycle. *Exp Cell Res* 1986;166(1):209-219.
56. Bravo R. Synthesis of the nuclear protein cyclin (PCNA) and its relationship with DNA replication. *Exp Cell Res* 1986;163(2):287-293.
57. Lorena D, Uchio K, Costa AM, Desmolliere A. Normal scarring: importance of myofibroblasts. *Wound Repair Regen* 2002;10(2):86-92.
58. Ferreira LM, Hochman B, Barbosa MVJ. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cir Brás* 2005;20(Suppl. 2):28-34.

59. Becker GJ, Hewitson TD. Animal models of chronic kidney disease: useful but not perfect. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28(10):2432-2438.
60. Boudet J, Man NK, Pils P, Sausse A, Brentano JLF. Experimental chronic renal failure in the rat by electrocoagulation of the renal cortex. *Kidney Int* 1978;14(1):82-86.
61. Chanutin A, Ferris EB. Experimental renal insufficiency produced by partial nephrectomy: I control diet. *Arch Intern Med* 1932;49(5):767-787.
62. Fernandes-Charpiot IM, Caldas HC, Mendes GE, Gomes LSN, Oliveira HL, Baptista MA, Abbud-Filho M. Validation of an experimental Model to Study Severe Chronic Renal Failure. *J Invest Surg* 2016;29(5):309-315.
63. Shobeiri N, Adams MA, Holden RM. Vascular Calcification in Animal Models of CKD: A Review, *AM J Nephrol* 2010;31:471-481.
64. Yang HC, Zuo Y, Fogo AB. Models of chronic kidney disease. *Drug Discov Today Dis Models* 2010;7(1-2):13-19.
65. Liu ZC, Chow KM, Chang TMS. Evaluation of Two Protocols of Uremic Rat Model: Partial Nephrectomy and Infarction. *Renal Failure* 2003;25(6):935-943.
66. Konopka CL, Jurach A, Wender OCB. Experimental model for the study of chronic renal ischemia in rats. Morphologic, histological and ultra-structural analysis. *Acta Cir Bras* 2006;22(1):12-21.
67. Kumano K, Kogure K, Tanaka T, Sakai T. A new method of inducing experimental chronic renal failure by cryosurgery. *Kidney Int* 1986;30(3):433-436.
68. Costa AFN, Pereira LPM, Ferreira ML, Silva PC. Surgical model of chronic renal failure. Study in rabbits. *Rev Col Bras Cir* 2009;36(1):78-84.
69. Togoe EB, Silva IS, Cury JL, Souza AS, Borges JHS, Saturnino KS. Animal model of chronic kidney disease using a unilateral technique of renal ischemia and reperfusion in Withe New Zealand rabbits. *Acta Cir Bras* 2014;29(10):651-657.
70. Slatopolsky E, Caglar S, Pennel JP, Taggart DD, Canterbury JM, Reiss E, Bricker NS. On the pathogenesis of hyperparathyroidism in chronic experimental renal insufficiency in the dog. *J Clin Invest* 1971;50(3):492-499.
71. Larrain C, Langdell B. The hemostatic defect of uremia. I: Clinical Investigation of Three Patients with Acute Post-traumatic Renal Insufficiency. *Blood Journal* 1056;11:1059-1066.
72. Guidelines on Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals. University of South Florida provides the following guidelines for use by IACUC-certified faculty and staff. www.southalabama.edu/researchcompliance/pdf/anesthanalgesia.
73. Vianna AL, Duarte VT, Araújo RC, Barbosa H. Uremia e cicatrização intestinal: estudo experimental em ratos. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo* 1981;36(1):27-30.
74. Pincus MR, Henry JB. Química clínica. In: Henry JB. Diagnósticos Clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 20 ed. 2008;289-293.
75. Brusilow SW. "Inborn errors of urea synthesis". In: Glew RH, Ninomiya Y. *Clinical studies in medical biochemistry*. 2 ed. [New York]: Oxford University Press, 1997;260-267.
76. Molgaard HV, Spurr NK, Greaves MF. The hemopoietic stem cell antigen CD34 is encoded by a gene located on chromosome 1. *Leukemia* 1989;3(11):773-776.
77. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29(4):577-80.
78. Hermann JB, Woodward SC, Pulaski EJ. Healing of colonic anastomosis in the rat. *Surg*

