

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE
DIÁLISE PERITONIAL EM RATOS E EFEITO DA
CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE E DA TEMPERATURA
NO PERITÔNIO.**

PRISCILA CADIMA VICENTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp – Botucatu para obtenção do título de Mestre em Clínica Veterinária.

BOTUCATU – SP

Novembro 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE
DIÁLISE PERITONIAL EM RATOS E EFEITO DA
CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE E DA TEMPERATURA
NO PERITÔNIO.**

PRISCILA CADIMA VICENTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp – Botucatu para obtenção do título de Mestre em Clínica Veterinária.

Profa. Dra. Sônia Regina Verde da Silva Franco
Orientadora

Profa. Dra. Jacqueline Costa Teixeira Caramori
Co-orientadora

BOTUCATU – SP

Novembro 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Vicente, Priscila Cadima.

Avaliação de um modelo experimental de diálise peritoneal em ratos e efeito da concentração de glicose e da temperatura no peritônio / Priscila Cadima Vicente. – Botucatu : [s.n.], 2007

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007.

Orientador: Sonia Regina Verde da Silva Franco

Assunto CAPES: 50501020

1. Hemodiálise 2. Diálise peritoneal 3. Urologia veterinária

CDD 616.61089

Palavras-chave: Diálise peritoneal; Glicose; Rato; Temperatura

PRISCILA CADIMA VICENTE

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA:

1. PRESIDENTE E ORIENTADORA:

Profa. Dra. Sônia Regina Verde da Silva Franco

2. EXAMINADOR:

Prof. Dr. Flávio Quaresma Moutinho

3. EXAMINADOR:

Prof. Dr. André Luis Balbi

BOTUCATU, 30 DE NOVEMBRO DE 2007.

Ao meu marido: Eduardo José Danza Vicente

Todo dia eu agradeço a Deus por ter você ao meu lado

Por ter o seu amor por inteiro

Por me mostrar o que é amar e ser amada

Deus, me deu um anjo e após todo este tempo você ainda me surpreende com seu carinho, sua sinceridade e acima de tudo com seu conhecimento

Eu posso não saber muito, mas tudo que sei são verdades que você me mostrou ou me ensinou a ver

Eu não tenho palavras para agradecer tudo o que você fez e faz por mim

Hoje meu Mundo é um lugar melhor por sua causa

Te amo muito: ontem, hoje, amanhã e sempre.

Obrigado por toda a paciência do mundo e por não me deixar desistir. Sei que você esperava mais de mim, mas no meio de tantas mudanças nas nossas vidas tentei fazer o melhor. Você é um exemplo de luta e superação. Sinto-me honrada por você ter me escolhido como companheira e por fazer parte de algumas das suas grandes conquistas.

Ao nosso bebezinho: Eduardo Danza Cadima Vicente

Desculpe se a mamãe ficou um pouco nervosa e a sua casinha ficou um pouco agitada. Saiba que estamos ansiosos te esperando. Você é um presente de Deus para a mamãe e para o papai.

As nossas filhas caninas: Meg (Cavalinho) e Lana (Docinho)

Obrigado toda a fidelidade e carinho mesmo quando a mamãe não tem muita paciência e tempo para as suas brincadeiras. Vocês são nossos anjinhos peludos.

***A minha orientadora: Profa. Sônia R.V. da S.
Franco e minha co-orientadora Profa. Jacqueline
C. T. Caramori***

Ao mestre com carinho

Mestre

... é aquele que caminha com o tempo, propondo paz, fazendo

comunhão,

despertando sabedoria.

Mestre é aquele que estende a mão,

inicia o diálogo e encaminha para a aventura da vida.

Não é o que ensina fórmulas, regras, raciocínios,

mas o que questiona e desperta para a realidade.

Não é aquele que dá o seu saber,

mas aquele que faz germinar o saber do discípulo.

