

Aspectos histopatológicos de rins de cães submetidos à isquemia e reperfusão após uso de clorpromazina

Mariana Moreira Andraschko¹, Liliana Borges de Menezes², Marina Pacheco Miguel¹, Tatyane Penha Sales¹, Marcelo Seixo de Brito e Silva¹, Maria Clorinda Soares Fioravanti¹, Luiz Augusto Batista Brito¹, Eugênio Gonçalves de Araújo¹

1. Escola de Veterinária (mari.a.moreira@hotmail.com)
2. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

Palavras-chave: insuficiência renal aguda, pré-condicionamento, necrose tubular

INTRODUÇÃO

O rim é um órgão altamente complexo contendo componentes bem definidos, que funcionam de forma coordenada, permitindo uma apropriada regulação de vários processos interdependentes (LIEBERTHAL & NIGAM, 2000).

No rim, a lesão induzida por isquemia e reperfusão é o principal fator etiológico da insuficiência renal aguda (IRA) (BRITO et al., 2005). Quanto maior o tempo de isquemia, maior a repercussão clínica (COSTA et al., 2003). A oclusão temporária da artéria renal unilateral produz falha renal aguda isquêmica unilateral, esta situação é similar a injúria renal isquêmica que acontece durante a cirurgia renal (TSUJI et al., 1993).

Sabe-se que o dano celular na síndrome isquêmico-reperfusional é decorrente de alterações da estrutura das membranas lipídicas da célula e de suas organelas, que são conseqüência de processos iniciados já na fase de isquemia, porém intensificados durante a reperfusão tecidual (BRITO et al., 2005). Na reperfusão, com o aporte de oxigênio, as lesões se exacerbam pelo fato dessas células já estarem metabolicamente comprometidas não tendo, portanto, a capacidade de exercer suas funções no sentido de manter o equilíbrio iônico e suas defesas antioxidantes (FEITOSA et al., 2005).

A IRA é caracterizada por disfunção tubular, prejudicando a reabsorção de água e sódio, associada à lesão das bordas em escova dos túbulos proximais e presença de células tubulares na urina (SCHRIER et al., 2004). A insuficiência

renal tem como substrato anatômico a necrose tubular aguda (NTA). Associado à morte celular por necrose, genes reguladores da apoptose também são ativados culminando com a perda maior de células ao longo dos segmentos dos néfrons o que contribui para o estabelecimento da insuficiência renal (FEITOSA et al., 2005). As células tubulares proximais têm capacidade glicolítica reduzida e são mais suscetíveis à privação de ATP, do que as células do túbulo distal e da alça ascendente de Henle (PERES et al., 2005).

É bem conhecido o fato de que alterações morfológicas compatíveis com necrose isquêmica de células tubulares renais são verificadas após pelo menos 30 minutos de isquemia e com mais de uma hora de reperfusão. As modificações, reflexo da irreversibilidade da injúria, consistem na presença de alterações nucleares como picnose, cariólise ou cariorréxis associada com a homogeneidade e acidofilia citoplasmática. É bem conhecido o fato que muitas vezes as células agredidas ainda conseguem sobreviver apresentando somente alterações subletais que consistem em degeneração hidrópica ou vacuolar com modificações metabólicas discretas, mas ainda compatíveis com a sobrevivência celular (FEITOSA et al., 2005). Outra distinta característica histológica na NTA isquêmica é a presença de descamação, predominantemente localizada nos segmentos distais do néfron. A descamação que ocorre na NTA pode contribuir para insuficiência renal ao causar obstrução intratubular (LIEBERTHAL & NIGAM, 2000).

De acordo com VIANNA (2006), o pré-condicionamento farmacológico consiste no uso de fármacos para modular os mecanismos de isquemia/reperfusão. Para LIEBERTHAL & NIGAM (2000) as intervenções terapêuticas atuam prevenindo a IRA ao diminuir a severidade das injúrias tubulares, resultantes de causas isquêmicas ou tóxicas, ou ao acelerar a recuperação da NTA estabelecida.