- Gynecol Obstet 1964;119:269-275.
79. Law NW, Ellis H. The effect of parenteral nutrition on the healing of abdominal wall wounds and colonic anastomosis in protein-malnourished rats. *Surgery* 1990;107(4):449-454.
80. Askari H, Seifi B, Kadkhodae M. Evaluation of renal-hepatic functional indices and blood pressure based on the progress of time in a rat model of chronic kidney disease. *Nephrourol Mon* 2016;8(3):e37840.
81. Schanaider A, Silva PC. Uso de animais em cirurgia experimental. *Acta Cir Bras* 2004;19(4):441-447.
82. Grund KE, Straub T, Farin G. New haemostatic techniques: argon plasma coagulation. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 1999;13(1):67-84.
83. Fleck C, Appenroth D, Jonas P, Koch M, Kundt G, Nizze H et al. Suitability of 5/6 nephrectomy (5/6nx) for the induction of interstitial renal fibrosis in rats - influence of sex, strain, and surgical procedure. *Exp Toxicol Pathol* 2006;57(3):195-205.
84. Suzuki Y, Yamaguchi I, Onoda N, Saito T, Myojo K, Imaizumi M et al. Differential renal glomerular changes induced by 5/6 nephrectomization between common marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*) and rats. *Exp Toxicol Pathol* 2013;65(5):667-676.
85. Kaufman JM, DiMeola HJ, Siegel NJ, Lytton B, Kashgarian M, Hayslett JP. Compensatory adaptation of structure and function following progressive renal ablation. *Kidney Int* 1974;6(1):10-17.
86. Santos LS, Chin EWK, Ioshii SO, Filho RT. Surgical reduction of the renal mass in rats. Morphologic and functional analysis on the remnant kidney. *Acta Cir Bras* 2006;21(4):253-256.
87. Ramachandran GN, Mitra AK. An explanation for the rare occurrence of cis peptide units in proteins and polypeptides. *J Mol Biol* 1976;107(1):85-92.
88. Russell JE, Avioli LV. Effect of Experimental Chronic Renal Insufficiency on Bone Mineral and Collagen Maturation. *J Clin Invest* 1972;51(12):3072-3079.
89. Russell JE, Avioli LV. Effect of Experimental Chronic Renal Insufficiency on Bone Mineral and Collagen Maturation. *J Clin Invest* 1972;51(12):3072-3079.
90. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285(21):1182-1126.
91. Frank RE, Saclarides TJ, Leurgans S, Speziale NJ, Drab EA, Rubin DB. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node-negative colon cancer. *Ann Surg* 1995;222(6):695-699.
92. Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imunohistoquímica. Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.
93. Dou L, Bertrand E, Cerini C, Faure V, Sampol J, Vanholder R, Berland Y, Brunet P. The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. *Kidney Int* 2004;65(2):442-51.
94. Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* 1997;13(14):629-640.
95. Barbosa APF, Silva JDP, Fonseca EC, Lopez PM, Fernandes MBC, Balduino A et al. Response of the growth plate of uremic rats to human growth hormone and corticosteroids. *Braz J Med Biol Res* 2007;40(8):1101-1109.
96. Trindade LCT, Biondo-Simões MLP, Sampaio CPP, Farias RE, Pierin RJ, Netto MC. Avaliação do uso tópico do metronidazol no processo de cicatrização de feridas: um estudo experimental. *Rev Col Bras Cir* 2010;37(5):358-363.
97. Cornelissen AM, Stoop R, Von Den Hoff HW, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. Myofibroblasts and matrix components in healing palatal wounds in the rat. *J Oral*

- Pathol Med 2007;29(1):1-7.
98. Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF-beta. Miner Electrolyte Metab 1998;24(2-3):111-119.
99. Baum N, Dichoso CC, Carlton JR CE. Blood urea nitrogen and serum creatinina. Urology 1975;5: 583-588.
100. Colin JF, Elliot P, Ellis H. The effect of uraemia upon wound healing: an experimental study. Br J Surg 1979;66:793-797.
101. Scaini G, Ferreira GK, Streck EL. Mecanismos básicos da encefalopatia urêmica. Rev Bras Ter Intensiva 2010;22(2):206-211.
102. Duarte JBA, Nascimento JEA, Nascimento M, Nochi Jr RJ. Bacterial translocation in experimental uremia. Urol Res 2004;32(4):266-270.
103. Vaziri ND, Yuan J, Rahimi A, Ni Z, Said H, Subramanian VS. Desintegration of colonic epithelial tight junction in uremia: a likely cause of CKD-associated inflammation. Nephron Dial Transplant 2012;27: 2686-2693.

Apêndice

Apêndice 01

TABELA 12: PESAGENS E COMPARAÇÕES ENTRE OS GRUPOS UREMIA (U) E SIMULAÇÃO (S)

CAIXA/ID	Nefrectomia Parcial		D2		D4		Ablação Renal		D9		
	NP-D0-U	NP-D0-S	D2-U	D2-S	D4-U	D4-S	ABL-D7-U	ABL-D7-S	D9-U	D9-S	
1	cabeça	243,80	258,30	240,30	256,40	238,40	255,92	240,30	257,34	237,10	253,56
	pescoço	258,20	262,70	256,40	262,10	253,50	260,27	253,50	262,98	251,70	257,87
	dorso	248,40	284,90	236,20	279,10	241,80	282,25	241,30	279,81	240,50	279,63
	cauda	251,20	246,10	247,30	239,70	248,40	243,84	248,90	240,80	247,50	241,60
	sm	256,00	268,40	255,10	263,40	249,60	265,92	246,97	265,27	248,30	263,46
2	cabeça	252,30	230,90	241,50	225,60	244,44	228,79	241,95	226,84	240,10	226,70
	pescoço	244,40	242,20	271,20	240,30	263,84	239,98	261,15	241,40	258,20	237,78
	dorso	234,70	235,80	228,40	227,50	226,98	233,64	224,66	228,73	223,20	231,51
	cauda	254,40	226,20	247,30	226,40	246,38	224,14	243,79	227,64	241,50	222,10
	sm	244,80	236,70	239,50	233,40	236,68	234,53	234,19	234,57	230,20	232,39
Mx	248,82	249,22	246,32	245,39	245,00	246,93	243,67	246,54	241,83	244,66	
Dp	6,70	17,79	11,53	17,71	9,54	17,62	9,55	17,63	9,74	17,44	
Teste T (p)	0,9504		0,8964		0,7763		0,6731		0,6759		

