



CARVALHO *et al.*, 2015
JCBS, v. 1, n. 1, p. 14-19, 2015

DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE INSUFICIÊNCIA RENAL EM CAMUNDONGOS: ANÁLISE BIOQUÍMICA E HISTOLÓGICA

CARVALHO, Eduardo Elias Vieira.¹; FERNANDES, Fabiana Moura.¹; ABRAHÃO, Dayana Pousa Siqueira¹; CORREIA, Samantha Batista Amui¹; DOS SANTOS, Maria Paula Prizon Theodoro¹; ABDALLA, George Kemil¹; ABDALLA, Douglas Reis¹

¹Faculdade de Talentos Humanos, Uberaba, MG, Brasil

Data de submissão: 5 de maio de 2015. Aceito na versão final: 27 de maio de 2015

RESUMO: Introdução: Atualmente, a maioria dos modelos experimentais de IR não permitem uma avaliação segura dos transtornos da funcionalidade renal, em muitos casos os animais são submetidos a procedimentos cirúrgicos agressivos que cursam com complicações no pós-operatório e sobrevida reduzida. **Objetivo:** Testar um novo método de indução de IR em camundongos submetidos ao consumo crônico de água destilada. **Métodos:** Foram utilizados 30 camundongos machos, Balb/c, com oito semanas, divididos em dois grupos de estudo: Grupo Controle (GI) – animais que consumiram água mineral industrializada; e Grupo Teste (GII) – animais que consumiram água destilada por 30 dias. Após esse período os animais foram eutanasiados e foram coletadas amostras de sangue e do tecido renal para análise bioquímica e histológica, respectivamente. **Resultados:** Foi documentado apenas no GII degeneração hidrópica dos túbulos contorcidos, infiltrado inflamatório, hiperemia ativa e necrose isquêmica dos túbulos contorcidos, além de níveis ureia, potássio, cálcio e magnésio significativamente mais elevados do que no GI. **Conclusão:** Os achados histopatológicos e bioquímicos dos animais do GII são compatíveis com IR, dessa forma, nossos resultados nos permite propor um novo modelo experimental de indução de IR em pequenos animais.

PALAVRAS-CHAVE: Insuficiência Renal; Modelo Experimental; Água Destilada.

DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE INSUFICIÊNCIA RENAL EM CAMUNDONGOS: ANÁLISE BIOQUÍMICA E HISTOLÓGICA

ABSTRACT: Introdução: *Introduction: Currently, most experimental models of Renal Insufficiency (RI) do not allow a reliable assessment of disorders of kidney function in many cases the animals are subjected to aggressive surgical procedures that progress with complications in the postoperative period and reduced survival.* **Aim:** *To test a new RI method of inducing in mice a chronic consumption of distilled water.* **Methods:** *We used 30 male mice, BALB/c, eight weeks, divided into two groups: Control Group (GI) - animals that consumed industrialized mineral water for 30 days; and Test Group (GII) - animals that consumed distilled water for 30 days. After this period the animals were euthanized and were collected blood samples and kidney tissue for biochemical and histological analyzes, respectively.* **Results:** *It was only documented in GII a hydropic degeneration of the convoluted tubules, inflammatory infiltrate, active hyperemia and ischemic necrosis of the convoluted tubules, in addition the levels of: urea, potassium, calcium and magnesium were significantly higher than GI.* **Conclusion:** *The histopathological and biochemical findings in GII animals are compatible with RI, therefore, our results allow to propose a new experimental model of RI in small animals.*

KEY WORDS: *Renal insufficiency; Experimental Model; Distilled Water.*

Correspondência para/Correspondence to:

ABDALLA, D. R.. Curso de Fisioterapia, Faculdade de Talentos Humanos, Avenida Tonico dos Santos, 333. CEP: 38040-000. Uberaba, MG, Brasil. Tel: +055-34-3311-9800. E-mail: drabdalla@factus.edu.br

INTRODUÇÃO

A insuficiência renal (IR) é uma síndrome progressiva de perda da função renal que cursa com redução da taxa do filtrado glomerular associada a alterações morfológicas do parênquima renal (COSTA *et al.*, 2009; GOMES; KIRSZTAJN, 2011; K/DOQI, 2002).