A biópsia renal convencional, percutânea ou cirúrgica, tem sido o melhor método para o diagnóstico patológico, pois fornece dados sobre a celularidade e permite a diferenciação de duas das situações clínicas mais comuns no pós-transplante renal: a necrose tubular aguda e a rejeição celular (HURAI & GOLDBERG, 1989).

Vários estudos utilizaram a clorpromazina como protetor de lesão de isquemia e reperfusão (CHIEN et al., 1977; NETTO et al. 2001). A clorpromazina

pertence ao grupo dos tranqüilizantes maiores e pode ser classificada, de acordo com sua estrutura química, como derivados fenotiazínicos. Estes são utilizados principalmente como medicação pré-anestésica, potencializadores da analgesia (neuroleptoanalgesia) e como antieméticos. Como tranquilizantes maiores possuem alto índice terapêutico, sendo, portanto, medicamentos bastantes seguros. A dose terapêutica indicada para aplicação intravenosa varia entre 0,5 e 4,0 mg/kg para cães e gatos (SPINOSA et al., 1999).

Em resumo, a isquemia induz alterações estruturais e funcionais na superfície das membranas das células tubulares o que é em grande parte responsável pela disfunção das células e do órgão (MOLITORIS & BACALLAO, 1999).

Este trabalho teve por objetivo verificar as alterações morfológicas sob microscopia óptica de luz em diferentes tempos de isquemia e reperfusão renal, tratados ou não com clorpromazina.

METODOLOGIA

Animais de experimentação

Foram utilizados 12 animais da espécie canina (*Canis familiaris* – Linnaeus, 1758), sem raça definida, machos, com peso corpóreo entre 10 e 25 kg, obtidos junto ao Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de Goiânia e transferidos para o canil de Experimentação Científica da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Previamente ao estudo experimental, os cães foram avaliados clinicamente para a identificação de enfermidades sistêmicas e renais que poderiam interferir nos resultados. Foi realizada ainda colheita de urina e sangue para hemograma e pesquisa de hematozoários, conforme rotina do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UFG, para ratificação das condições de higiene orgânica.

Os animais foram divididos em dois grupos de seis indivíduos:

Grupo A: cães adultos com isquemia e reperfusão sem clorpromazina

Grupo B: cães adultos com isquemia e reperfusão tratados por clorpromazina

A utilização dos animais foi feita de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (GOLDENBERG, 2000) e Código de Ética no Uso Científico de Animais (DUNIN & SOUZA, 1996).

Procedimento cirúrgico

Todos os animais tiveram indução anestésica pela aplicação de propofol I.V (Propovan, Cristália, São Paulo) e manutenção anestésica com halotano (Halotano, Hoechst do Brasil, São Paulo) e realizada uma incisão paracostal esquerda para identificação e isolamento do rim esquerdo e da artéria renal esquerda. Após o isolamento da artéria, os animais de todos os grupos tiveram o vaso clampado com auxílio de uma pinça Satinsky. Os animais do grupo B receberam clorpromazina (Amplictil, Aventis Pharma, São Paulo) via endovenosa, na dose de 5 mg/kg, 15 min antes da clampagem do vaso, que foi por 1 h. Após este período, as artérias renais foram desobstruídas e os órgãos permaneceram em reperfusão por 2 h. Todos os animais foram doados ao final do experimento.

Amostras

Em cada grupo foram extraídas seis amostras de parênquima renal, do rim esquerdo, com utilização de agulha *tru-cut* durante o procedimento cirúrgico, de acordo com o esquema indicado pela figura 1.