CAIXA/ID	D9		D12		Colotomia e Colorráfia		D17		D19		
	D9-U	D9-S	D12-U	D12-S	CC14-U	CC-D14-S	D17-U	D17-S	D19-U	D19-S	
3	cabeça	237,10	253,56	240,30	257,76	241,70	253,52	242,10	257,69	243,10	255,99
	pescoço	251,70	257,87	251,27	263,35	248,30	257,79	248,20	263,22	250,60	260,21
	dorso	240,50	279,63	239,60	280,01	241,60	279,33	239,70	284,30	239,03	281,54
	cauda	247,50	241,60	243,50	241,39	245,70	241,68	244,30	242,98	246,30	244,27
	sm	248,30	263,46	248,46	265,61	250,20	263,32	248,10	267,80	244,38	265,69
4	cabeça	240,10	226,70	245,75	227,58	247,72	226,94	244,30	227,80	241,96	229,67
	pescoço	258,20	237,78	261,45	241,98	247,80	237,90	241,30	242,06	239,40	240,52
	dorso	223,20	231,51	224,92	229,44	225,60	231,69	223,74	237,30	220,39	234,37
	cauda	241,50	222,10	244,07	228,36	244,80	222,38	242,75	228,58	239,11	225,15
	sm	230,20	232,39	234,46	235,22	235,16	232,56	233,21	235,37	229,71	235,24
Mx	241,83	244,66	243,38	247,07	242,86	244,71	240,77	248,71	239,40	247,26	
Dp	9,74	17,44	9,30	17,46	7,10	17,27	6,99	17,75	8,21	17,09	
Teste T (p)	0,6759		0,5824		0,7693		0,2277		0,2292		

Legenda :

- NP: Nefrectomia parcial
- U: Grupo Uremia
- S: Grupo Simulação
- ABL: Ablação renal
- CC: Colotomia e colorráfia

Apêndice 02

Dosagens de Uréia

Metodologia

Princípio:

- As dosagens de uréia foram realizadas pelo método indireto onde a uréia sérica é hidrolisada pela enzima urease para formar amônia. A amônia obtida será quantificada espectrofotometricamente pela reação acoplada urease/glutamato-desidrogenase (GLDH) com o emprego de a-cetoglutarato para oxidar o NADH a NAD⁺.

Método

- Automatizado utilizando o equipamento Dimension – RXL - Siemens® com reativos específicos DF21, sendo os resultados emitidos em mg/dl.

TABELA 13: RESULTADOS INDIVIDUAIS DAS DOSAGENS DE URÉIA (MG/ML)

Grupos	Dosagens de Uréia	
	Grupo Uremia	Grupo Simulação
1	141	56
2	147	60
3	100	50
4	123	49
5	163	49
6	109	44
7	145	56
8	212	55
9	198	52
10	147	56
Média	148,50	52,70
Desvio Padrão	35,48	4,74
p	p < 0,0000	

Apêndice 03

Dosagens de Creatinina

Metodologia

Princípio:

- A creatinina reage com ácido pícrico, formando um complexo de cor amarelo-avermelhado. Nesse pH ocorre a máxima formação do complexo corado Creatinina-Picrato e também com outros elementos plasmáticos. Com a adição do reagente ácido, o pH é diminuído e a cor devida à Creatinina é desfeita, permanecendo a cor devida aos cromogênios. Por diferença entre as leituras obtidas no pH ácido, obtém-se o valor real da Creatinina.

Método;

- Automatizado utilizando o equipamento Dimension – RXL - Siemens® com reativos específicos DF33B, sendo os resultados emitidos em mg/dl.

TABELA 14: RESULTADOS INDIVIDUAIS DAS DOSAGENS DE CREATININA (MG/ML)

Grupos	Dosagens de Creatinina	
	Grupo Uremia	Grupo Simulação
1	0,85	0,62
2	0,78	0,89
3	1,45	0,67
4	0,67	1,32
5	0,98	0,61
6	0,77	0,92
7	1,36	0,75
8	0,98	0,64
9	0,78	0,79
10	1,21	0,66
Média	0,98	0,79
Desvio Padrão	0,27	0,22
p	0,0904	

Apêndice 04

Dosagens de Proteína C Reativa

Metodologia

Princípio:

- A reação permite quantificar, mediante um método turbidimétrico, a concentração de PCR presente na amostra. As partículas de poliestireno recobertas com anti-PCR se misturam com a amostra formando agregados em presença de PCR. O processo de aglutinação que se forma provoca um aumento do tamanho das partículas e conseqüentemente um aumento da absorvância, que é medida por comparação com o calibrador de concentração conhecida.