Atualmente a IR é uma doença considerada de alta prevalência e incidência no Brasil e no mundo e tem sido tratada como um grave problema de saúde pública. Estima-se que nos EUA cerca de 13% da população adulta apresenta algum grau de perda da função renal. No Brasil os estudos ainda não são conclusivos, mas um levantamento do Censo Brasileiro de Diálise publicado em 2012 demonstrou que o número de pacientes com doença renal em fase terminal mais que duplicou na última década, passando de 42.695 casos em 2000 para 91.314 em 2011 (SNYDER *et al.*, 2006; SESSO, 2011; OLIVEIRA; ROMÃO; ZATZ, 2005).

Tendo em vista o difícil manuseio do paciente com IR, devido a complexidade da doença, para a realização de um estudo de seguimento clínico em humanos, estudos em modelos experimentais poderiam se prestar de forma adequada para investigação do desenvolvimento do dano renal, assim como possíveis intervenções terapêuticas.

Entretanto, os modelos mais utilizados de IR não permitem uma avaliação segura dos transtornos da funcionalidade renal, em muitos casos os animais são submetidos a procedimentos cirúrgicos muito agressivos que cursam com complicações no pós-operatório que são passíveis de erros de interpretação dos parâmetros monitorados e, além disso, a sobrevida dos animais é reduzida (COSTA *et al.*, 2009; SANTAN, 1996).

Diante das evidências apresentadas na literatura, é possível considerar que mais estudos são necessários para o desenvolvimento de um novo modelo experimental de IR. Com tudo, a partir dos resultados desse estudo, espera-se contribuir para a consolidação de um modelo de IR de fácil reprodutibilidade, baixo custo, que garanta a sobrevida dos animais e que reproduza os danos renais encontrados em humanos.

Desta forma, o presente estudo tem por objetivo testar um novo método de indução de IR em camundongos submetidos ao consumo crônico de água destilada.

MÉTODOS

Amostra

Foram utilizados 30 camundongos machos, Balb/c, com oito semanas, procedentes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

Os animais permaneceram em gaiolas plásticas, em condições de temperatura entre $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, regulada por ar condicionado, luminosidade controlada artificialmente para ciclos de claro e escuro de 12 horas, alimentação com ração própria para a espécie e água disponíveis *ad libitum*.

Os ensaios com animais foram realizados de acordo com “Os Princípios Éticos da Experimentação Animal da União Internacional Protetora dos Animais” e da lei Federal 663, de 8 de maio de 1979. Todos os procedimentos foram

aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Talentos Humanos, protocolo de nº 0030/2010.

Os animais foram divididos em dois grupos homogêneos (tabela 1): Grupo Controle (GI) – animais que consumiram água mineral industrializada (Coca-Cola Brasil, água mineral Crystal, fonte José Gregório) por 30 dias; Grupo Teste (GII) – animais que consumiram água destilada (Laboratório de Química da Faculdade de Talentos Humanos) por 30 dias.

Aferição de Massa Corpórea, Coleta de Sangue e de Tecidos

A aferição da massa corpórea dos animais foi feita em balança digital no início e ao final da experimentação.

Para a coleta de sangue os animais foram previamente sedados em câmara de CO₂ e procedeu-se a coleta através do plexo retro orbital com pipeta de Pauster de vidro. O sangue coletado foi transferido para um tubo seco, sendo atribuído um único tubo por grupo experimental.

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical para realizar a coleta de tecidos. Foi feita uma abertura no tórax e abdome dos camundongos pela qual foram retirados os rins com o auxílio de uma pinça e tesoura. Os órgãos foram imediatamente colocados em recipiente plástico contendo formol a 10% para fim de preservar a morfologia e a composição dos tecidos, onde permaneceram durante 24 horas para o processo de fixação.

Preparo do Corte Histológico e Coloração Hematoxilina-Eosina (HE)

As peças coletadas passaram por todos os processos para inclusão em parafina e posterior coloração para análise histológica em microscópio óptico a fim de identificar as alterações morfológicas.

Foram analisados qualitativamente os cortes longitudinais dos rins dos animais dos grupos experimentais. As lâminas histológicas foram focadas nos aumentos de 4, 10 e 40x em lente objetiva, no microscópio óptico Ken-a Vision e fotografadas com câmera digital Sony Cyber-Shot DSC-W610/P.