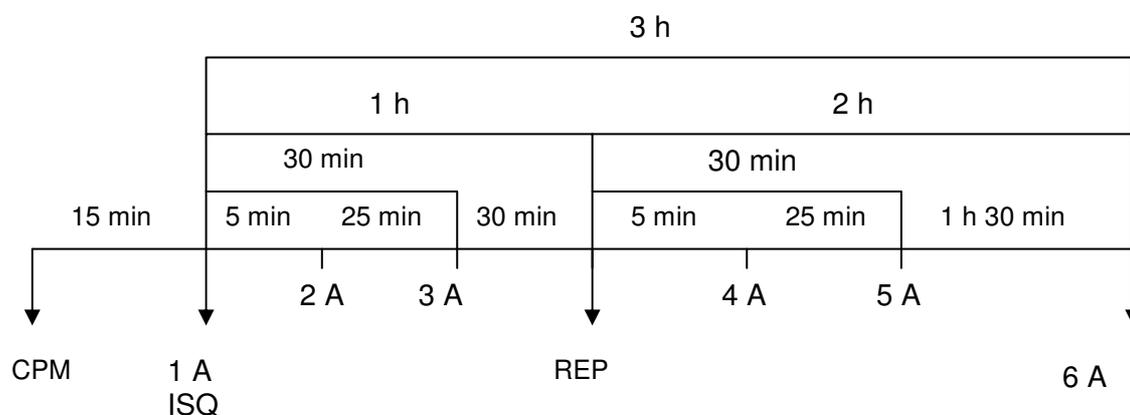


FIGURA 1 - Representação esquemática dos momentos de colheita das amostras. Onde: A= amostra; CPM= Clorpromazina; ISQ= Isquemia; REP= Reperfusão

As amostras foram identificadas, fixadas e armazenadas em frascos individuais contendo formol tamponado a 10%, que após o fechamento foram deixados à temperatura ambiente durante 12 horas. As amostras foram então colocadas em caixas plásticas individuais (unicassetes) mantidos por mais 12h, posteriormente os unicassetes contendo as amostras foram lavados em água corrente por 15 min, colocadas em álcool 70%, e permaneceram nesse conservante aguardando o processamento histológico.

O estudo histológico foi realizado de acordo com FEITOSA et al. (2005), compreendendo uma análise descritiva e semi-quantitativa, sendo que o estudo descritivo abrangeu de uma análise do compartimento glomerular, compartimento tubular e compartimento intersticial renal. Analisou-se no compartimento tubular a presença de degeneração hidrópica, descamação celular e alterações nucleares (picnose, cariorrexe, cariólise associadas com a homogeneidade e acidofilia citoplasmática) e no compartimento intersticial edema, congestão capilar, hemorragia intersticial e inflamação.

A avaliação semiquantitativa de cada parâmetro foi feito às cegas, sendo analisados cinco campos corticais e cinco campos medulares de cada animal, utilizando aumento de 400 X.

A quantificação foi feita com escores de zero a três, correspondendo à ausência de alterações - 0, alteração leve - 1, moderada - 2 e acentuada - 3.

Ainda conforme a metodologia de FEITOSA et al. (2005), os resultados foram expressos como índice de lesão intersticial e índice de lesão tubular, correspondendo ao somatório de pontos conferidos para cada parâmetro correspondente, onde o valor Máximo para o índice de lesão intersticial foi 12 e para o índice de lesão tubular foi 27, pois cada alteração foi observada separadamente nos TCP, TCD e componentes medulares.

Para análise estatística foram aplicados teste de Mann-Whitney, análise de variância por posto de Kruskal-Wallis, assinalando com um asterisco os valores significantes, como também foi realizado por FEITOSA et al. (2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este projeto de pesquisa foi concebido no sentido de auxiliar na elucidação de algumas questões quanto à lesão de isquemia e reperfusão renal.