Método

- Automatizado utilizando o equipamento Dimension – RXL - Siemens® com reativos específicos RCRP, sendo os resultados emitidos em mg/dl.

TABELA 15: RESULTADOS INDIVIDUAIS DAS DOSAGENS DE PROTEÍNA C REATIVA (MG/ML)

Grupos	Proteína C Reativa	
	Grupo Uremia	Grupo Simulação
1	0,01	0,01
2	0,01	0,01
3	0,01	0,01
4	0,01	0,01
5	0,01	0,01
6	0,37	0,01
7	0,25	0,01
8	0,41	0,01
9	0,36	0,01
10	0,65	0,01
Média	0,21	0,01
Desvio Padrão	0,23	0,00
p	0,0142	

Apêndice 05**Avaliação histopatológica da formação de tecido de granulação****TABELA 16: RESULTADOS DAS LEITURAS HISTOPATOLÓGICAS, EM TRIPLICATAS, DA AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE TECIDO DE GRANULAÇÃO**

Grupo Simulação												
Ratos	Crosta Fibrinoleucocitária			MX	Reepitelização de bordas			MX	Proliferação angiofibroblástica			MX
	L1	L2	L3		L1	L2	L3		L1	L2	L3	
1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2,00
2	1	1	1	1	1	1	2	1,33	2	2	2	2,00
3	1	1	1	1	2	2	1	1,67	1	1	2	1,33
4	1	1	1	1	1	2	2	1,67	2	2	1	1,67
5	1	1	1	1	2	1	1	1,33	2	2	1	1,67
6	1	1	1	1	2	2	2	2,00	2	2	1	1,67
7	1	1	1	1	1	2	2	1,67	2	2	2	2,00
8	1	1	1	1	2	2	1	1,67	2	1	2	1,67
9	1	1	1	1	2	2	2	2,00	1	2	2	1,67
10	1	1	1	1	2	2	1	1,67	2	2	2	2,00
Média	1			1	p=0,6469			1,70	p=0,8447			1,77
DP	1			0	p=0,6469			0,25	p=0,8447			0,22
Grupo Uremia												
Ratos	Crosta Fibrinoleucocitária			MX	Reepitelização de bordas			MX	Proliferação angiofibroblástica			MX
	L1	L2	L3		L1	L2	L3		L1	L2	L3	
1	1	1	1	1	1	1	1	1,00	1	2	1	1,00
2	1	1	1	1	1	1	1	1,00	2	2	1	1,00
3	1	1	1	1	1	2	2	1,67	2	1	1	1,33
4	1	1	1	1	1	1	1	1,00	2	2	2	2,00
5	1	1	1	1	1	1	1	1,00	2	2	2	2,00
6	1	1	1	1	1	1	2	1,33	2	1	1	1,33
7	1	1	1	1	1	1	1	1,00	1	1	2	1,33
8	1	1	1	1	1	1	1	1,00	2	2	2	2,00
9	1	1	1	1	2	2	2	2,00	1	1	2	1,33
10	1	1	1	1	2	2	2	2,00	1	1	1	1,00
Média	1			1	p=0,6469			1,30	p=0,8860			1,43
DP	1			0	p=0,6469			0,43	p=0,8860			0,42

Legenda: L2, L3= triplicatas das leituras microscópicas executadas; p= significância estatística

Ao serem comparadas estatisticamente, pelo método de ANOVA, as médias e os desvios padrões entre os escores, conforme os critérios adotados nas três leituras microscópicas das amostras dos grupos uremia e simulação (tabela 16), obtiveram-se valores considerados não significantes permitindo a validação dos resultados.

Apêndice 06

Avaliação histométrica computadorizada para quantificação porcentual de colágenos I e III

Metodologia

1. Com as lâminas coradas pelo método de Picro-Sirius, focalizá-las no microscópio, escolhendo-se três diferentes campos para cada leitura nas regiões direita, central e esquerda da lâmina.
2. Ajustar o aparelho no ícone *Calibration*, com objetiva regulada para uma dimensão 20 vezes maior.
3. Selecionar o ícone menu *Acquire* e submenu vídeo-digital *Capture*, acionando o modo *Preview* para capturar a imagem mais adequada e em seguida, clicar em *Snap*, em cujo arquivo as imagens são congeladas devidamente.
4. Calibrar o sistema orientando-se pela densidade ótica dos pontos de resolução (*pixels*) que formam as imagens, escolhendo-se o valor limite de melhor resolução (*threshold*).
5. Identificar cada imagem clicando no menu *File*, submenu *Save As* (salvar como), identificando-se cada animal e respectivo campo em arquivo específico para os registros do estudo.
6. Selecionar a cor vermelha e com o “conta-gotas”, clicar nas áreas do colágeno até o instante que se obteve, no pequeno quadrado da tela, a imagem em cor magenta uniforme.
7. Em seguida, clicar em *New* e na cor branca. Repetindo-se o processo citado anteriormente, selecionaram-se as cores rosa claro homogêneo, excluindo-se os vasos e clicar em *Close*.
8. Clicar no menu *Measure*, *Select Measurements*, selecionar a área e *Density (mean)* e depois no botão *OK*. Novo clique em *Count*, *View*, *Measurements Data*, *Statistics* e utilizando-se o *File*, *DDE to Excel*, transportaram-se os dados para o Excel, a fim de se proceder à análise estatística.
9. Utilizar o aplicativo *Image-Pro Plus* e analisar as porcentagens de colágeno maduro (tipo I) e do imaturo (tipo III). As fibras colágenas mais espessas e fortemente birrefringentes tingiram-se com alaranjado e vermelho (tipo I), e as fibras mais finas e fracamente birrefringentes com amarelo e verde (tipo III).
10. Calcular a média das porcentagens em cada lâmina, e o valor do colágeno total correspondente à soma das áreas vermelhas e verdes.
11. Em seguida, clicar em *Count and Measure Objects*, *Count Size* e no *Select Colors*. Utilizando o ícone conta-gotas, color inicialmente com pincel 3X3 e depois com 1X1, recorrendo-se à coloração azul, os locais em que se observou coloração alaranjada e vermelha.