Análises Bioquímicas

Foram realizados os exames séricos de ureia e creatinina, a fim de avaliar a função renal, e os eletrólitos: cálcio, magnésio, cloro, sódio (Na) e potássio (K). Para tanto o sangue foi centrifugado em três etapas com duração de um minuto cada, a 300 rpm. Os exames de ambos os grupos foram realizados em triplicata para obtenção da média e desvio padrão dos resultados.

A determinação da ureia no soro foi realizada por meio de teste enzimático colorimétrico, e a de creatinina por meio de teste cinético colorimétrico. Para ambas as dosagens foram utilizados kits da marca Bioclin[®] para uso diagnóstico *in vitro* e procedeu-se de acordo com a bula do fabricante.

As dosagens de cálcio, magnésio e cloro foram realizadas por meio de teste colorimétrico para uso diagnóstico *in vitro*, utilizando kits da marca Bioclin[®] para cálcio e magnésio e kit da marca Biotécnica[®] para cloro. Em

todas as dosagens, procedeu-se conforme as bulas dos fabricantes.

Para a determinação de sódio e potássio, foi feita uma diluição 1:100 de soro para água destilada em um béquer. Com uma pipeta graduada adicionou-se ao béquer 9,9 mL de água destilada e com uma pipeta automática adicionou-se 100 μ L de soro. Homogeneizou-se a diluição e a mesma foi lida no fotômetro de chama com a chave de leitura voltada para o Na (determinação de sódio) e o mesmo procedimento foi feito para a leitura de potássio, porém com a chave de leitura do aparelho voltada para o K.

Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism v.5.0, para a comparação dos grupos quanto às variáveis analisadas foi utilizado o teste “t de Student”, dados expressos pela média e 95% do intervalo de confiança. As diferenças observadas foram consideradas significantes quando a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade for menor ou igual a 0,05 (5%).

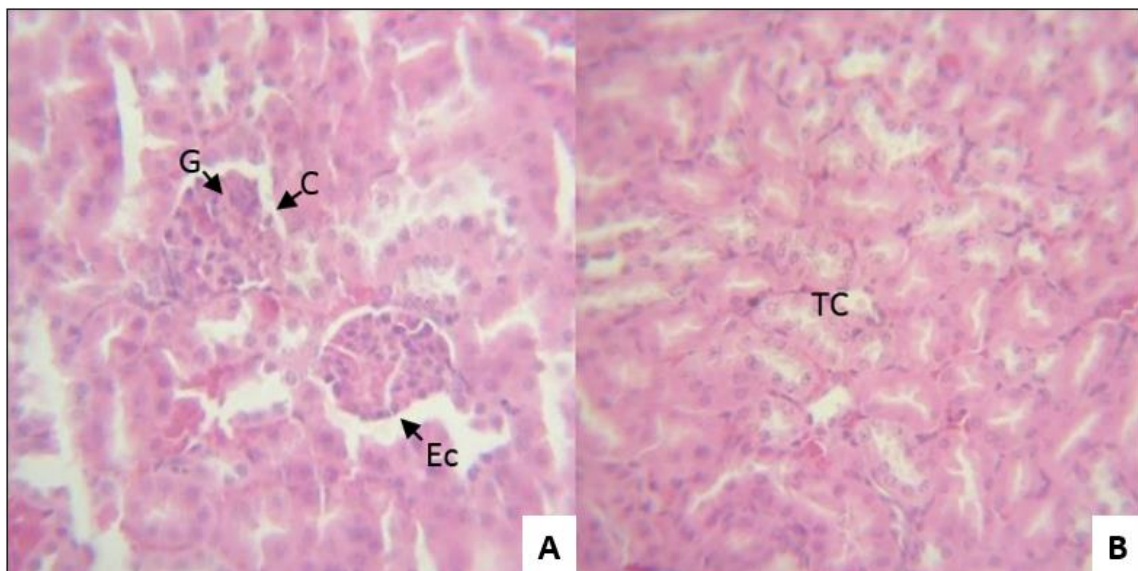
RESULTADOS

Em relação à massa corpórea, não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos e tão pouco entre as etapas inicial e final.