Além disso, há anos têm-se os princípios do uso de animais como modelo de estudo e transposição para humanos. Os estudos podem não só avaliar o procedimento em si, como de suas conseqüências fisiopatológicas e de sua eficácia terapêutica. Conforme KARAMAN et al. (2006) a isquemia/reperfusão de um órgão ou tecido resulta em dano celular, provocando uma complexa série de eventos bioquímicos que afetam a estrutura e a função de praticamente todas as organelas e sistemas subcelulares das células afetadas. Danos celulares resultantes da ação de radicais livres podem ocorrer quando, na reperfusão, o oxigênio volta a suprir o tecido e a formação de radicais de oxigênio excede a capacidade de detoxificação das células renais. Numerosos processos estão implicados na patogênese da indução de danos celular devido a privação de oxigênio. Isso inclui a geração de espécies reativas do oxigênio, depleção de ATP, infiltração de neutrófilos, ativação de fosfolipases e alteração da membrana lipídica, alteração do citoesqueleto e acúmulo de cálcio intracelular. Assim, os mecanismos implícitos nas lesões de isquemia/reperfusão nos rins são multifatoriais e interdependentes, envolvendo hipóxia, resposta inflamatória e danos induzidos por radicais livres.

As alterações morfológicas encontradas no presente estudo, foram semelhantes nos dois grupos, para os diferentes tempos. As amostras 1A apresentaram histologia preservada semelhante ao normal. Segundo SCHRIER et al. (2004), a necrose tubular é vista apenas em algumas células tubulares e as vezes, esta não é detectada, no entanto, a morfologia glomerular é sempre normal, o que também foi visto neste trabalho.

Já nas amostras 2A e 3A foi percebida uma discreta presença de degeneração nos túbulos contorcidos proximais, que tornou-se moderada nas amostras 4A e 5A intensificando na ultima amostra (6A), comportamento semelhante foi encontrado na avaliação da descamação nos TCP. Observou-se a presença de material protéico na luz dos TCP nas amostras 3A e 4A.

A lesão degenerativa e descamação foram encontradas nos TCD somente a partir do momento 4A de intensidade discreta e moderada, mas no final do período de reperfusão (6A) foi acentuada (Figura 2). A tumefação citoplasmática foi encontrada nos túbulos principalmente dos momentos 3A e 4A. Esses achados mostram que as lesões ocorrem predominantemente e

primeiramente nos TCP, o que também foi constatado por MOLITORIS & BACALLAO (1999) e LIEBERTHAL & NIGAM (2000).

Segundo FEITOSA et al (2005), alterações morfológicas compatíveis com necrose isquêmica de células tubulares renais consistem na presença de alterações nucleares como picnose, cariólise ou cariorréxis associada com a homogeneidade e acidofilia citoplasmática. No presente estudo, alterações compatíveis com necrose tubular (acidofilia citoplasmática e picnose) foram encontradas em poucas células tubulares na amostra 6A.