12. A seguir, selecionar *New*, *Class 2* e color em magenta o local que apresentava tanto a cor amarela, quanto a cor verde.
13. Os números representativos da área (em micra) e da porcentagem de colágeno tipo I e do tipo III deverão ser transferidos ao Excel para análise estatística.
14. Para a obtenção dos resultados, as leituras histométricas dos três campos microscópicos serão comparadas estatisticamente pelo método de ANOVA para validação, e se for obtido $p > 0,05$ será calculada a média aritmética de cada amostra e a média do grupo com desvio padrão.

TABELA 17: RESULTADOS INDIVIDUAIS DAS AVALIAÇÕES HISTOMÉTRICAS COMPUTADORIZADAS EM TRIPLICATAS PARA QUANTIFICAÇÃO PORCENTUAL DE COLÁGENOS I E III

	Colágeno I				Colágeno III			
	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Média	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Média
Simulação	86,46	86,89	88,19	87,18	13,54	14,66	15,21	14,47
	98,57	99,06	99,65	99,10	1,43	2,52	1,87	1,94
	63,35	73,77	62,65	66,59	36,65	35,21	35,78	35,88
	74,86	75,23	75,68	75,26	25,14	26,78	23,14	25,02
	94,22	95,12	93,18	94,17	5,78	6,47	8,57	6,94
	61,93	62,24	62,61	62,26	38,07	35,87	33,64	35,86
	83,96	84,38	83,04	83,79	16,04	15,23	14,73	15,33
	88,37	88,81	87,40	88,19	11,63	13,14	12,24	12,34
	64,23	62,17	64,94	63,78	35,77	35,21	36,21	35,73
	98,29	98,78	96,82	97,96	1,71	2,14	2,15	2,00
MX±DP	Validação $p=0,9752$			81,83	Validação $p=0,9982$			18,55
				13,64				13,69
Uremia	Colágeno I				Colágeno III			
	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Média	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Média
	43,22	44,12	43,15	43,50	54,78	53,85	57,85	55,49
	56,23	55,63	55,21	55,69	41,77	41,79	45,79	43,12
	66,23	67,23	67,58	67,01	31,77	29,42	33,42	31,54
	65,32	63,21	65,17	64,57	32,68	31,83	35,83	33,45
	55,21	55,13	55,65	55,33	42,79	41,35	45,35	43,16
	63,22	65,32	62,32	63,62	34,78	34,68	38,68	36,05
	58,94	61,24	57,74	59,31	39,06	39,26	43,26	40,53
	66,21	66,45	65,14	65,93	31,79	31,86	35,86	33,17
72,21	71,23	71,62	71,69	25,79	25,38	29,38	26,85	
63,87	69,32	70,36	67,85	34,13	26,64	30,64	30,47	
MX±DP	Validação $p=0,9755$			61,45	Validação $p=0,5661$			37,38
				8,22				8,38

Ao serem comparadas estatisticamente, pelo método de ANOVA, as médias e os desvios padrões entre as porcentagens demonstradas na tabela 17, obtiveram-se valores considerados não significantes permitindo a validação dos resultados.

Apêndice 07

Avaliação histométrica computadorizada da densidade microvascular

Metodologia

A avaliação imunohistoquímica e histométrica da densidade microvascular em amostras de tecido muscular cicatricial foi realizada de acordo com a metodologia padronizada no Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Empregou-se o método da Estreptavidina-Biotina-Peroxidase, com anticorpos comerciais (Biotin anti-CD34 antibody clone QBEnd/10[®], Dako Corporation Glostrup Denmark) diluído a 1:100), de acordo com as especificações do fabricante:

1. Controles:
 - 1.1. Humano: sempre usar (prova a eficiência do anticorpo)
 - 1.2. Específico do animal (prova reatividade do material)
 - 1.3. Negativo: sempre usar (possível reação inespecífica: não recebe anticorpo)
2. Secagem das lâminas a 37°C por 12 horas.
3. Desparafinização: usar xilol em temperatura ambiente (2x 10 min); álcool etílico absoluto (3x 1 min); álcool etílico 80% (1x 1 min)
4. Bloqueio da peroxidase endógena: solução de peróxido de hidrogênio e metanol 5% (diluir o peróxido em metanol). Lavar em água destilada.
5. Recuperação antigênica: Levar as lâminas mergulhadas em recuperador Imuno Retrivel (Dako[®]) à cuba de banho-maria à 99°C por 40 min. Após, deixar esfriar à temperatura ambiente.
6. Lavar em água destilada, e riscar lâmina por lâmina com caneta hidrofóbica Dako pen (Dako[®]), delimitando a área do corte. Até pingar as alíquotas deixar em tampão TBS tris pH 7,3, evitando a secagem do corte.
7. Pingar as alíquotas de anticorpos e levar em câmara úmida em temperatura de 4 a 8°C por 12 horas.
8. Lavar as lâminas em tampão TBS tris pH 7,3 e deixar no tampão por 15 min.
9. Lavar novamente em tampão, secar e pingar Advance link (Dako[®]) e deixar por 30 min.
10. Lavar em tampão e pingar Advance enzyme (Dako[®]) e deixar por 30 min.
11. Lavar em tampão, secar e pingar cromógeno DAB (1:1) até a visualização da cor castanha e lavar rápido em água destilada.
12. Contracorar com Hematoxilina de Harris por 5 min. Lavar em água da torneira e deixar por 5 min.
13. Desidratar com álcool etílico absoluto (3x 1 min.)
14. Diafanizar com xilol (3 x 5 min).
15. Montar as lâminas.

16. Nas leituras histométricas quantificam-se os núcleos celulares corados de azul, os quais representam células em repouso; e os corados de marrom, que identificam as células em proliferação cada campo tinha uma área de 7.578,94 μ^2 .
17. As reações foram consideradas positivas, quando se detectou reação marrom, excluindo-se as prováveis áreas de coloração de fundo, representando a densidade microvascular tecidual. Para cada caso foram analisadas em cem células a porcentagem CD34 positivas.
18. Para a obtenção dos resultados, as leituras histométricas dos três campos microscópicos foram comparadas estatisticamente pelo método de ANOVA para validação, e se obtido $p > 0,05$ foram calculadas as médias aritméticas de cada amostra e a média do grupo com desvio padrão.

TABELA 18: RESULTADOS INDIVIDUAIS DAS AVALIAÇÕES HISTOMÉTRICAS COMPUTADORIZADAS EM TRIPLICATAS PARA QUANTIFICAÇÃO DA DENSIDADE MICROVASCULAR

Grupo Simulação				
Ratos	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Média
1	521,20	525,37	520,78	522,45
2	578,30	582,93	577,84	579,69
3	686,58	692,07	686,03	688,23
4	306,20	308,65	305,96	306,93
5	452,80	456,42	452,44	453,89
6	676,30	681,71	675,76	677,92
7	554,08	558,51	553,64	555,41
8	442,32	445,86	441,97	443,38
9	521,14	525,31	520,72	522,39
10	425,47	428,87	425,13	426,49
Média	Validação p=0,9954			517,68
DP				116,62
Grupo Uremia				
Ratos	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Média
1	381,52	386,21	381,71	383,15
2	423,32	428,52	423,53	425,12
3	502,58	508,76	502,83	504,72
4	224,14	226,90	224,25	225,09
5	331,45	335,53	331,62	332,86
6	495,05	501,14	495,30	497,16
7	405,59	410,58	405,79	407,32
8	323,78	327,76	323,94	325,16
9	381,47	386,17	381,67	383,10
10	311,44	315,27	311,60	312,77
Média	Validação p=0,9906			379,65
DP				85,52

Ao serem comparadas estatisticamente, pelo método de ANOVA, as médias e os desvios padrões entre as porcentagens demonstradas na tabela 18, obtiveram-se valores considerados não significantes permitindo a validação dos resultados.

Apêndice 08

Avaliação histométrica computadorizada do antígeno celular de proliferação nuclear (PCNA)