Avaliações Histológicas do Rim

Na análise feita das lâminas histológicas de GI, de acordo com a Fig. 1, observou-se que os rins são formados por diferentes estruturas: cápsula de Bowman, que é constituída por espaço capsular, folhetos parietal e visceral, glomérulos, túbulos contorcidos distais e proximais. Além dessas estruturas há tecido hematopoiético e vasos sanguíneos. No grupo de camundongos que consumiram água mineral, não foram observadas nas lâminas analisadas, sob microscopia de luz, quaisquer alterações histológicas nas diferentes estruturas do rim.

Figura 1. Rim de camundongo do Grupo Controle demonstrando estruturas normais, objetiva de 40x. A) Glomérulos (G), Cápsula de Bowman (C) e Espaço capsular (Ec). B) Túbulos contorcidos (TC).



A descrição geral histológica das lâminas dos rins dos camundongos do Grupo Teste demonstrou na Fig. 2, respectivamente: A) presença de infiltrado inflamatório mononuclear, B) hiperemia ativa (vasos dilatados com componentes hematopoiéticos no seu interior), bem como áreas de extravasamento de sangue pelos tecidos (focos hemorrágicos), C) área acidófila com alterações nucleares, como por exemplo: cariólise, cariorrexe e picnose, evidenciando-se a necrose isquêmica, D) áreas de necrose no córtex renal. O conjunto destas alterações morfológicas foi compatível com quadro de isquemia.

Observou-se também a ocorrência de degeneração hidrópica dos túbulos contorcidos, caracterizada pela tumefação celular, citoplasma pálido e redução da luz dos túbulos, e ainda foi possível notar uma redução

significativa do espaço capsular, como foi demonstrado em esquema comparativo entre GI e GII na Fig. 3.

Avaliações Bioquímicas

Os resultados foram obtidos através do cálculo da média e desvio padrão das triplicatas de cada exame bioquímico, e expressos de forma comparativa entre GI e GII de acordo com a Tab. 1, que demonstram respectivamente: A) Evidenciado que os níveis de ureia do grupo GII apresentou uma discreta elevação em relação ao GI, porém com significância estatística ($p \leq 0,05$). B) Creatinina, onde GII apresenta níveis mais elevados que GI. C) Sódio, onde ambos os grupos obtiveram praticamente o mesmo resultado. D) Potássio, onde GI e GII obtiveram valores séricos aproximados porém com $p \leq 0,05$. E) Cálcio, onde GII apresentou níveis um pouco mais elevados que GI ($p \leq 0,01$). F) Magnésio,

onde GII obteve níveis mais elevados que GI ($p \leq 0,01$). G) Cloro, onde a concentração sérica de GI e GII foi praticamente a mesma.