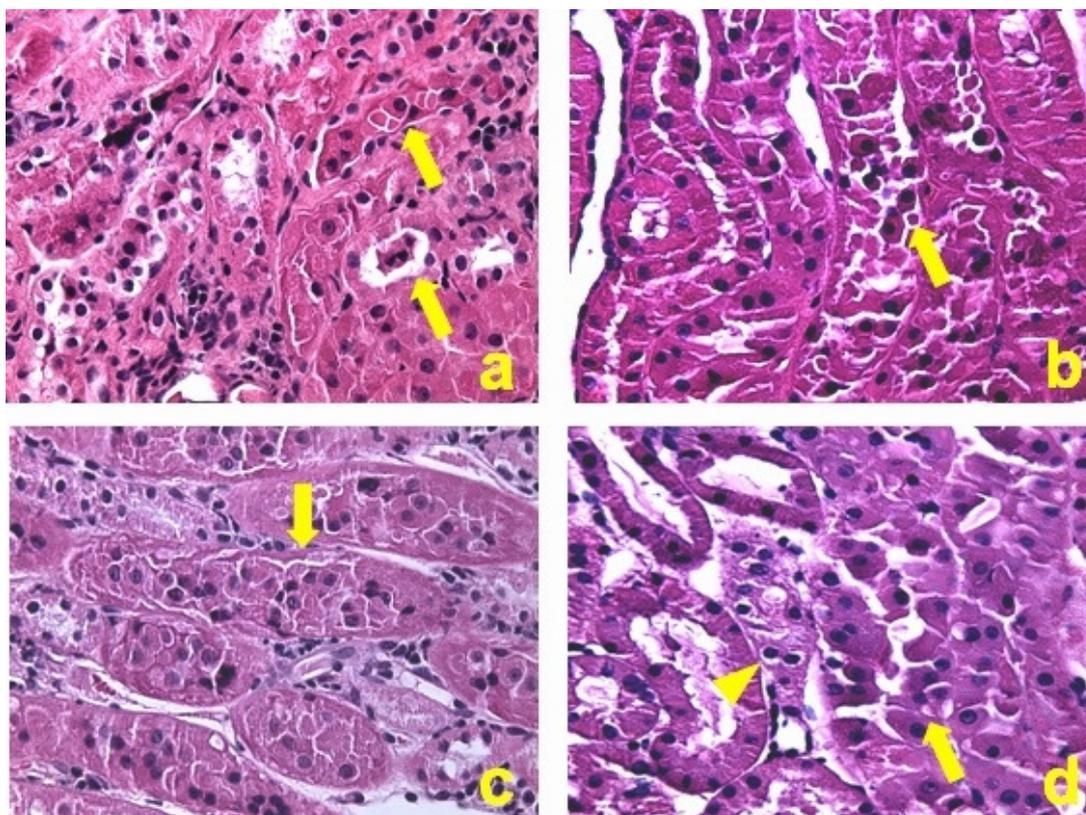


FIGURA 2: Fotomicrografias da região cortical do rim de cães submetidos à isquemia e reperfusão (HE, 400x), evidenciando a descamação celular (seta) no final de 1h de isquemia que é intensificada após o período de reperfusão. (a) amostra 3A do Grupo A; (b) amostra 3A do Grupo B; (c) amostra 6A do Grupo A; (d) amostra 6A do Grupo B (discreta vacuolização é assinalada pela ponta da seta).

Nenhuma alteração foi observada nos componentes medulares dos néfrons, a não ser a presença de debris celulares encontradas a partir das amostras 4A (Figura 3), o que, segundo LIEBERTHAL & NIGAM (2000) é uma distinta característica histológica na NTA isquêmica.

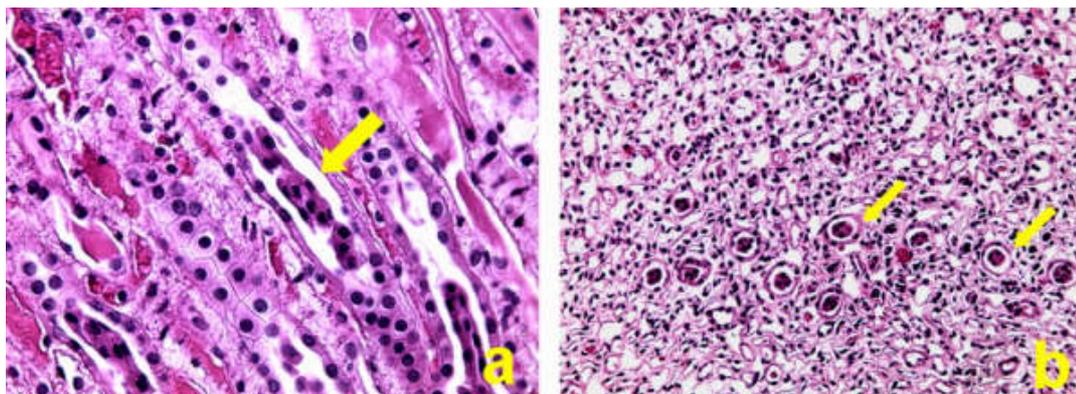


FIGURA 3: Fotomicrografias da região medular do rim de cães submetidos à isquemia e reperfusão (HE), evidenciando presença de debris celulares nas alças de Henle (setas). (a) corte longitudinal da amostra 4A do Grupo B (400x); (b) corte transversal da amostra 4A do Grupo B (200x).