Mestres são vocês minhas professoras amigas, que me

compreendem, me estimulam e me enriquecem

com seu saber e ternura.

Eu serei sempre uma discípula na escola da vida.

Obrigada, professoras!

Aos meus pais: Florentino e Maria Cristina

Meus Pais

Meus pais são como porto seguro, são abrigos que me protegem de todas as dificuldades que encontrei durante minha vida.

Estão sempre dispostos a dar suas mãos, são fortes, seguros, são proteção.

Meus pais são heróis, dentre todos, são eles que mais se destacam no meio da multidão. Heróis que trabalham durante a vida inteira, pensando num futuro melhor para nós (filhos).

São como estrelas que me trazem luz nos momentos difíceis de minha vida.

Meus pais são: chegada, partida, beijos, abraços e despedidas.

Obrigado por todo apoio e carinho.

Amo muito vocês.

Ao meu irmão: Alexandre Cadima

Agradeço sua amizade que gentilmente me permitiu desfrutar. Agradeço sua energia que, positivamente, muitas batalhas você me ajudou a ganhar. Agradeço sua força que bravamente, você conseguiu me emprestar. Agradeço ao seu coração e a todo o carinho que pôde me dar.

Você é o melhor irmão do mundo.

***Aos meus sogros: José Tasso e Wanice; André e
Alexandre***

Amigos muitos especiais

Amigo é alguém muito especial!

Ele nos faz sorrir e nos encoraja

Para sermos bem-sucedidos.

Ele empresta um ouvido quando precisamos,

Ele compartilha uma palavra de elogio

E sempre tem o coração aberto para nós.

Ele divide com a gente aquilo que tem

E se sentem felizes com o que podem receber.

Amigos São assim

Como vocês!

Obrigado.

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente aos animais deste experimento que precisaram morrer para que este trabalho fosse realizado, a eles só o agradecimento é pouco, espero que um dia eles me perdoem;

- À Coordenação e a Secretaria de Pós-Graduação do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária, Área de Concentração Clínica Veterinária, FMVZ/UNESP – Botucatu, especialmente a Denise, Maria e Regina.

- Ao Laboratório Experimental do Departamento de Clínica da Faculdade de Medicina UNESP – Botucatu e principalmente aos funcionários José Carlos Georgete e Mário, pois sem a ajuda deles este trabalho não teria sido realizado;

- Ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina UNESP – Botucatu e principalmente a Profa. Dra. Maria Aparecida Marchesan Rodrigues Kobayasi, pela paciência e compreensão devido as minhas dificuldades de clínica e ao Toxican (Paulo e Mara) por terem me ajuda a processar todo o material para a morfologia;

- À Profa. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha do Departamento de Microbiologia do IB/UNESP – Botucatu pela ajuda e por ter permitido que eu realizá-se toda a parte microbiológica do trabalho no seu laboratório.

- Ao Departamento de Anatomia – IB/UNESP – Botucatu e principalmente ao Prof. Adjunto Dr. Francisco Eduardo Martinez, por terem me deixado utilizar o analisador de imagens para realização da morfometria;

- À Profa. Ass. Dra. Patrícia F. F. Pinheiro do Departamento de Anatomia – IB/UNESP – Botucatu pelas idéias e pilotos realizados;

- Ao Departamento de Bioestatística – UFJF e em especial ao Prof. José Jonas;
- Ao CAPES pela concessão de bolsa de auxílio à pesquisa;
- A todos os professores e colegas da Pós-Graduação;
- Aos professores da banca examinadora da qualificação: Profa. Mitchiko Sakate e Prof. Flávio Quaresma;
- A aluna da Medicina: Gabriela Carmona por ter me ajudado com a parte experimental e estar disposta a aprender um pouco mais;
- A Clínica Veterinária Arca dos Bichos: principalmente aos meus companheiros de trabalhos e chefes Edney e Kátia pelo apoio e porque permitiram que eu escrevesse esta dissertação durante o expediente de trabalho, e as secretárias: Fabiana, Carol e Mariana e a Funcionária Elisângela pela paciência comigo;
- A minha amiga Karina (Catota) pela amizade e carinho;
- A funcionária da biblioteca Selma por ter me ajudado a fazer a ficha catalográfica;
- À todos aqueles que de uma forma ou de outra participaram de minha formação, aqui omitidos mas não esquecidos