Metodologia

1. Os cortes foram desparafinizados, hidratados e mergulhados em tampão fosfato.
2. Após a recuperação antigênica com tampão citrato e bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 0,3%, os anticorpos primários monoclonais anti-PCNA foram aplicados sobre os cortes e incubados durante a noite. O anticorpo primário utilizado foi o PC10 (Dako Corporation, Glostrup, Denmark), anti-PCNA, diluído em 1:100 e incubado por 18 horas a 4°C.
3. Em seguida, os cortes foram enxaguados em tampão fosfato e anticorpo secundário biotilado foi aplicado e incubado por 60 minutos. Após novo enxágüe, o complexo estreptavidina-peroxidase foi aplicado e a reação imunohistoquímica foi revelada com a aplicação de diaminobenzidina. Após contracoloração com hematoxilina, os cortes foram desidratados, diafanizados e cobertos com lamínulas de vidro com bálsamo do Canadá.
4. As reações foram consideradas positivas, quando se detectou reação marrom, excluído-se as prováveis áreas de coloração de fundo. Para o PCNA o padrão de reação foi nuclear.
5. Quantificam-se os núcleos celulares da superfície epitelial e das criptas das glândulas, corados de azul, os quais representam células em repouso; e os corados de marrom, que identificam as células em proliferação da fase G1 tardia até a fase M da G2. Com microscópio óptico e aumento de 1000 X (imersão), utilizando o programa de captura de imagens *Image Pro-Plus*® versão 4.5 – Mídia Cybernetics, contaram-se os núcleos positivos e negativos de 2 campos à direita e 2 à esquerda da linha de anastomose e de 2 criptas glandulares, à direita e à esquerda, nos cortes e obteve-se o percentual dos núcleos positivos e negativos, ou seja, em replicação e em repouso. Cada campo tinha uma área de 7.578,94 μ^2 .
6. A análise quantitativa foi feita por meio de imagens microscópicas captadas por uma câmara JVC TK-1270/RGB, digitalizadas no aumento de 1.000x, através do *software* KS300, contido no analisador de imagens Kontron Elektronik/Carl Zeiss. Para cada caso foram analisadas em cem células a porcentagem PCNA positivas.

TABELA 19: RESULTADOS INDIVIDUAIS DAS AVALIAÇÕES HISTOMÉTRICAS COMPUTADORIZADAS EM TRIPPLICATAS PARA QUANTIFICAÇÃO DO ANTÍGENO CELULAR DE PROLIFERAÇÃO NUCLEAR

Grupo Simulação				
Ratos	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Média
1	321,10	328,61	325,92	394,69
2	458,30	469,02	465,17	400,56
3	332,70	340,49	337,69	319,94
4	299,10	306,10	303,59	292,70
5	278,30	286,65	282,47	317,36
6	347,80	355,94	353,02	464,52
7	569,50	582,83	578,04	512,68
8	442,90	453,26	449,54	488,19
9	521,14	533,33	528,96	479,36
10	425,47	435,43	431,85	430,92
Média	Validação p=0,8754			410,09
DP				78,64
Grupo Uremia				
Ratos	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Média
1	235,05	240,55	238,57	178,79
2	335,48	343,33	340,51	255,33
3	243,54	249,24	247,19	185,74
4	218,94	224,06	222,23	167,31
5	203,72	208,48	206,77	155,99
6	254,59	260,55	258,41	194,89
7	416,87	426,63	423,13	318,41
8	324,20	331,79	329,07	248,26
9	381,47	390,40	387,20	292,02
10	311,44	318,73	316,12	239,07
Média	Validação p=0,7451			223,58
DP				55,31

Ao serem comparadas estatisticamente, pelo método de ANOVA, as médias e os desvios padrões entre as porcentagens demonstradas na tabela 19, obtiveram-se valores considerados não significantes permitindo a validação dos resultados.

Apêndice 09

Avaliação histométrica computadorizada de miofibroblastos

Metodologia

A avaliação imunoistoquímica e histométrica da densidade tecidual de miofibroblastos em amostras de tecido muscular cicatricial foi realizada de acordo com a metodologia padronizada no Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Empregou-se o método da Estreptavidina-Biotina-Peroxidase, com anticorpos comerciais (Biotin anti- α SMA antibody clone PJC10[®], Dako Corporation Glostrup Denmark) diluído a 1:400), de acordo com as especificações do fabricante:

1. Controles:
 - 1.1. Humano: sempre usar (prova a eficiência do anticorpo)
 - 1.2. Específico do animal (prova reatividade do material)
 - 1.3. Negativo: sempre usar (possível reação inespecífica: não recebe anticorpo)
2. Secagem das lâminas a 37°C por 12 horas.
3. Desparafinização: usar xilol em temperatura ambiente (2x 10 min); álcool etílico absoluto (3x 1 min); álcool etílico 80% (1x 1 min)
4. Bloqueio da peroxidase endógena: solução de peróxido de hidrogênio e metanol 5% (diluir o peróxido em metanol). Lavar em água destilada.
5. Recuperação antigênica: Levar as lâminas mergulhadas em recuperador Imuno Retrifer (Dako[®]) à cuba de banho-maria à 99°C por 40 min. Após, deixar esfriar à temperatura ambiente.
6. Lavar em água destilada, e riscar lâmina por lâmina com caneta hidrofóbica Dako pen (Dako[®]), delimitando a área do corte. Até pingar as alíquotas deixar em tampão TBS tris pH 7,3, evitando a secagem do corte.
7. Pingar as alíquotas de anticorpos e levar em câmara úmida em temperatura de 4 a 8°C por 12 horas.
8. Lavar as lâminas em tampão PBS tris pH 7,3 e deixar no tampão por 15 min.
9. Lavar novamente em tampão, secar e pingar Advance link (Dako[®]) e deixar por 30 min.
10. Lavar em tampão e pingar Advance enzyme (Dako[®]) e deixar por 30 min.
11. Lavar em tampão, secar e pingar cromógeno DAB (1:1) até a visualização da cor castanha e lavar rápido em água destilada.
12. Contracorar com Hematoxilina de Harris por 5 min. Lavar em água da torneira e deixar por 5 minutos.
13. Desidratar com álcool etílico absoluto (3x 1 min.)
14. Diafanizar com xilol (3 x 5 min).
15. Montar as lâminas.