Uma discreta congestão estava presente nas amostras 2A e foi intensificada após 1h de isquemia (3A). Células inflamatórias no interstício foram observadas somente em raros campos de forma discreta e somente no final da reperfusão (6A).

A análise descritiva das lesões renais está representada na figura 4, onde mostra o comportamento semelhante dos dois grupos, ou seja, as lesões foram intensificadas com o processo de isquemia/reperfusão.

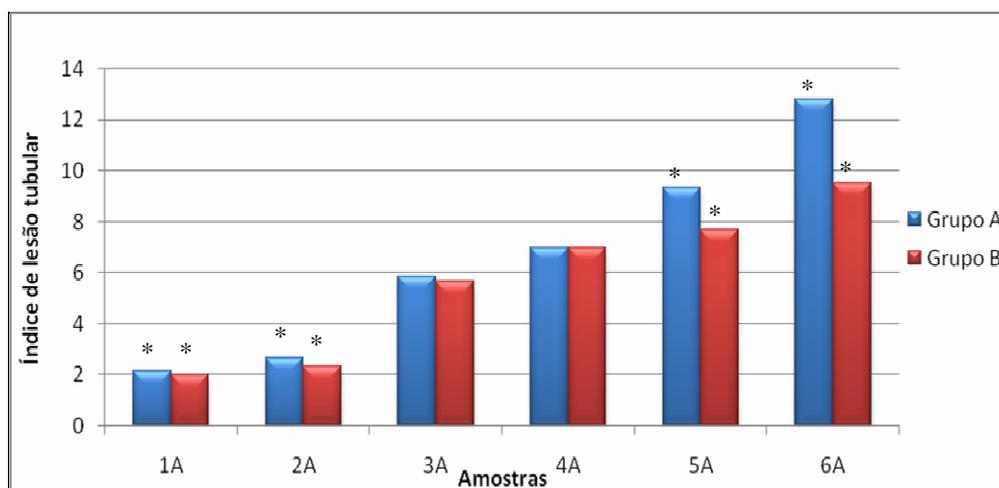


FIGURA 4: Índice de lesão tubular após lesão de isquemia e reperfusão renal em cão tratados ou não com clorpromazina. Onde: os asteriscos evidenciam diferenças significativas entre as amostras 1A/2A de 5A/6A dentro do Grupo A e Grupo B.

A análise estatística demonstrou não haver alteração significativa entre os grupos A e B, mas foi verificada alteração tubular significativa entre as amostras 1A e 6A ($p > 0,05$).

O efeito dos fenotiazínicos na estrutura e função das membranas como bloqueador dos canais de cálcio já é conhecido em outros órgãos, entretanto não foi possível verificar o efeito protetor da clorpromazina mesmo aumentando o tempo de reperfusão e diminuindo o tempo de isquemia como foi sugerido por NETTO et al. (2001).

CONCLUSÃO

A oclusão da artéria renal esquerda em cães está associada a modificações morfológicas renais principalmente na fase de reperfusão.

Não foi possível verificar o efeito protetor da clorpromazina, por meio do histopatológico, quando administrada na dose de 5mg/kg, 15 min antes da isquemia renal com uma hora e meia de duração, e reperfusão por duas horas.

REFERÊNCIAS

ALVES, R., CUNHA, M. F. X., PRATAS, J., PESSA, P., MOTA, A., CAMPOS, M. Estudo da apoptose na transplantação renal. **Revista Portuguesa de Nefrologia e Hipertensão**, n.3, v.18, p.167-177, 2004.