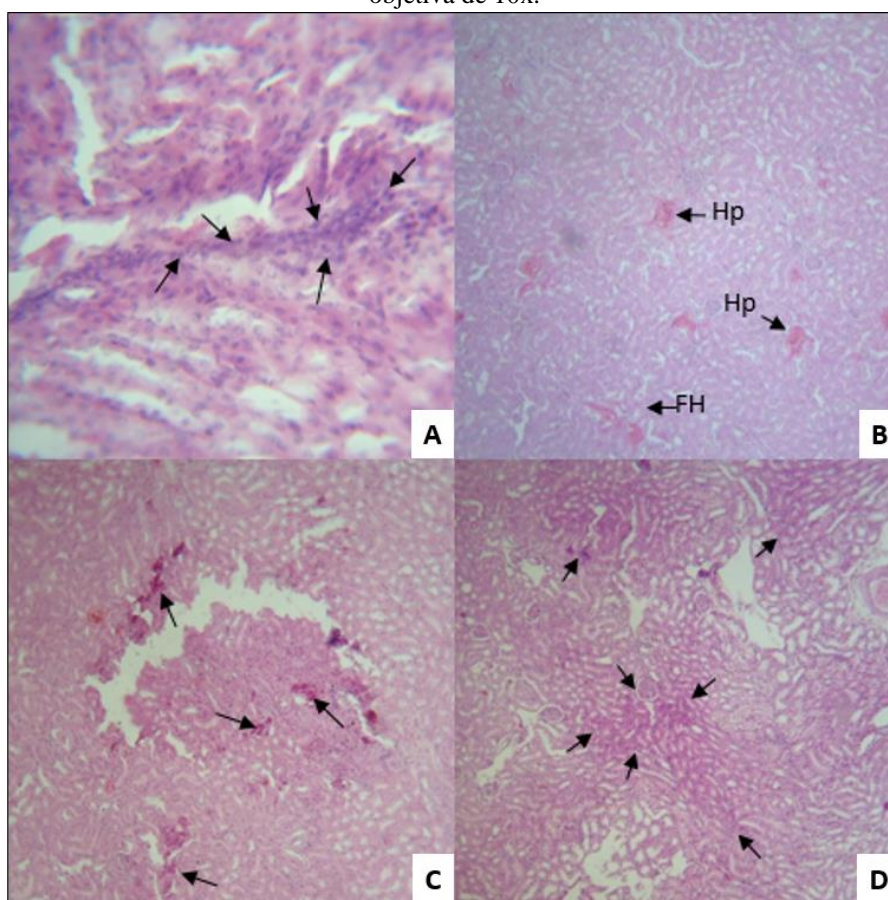
DISCUSSÃO

Os principais achados do presente estudo mostraram que, após um mês de consumo de água destilada, os camundongos desenvolveram IR documentada por degeneração hidrópica dos túbulos

contorcidos, presença de infiltrado inflamatório mononuclear, hiperemia ativa e necrose isquêmica dos túbulos contorcidos. Associado aos danos histológicos, pudemos evidenciar também alterações nos parâmetros bioquímicos, principalmente pelos níveis de ureia e creatinina.

Dessa forma, a presente investigação fornece dados conclusivos de um novo modelo de IR de fácil reprodutibilidade, baixo custo e que garantiu a sobrevivência dos animais.

Figura 2. Rins de camundongos do Grupo Teste apresentando alterações histológicas. A) Infiltrado inflamatório apontado pelas setas, objetiva de 40x. B) Hiperemia (Hp) e Foco Hemorrágico (FH), objetiva de 10x. C) Áreas de necrose, apresentando alterações nucleares, apontadas pelas setas, objetiva de 10x. D) Áreas acidófilas apontadas pelas setas, objetiva de 10x.



Para fins de diagnóstico e tratamento a IR costuma ser dividida em três etiologias. Pré-renal: doenças que provocam hipoperfusão renal, sem comprometer a integridade do parênquima; Renal: doenças que afetam diretamente o parênquima renal; e Pós-renal: doenças associadas à obstrução do trato urinário (Hugh *et al.*, 2003; Nunes *et al.*, 2010). No presente estudo, as alterações morfofuncionais são compatíveis com IR de etiologia renal.

Previamente Costa e colaboradores (2003), em estudo de revisão, relataram que a IR pode ser proveniente de eventos hemorrágicos e necróticos associados à azotemia, o que pauta os achados deste estudo, onde as alterações do parênquima renal decorrente do uso da água destilada levaram à disfunção renal.

Tabela 1. Análise bioquímica comparativa entre os grupos experimentais.

VARIÁVEIS (mg/dL)	GI	GII	p
Ureia	59,97 (57,88-62,05)	63,3 (60,29-66,31)	0,05
Creatinina	0,21 (0,19-0,23)	0,23 (0,19-0,26)	0,18
Sódio	155 (152,5-157,5)	156 (153,5-158,5)	0,29
Potássio	8,88 (8,83-8,93)	8,97 (8,92-9,01)	0,05
Cálcio	8,70 (8,64-8,77)	8,93 (8,84-9,03)	0,01
Magnésio	2,73 (2,68-2,78)	2,96 (2,93-2,99)	0,01
Cloro	122,1 (120-124,3)	123 (121,5-125,2)	0,14

Nota: Resultados expressos pela média (95% IC).

Sabe-se que a causa mais comum de dano tubular, semelhante aos que foram evidenciados na análise histológica do GII, é de origem isquêmica, portanto a necrose tubular isquêmica pode ser uma consequência da redução do fluxo sanguíneo. Assim, o aparecimento de necrose cortical irreversível pode ocorrer na vigência de isquemia severa (Shor *et al.*, 1999).

Devido à necrose tubular aguda, os rins perdem a adequada capacidade de excreção de compostos nitrogenados e como consequência, a concentração plasmática de ureia e creatinina aumenta, como foi observado nos resultados das dosagens do GII (Shor *et al.*, 1999). De acordo com os parâmetros bioquímicos estabelecidos por Almeida e colaboradores (2008), os autores afirmaram que a concentração de ureia sérica além de obter significância estatística, obtém significância clínica em pacientes com IR. Neste estudo demonstramos uma prevalência levemente maior dos eletrólitos no GII em relação ao grupo controle.