16. Nas leituras histométricas quantificam-se os núcleos celulares corados de azul, os quais representam células em repouso; e os corados de marrom, que identificam as células em proliferação cada campo tinha uma área de $7.578,94 \mu^2$.
17. As reações foram consideradas positivas, quando se detectou reação marrom, excluindo-se as prováveis áreas de coloração de fundo, representando a densidade microvascular tecidual.
18. Para a obtenção dos resultados, as leituras histométricas dos três campos microscópicos foram comparadas estatisticamente pelo método de ANOVA para validação, e se obtido $p > 0,05$ foram calculadas as médias aritméticas de cada amostra e a média do grupo com desvio padrão.

TABELA 20: RESULTADOS INDIVIDUAIS DAS AVALIAÇÕES HISTOMÉTRICAS COMPUTADORIZADAS EM TRIPLICATAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE MIOFIBROBLASTOS

Grupo Simulação				
Ratos	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Média
1	252,38	224,32	274,79	250,50
2	308,13	376,52	537,28	407,31
3	412,30	512,70	254,60	393,20
4	397,20	226,70	324,10	316,00
5	553,10	328,70	223,70	368,50
6	247,32	249,30	247,12	249,10
7	336,40	339,09	336,13	338,82
8	367,91	370,85	367,62	370,56
9	457,21	460,87	456,84	460,50
10	358,14	361,01	357,85	360,72
Média	Validação $p=0,7510$			351,52
DP				66,32
Grupo Uremia				
Ratos	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Média
1	127,01	151,26	125,41	134,56
2	218,32	192,98	209,10	206,80
3	78,90	237,50	148,60	155,00
4	124,70	189,60	245,30	186,53
5	321,90	136,50	114,70	191,03
6	244,56	246,52	244,36	245,15
7	247,23	249,21	247,03	247,82
8	198,74	200,33	198,58	199,22
9	188,32	189,83	188,17	188,77
10	293,54	295,89	293,31	294,24
Média	Validação $p=0,9640$			204,91
DP				46,80

Ao serem comparadas estatisticamente, pelo método de ANOVA, as médias e os desvios padrões entre as porcentagens demonstradas na tabela 20, obtiveram-se valores considerados não significantes permitindo a validação dos resultados.

Anexo

Anexo 1

Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa em Animais



HOSPITAL E MATERNIDADE ANGELINA CARON
Comissão de Ética em Pesquisa em Animais

Campina Grande do Sul, 21 de junho de 2010

Protocolo 08/10

De Comissão de Ética em Pesquisa em Animais
Para Dr. Carlos Eduardo da Silva
Assunto Parecer (referência projeto)

1. Título do projeto

Efeitos da disfunção renal na cicatrização de anastomoses colônicas. Estudo experimental em ratos Wistar

2. Relator

Dr. Carlos José Franco de Souza

3. Animais a serem utilizados

25 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar

4. Avaliação dos procedimento (s) previsto (s) :

Procedimento(s)	Avaliação / sugestão(s)
Condições gerais do experimento	Satisfatória
Concepção ética do estudo	Satisfatória
Anestesia: Executada em duas etapas, a primeira, pré-anestesia inalatória com halotano (Tanohalo-Cristália®). A segunda, a anestesia propriamente dita, com a associação xilazina 10 mg/Kg associado a Ketamina 100 mg/Kg por via intramuscular nas panturrilhas.	Satisfatória
Procedimentos cirúrgicos: Nefrectomia 5/6, colotomia e colorrafia conforme descrição prévia de Vianna e colaboradores em 1981, com a utilização de eletrocautério de argônio.	Satisfatório
Analgesia e Antibioticoterapia: analgesia pós-operatória com dipirona 25 mg.	Satisfatório
Morte dos ratos e coleta de amostras: Após 10 dias da colotomia e colorrafia os animais serão submetidos à inalação com halotano (Tanohalo-Cristália®) para posterior punção intracardíaca e exanguinação. Após a evidência da morte dos ratos será procedida do segmento colônico anastomosado.	Satisfatório
Biossegurança: Serão respeitadas as normas de Biossegurança previstas para a manipulação de animais de laboratório. As carcaças serão removidas para o expurgo hospitalar e transportadas para o aterro sanitário de Curitiba conforme protocolos institucionais.	Satisfatório Sugerimos envolver cada carcaça em sacos plásticos de lixo hospitalar e fechá-los de maneira hermética.
O autor se compromete a envolver neste experimento somente profissionais com experiência comprovada nesta metodologia e cumprir com rigor as normas de manejo ético dos animais.	Satisfatório

Parecer Final :

Todos os procedimentos analisados pela Comissão de Ética em Pesquisa foram considerados satisfatórios, sendo este protocolo autorizado para sua execução nas dependências do centro de experimentação animal deste hospital.

Dr. Carlos José Franco de Souza