BRITO, M. V. H; MOREIRA, R. J.; TAVARES, M. L. C.; CARBALLO, M. C. S.; CARNEIRO, T. X. ; SANTOS, A. A. S. Efeito do óleo de copaíba nos níveis séricos de uréia e creatinina em ratos submetidos à síndrome de isquemia e reperfusão renal. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, n.3, v.20, p. 243-246, 2005.

CHIEN, K. R.; ABRAMS, J.; PFAU, R. G.; FARBER, J. L. Prevention by chlorpromazine of ischemic liver cell death. **American Journal of Pathology**, Bethesda, v.88, n.3, p.539-553, 1977.

COSTA, J.A.C.; VIEIRA NETO, O.M.; MOYSÉS NETO, M. Insuficiência renal aguda. In: **Simpósio. Urgências e emergências nefrológicas**, 2003. Ribeirão Preto, v.36, p.307-324, 2003.

DUNIN, C.H., SOUZA, M.F.A. **Código de ética no uso científico de animais**. Rio de Janeiro: Sociedade Zoófila Educativa. [s.p.], 1996.

FEITOSA, E. A. N.; TAHA, M. O.; FAGUNDES, D. J.; TAKIYA, C. M.; CARDOSO, L. R.; CAMPOS, D. M. Estudo da morfologia renal após a oclusão da aorta abdominal infra-renal em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v.32, n.4, 2005.

GOLDENBERG, S. Aspectos éticos da pesquisa com animais. **Acta Cirúrgica Brasileira**, [online], São Paulo, v. 15, n. 4, 2000. Disponível em <http://www.scielo.br>. Acesso em: 10 jun. 2003.

HURAI B S, GOLDBERG H, KATZ A. Percutaneous needle biopsy of the transplanted kidney: technique and complications. **American Journal of Kidney Diseases**, Philadelphia, n.14, p. 13. 1989.

KARAMAN, A.; TURKMEN, E.; GURSUL, C.; TAS, E.; FADILLIOGLU, E. Prevention of renal ischemia/reperfusion-induced injury in rats by leflunomide. **International Journal of Urology**, Osaka, v.13, p.1434-1441, 2006

LIEBERTHAL, W.; NIGAM, K. S. Acute renal failure. II. Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, Bethesda, v.278, n.1, p. F1 – F12, 2000.

MOLITORIS, B.A., BACALLAO, R. Pathophysiology of Ischemic Acute Renal Failure: Cytoskeletal Aspects. In: SCHRIER, R. W.; BENNETT, W. M.; HENRICH, W. L. **Atlas of Diseases of the Kidney**. Colorado: Blackwell Science Inc., v.1, cap.13. 1999. p.13.1-13.8.

NETTO, J. M. B.; TUCCI Jr., S.; COLONGNA, A. J.; SUAD, H. J.; MARTINS, A C. P.; MOLINA, C. A F.; ROSELINO, J. E. S. Chlorpromazine and mitochondrial function in kidney ischemia-reperfusion. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.16, suppl.1, 2001.

PERES, L. A. B.; MOCELIN, A. J.; DELFINO, V. D. A. Injúria da Isquemia/Reperusão: Implicações no Transplante Renal. **The International Brazilian Journal of Urology**, Rio de Janeiro, v.27, n.4, p.207-214, 2005.

SCHRIER, R. W.; WANG, W.; POOLE, B.; MITRA, AMIT. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. **The Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v.114, n.1, p.5-14, 2004.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1999, 646 p.

TSUJI, Y.; ARIYOSHI, A. SAKAMOTO, K. An experimental model for unilateral ischaemic acute renal failure in dog. **International Urology and Nephrology**, Netherlands, n.25, v.1, p.83-88, 1993.

VIANNA, P. T. G. Atualidade do pré-condicionamento e proteção renal. In: CAVALCANTE, I. L.; CANTINHO, F. A. F.; ASSAD, A. **Medicina Perioperatória**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Sociedade de Anestesiologia do estado do Rio de Janeiro, 2006, p. 579-582.