De acordo com os resultados de Drobnik e Latour (2005), em um estudo realizado com ratos que consumiram água deionizada por 90 dias, também houve uma prevalência dos níveis séricos de cálcio do grupo teste em relação ao grupo controle. Entretanto, ao contrário do presente estudo, Drobnik e Latour relataram

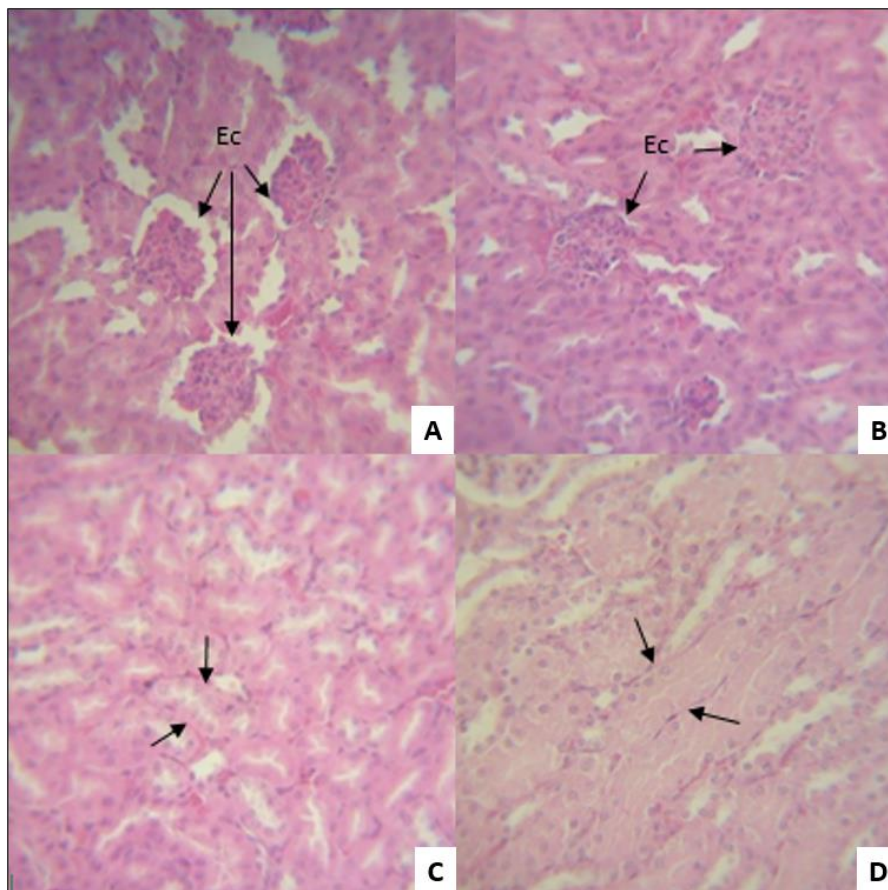
a diminuição dos valores séricos de sódio, potássio e magnésio.

No entanto, outros estudos com modelos experimentais de IR já documentaram alterações bioquímicas semelhante aos nossos achados (Costa *et al.*, 2009; Kaufman *et al.*, 1974; Chamberlain; Shirley, 2007). Chagas, Saldanha e Oliveira (1980), ao realizarem um estudo para determinar os teores plasmáticos de sódio, potássio e cálcio em ratos adultos submetidos à administração de intraperitoneal de extrato aquoso do fungo *Ramaria flavo-brunnescens*, utilizaram em seu grupo controle a administração diária de água destilada durante 30 dias, tendo como resultado um aumento discreto destes eletrólitos em relação às dosagens feitas anteriormente ao experimento (Kaufman *et al.*, 1974).

CONCLUSÃO

Portanto, os achados do presente estudo permitem-nos concluir que ao submeter os animais ao consumo de água destilada, por período de 30 dias e desta forma provocar alterações morfofuncionais compatíveis com insuficiência renal, tal metodologia é eficiente para o desenvolvimento de um modelo experimental de IR passível de reprodutibilidade e aplicável para estudos terapêuticos na área de nefrologia e áreas afins.

Figura 3 - Comparação entre os rins de GI e GII, objetiva de 40x. A) Espaço capsular (Ec) de rim de GI. B) Espaço capsular (Ec) de rim de GII. C) Túbulos contorcidos normais de GI. D) Degereração hidrópica nos túbulos contorcidos de GII.



REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. S.; FALEIROS, A. C. G.; TEIXEIRA, D. N. S.; COTA, U. A.; CHICA, J. E. L. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. *BrasPatolMed Lab.* v.44, n.6, p.429-432, 2008.
- CHAGAS, A. M.; SALDANHA, C. M.; OLIVEIRA, P. R. Leucometria, Eritrometria e os teores plasmáticos de Sódio, de Potássio e de Cálcio após o uso prolongado de Ramaria flavo-brunnescens em Ratos. *Revista Centro Ciências Rurais.* v. 10, n. 4, p. 299-306, 1980.
- CHAMBERLAIN, R. M.; SHIRLEY, D. G. Time course of the renal functional response to partial nephrectomy: measurements in conscious rats. *Exp Physiol.* v. 92, n. 1, p. 251-262, 2007.
- COSTA, A. F. N.; PEREIRA, L. P. M. P.; FERREIRA, M. L.; SILVA, P. C.; CHAGAR, V. L. A.; Schanaider A. Surgical model of chronic renal failure. Study in rabbits. *Rev. Col. Bras. Cir.* v. 36, n. 1, p. 78-84, 2009.
- COSTA, J. A. C.; VIEIRA NETO, O. M.; MOYSÉS NETO, M. Insuficiência renal aguda. *Revista Medicina (Ribeirão Preto).* v. 36, p. 307-324, 2003.
- DROBNIK, M.; LATOUR, T. The estimation of the influence of deionized water on the basic electrolytes level in blood and urine of tested animals. *Roczniki PZH, Warszawa,* v. 56, n. 3, p. 283-289, 2005.
- GOMES, M. B.; KIRSZTAJN, G. M. Chronic kidney disease: importance of early diagnosis, immediate referral and structured interdisciplinary approach to improve outcomes in patients not yet on dialysis. *J Bras Nefrol.* v. 33, n. 1, p. 93-108, 2011.
- HUGH, R. B.; BARRY, M.; BRENNER, B. M. Insuficiência renal aguda. In *Harrison Medicina Interna.* 15° ed. São Paulo, v. 36, p. 307-324, 2003.
- K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. *Am J Kidney Dis.* v. 39, Suppl 2, p. S1-S246, 2002.
- KAUFMAN, J.M.; DIMEOLA, H.J.; SIEGEL, N. J.; LYTTON, B.; KASHGARIAM, M.; HAYSLETT, J. P. Compensatory adaptation of structure and function following progressive renal ablation. *Kidney Int.* v. 6, n. 1 p. 10-17, 1974.
- NUNES TF, BRUNETTA DM, LEAL CM PISI PCB, RORIZ-FILHO JS. Acute renal failure. *Revista Medicina (Ribeirão Preto).* v. 43, n. 3, p. 272-282, 2010.
- OLIVEIRA, M. B.; ROMÃO Jr, J.E.; ZATZ, R. End-stage renal disease in Brazil: Epidemiology, prevention, and treatment. *Kidney Int Suppl.* v. 97, p. 82-86, 2005.
- SANTAN, A.E. Estudo de um modelo experimental de insuficiência renal crônica (IRC) em cães (canis familiares). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV). Universidade Estadual Paulista (UNESP). Campus de Jaboticabal. Jaboticabal, SP, Brasil. Auxílio à Pesquisa – Regular. FAPESP. 1996.
- SESSO, R. Diálise Crônica no Brasil- Relatório do Censo Brasileiro de Diálise, 2011.
- SHOR, N.; SANTOS, O. F. P.; BOIM, M. A. Insuficiência Renal Aguda. In: Bendhack, A.; Damião, R. Guia prático de urologia. 1 ed. Rio de Janeiro: BG Cultural, 1999. cap. 13°, p. 65-71.
- SNYDER, J. J.; FOLEY, R. N.; COLLINS, A. J. Prevalence of CKD in the United States: A Sensitivity Analysis Using the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2004. *Am J Kidney Dis.* v. 53, p. 218-228, 2006.