Muito Obrigado

LISTA DE ABREVIATURAS

DP	Diálise Peritoneal
DPAC	Diálise Peritoneal Ambulatorial Crônica
UF	Ultrafiltração
GPDs	Produtos de Degradação da Glicose
SDP	Solução de Diálise Peritoneal
CSB	Células Sanguíneas Brancas
GSC	Grupo Solução Concentrada
GSCA	Grupo Solução Concentrada Aquecida
GSF	Grupo Solução Fisiológica
GSFA	Grupo Solução Fisiológica Aquecida
GC	Grupo Controle
IP	Injeção Intraperitoneal
IRC	Insuficiência Renal Crônica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema da diálise peritoneal em humanos com o líquido de diálise na cor azul dentro da cavidade abdominal	5
Figura 2	Anatomia simplificada da cavidade peritoneal humana	8
Figura 3	Membrana peritoneal esquematizada	9
Figura 4	Montagem das bolsas	21
Figura 5	Caixa térmica de isopor	21
Figura 6	Procedimento de diálise	22
Figura 7	Procedimento de diálise	22
Figura 8	Introdução da solução salina no rato anestesiado	23
Figura 9	Colheita do lavado peritoneal	23
Figura 10	Procedimento de colheita do peritônio parietal na região abdominal direita	24
Figura 11	Procedimento de colheita do peritônio parietal na região abdominal direita	24
Figura 12	Procedimento de colheita do baço com o peritônio visceral	25
Figura 13	Procedimento de colheita do intestino com o omento	25
Figura 14	Montagem do mesentério no isopor	26
Figura 15	Gráfico com a média de mastócitos em todos os grupos	32
Figura 16	Lâmina de mesentério corada com azul de toluidina com vários mastócitos (setas)	33
Figura 17	Peritônio visceral do baço com epitélio pavimentoso simples no GC. Veja as células mesoteliais planas (setas)	33
Figura 18	Peritônio visceral do baço do GSC com transformação cúbica das células mesoteliais grave (+++) (setas)	34
Figura 19	Peritônio visceral do baço no GSCA com transformação cúbica das células mesoteliais grau moderado (++) (setas)	35

Figura 20	Peritônio visceral do baço no GSF com transformação cúbica das células mesoteliais de grau leve (+) (setas)	35
Figura 21	Peritônio visceral do baço no GSFA com células mesoteliais planas normais (setas)	36
Figura 22	Peritônio parietal normal com epitélio pavimentoso simples sem evidência da camada submesotelial no GC (setas)	37
Figura 23	Peritônio parietal do GSC com espessamento grave (+++) (setas)	37
Figura 24	Peritônio parietal do GSCA com espessamento grave (+++) (setas finas) e reação inflamatória (ponta das setas largas)	38
Figura 25	Peritônio parietal do GSF com espessamento grave (+++) (setas)	39
Figura 26	Peritônio parietal do GSCA com espessamento grave (+++) e reação inflamatória difusa (++) (setas)	39
Figura 27	Peritônio visceral do intestino e omento no GC normal (setas)	40
Figura 28	Peritônio visceral do baço do GSC com reação inflamatória local moderada (++) (setas)	41
Figura 29	Peritônio visceral do baço no GSC com fibrose difusa (setas)	41
Figura 30	Peritônio visceral do baço do GSCA com reação inflamatória difusa (+) (setas) e fibrose focal (setas largas)	42
Figura 31	Peritônio visceral do intestino e omento do GSCA com fibrose focal (setas)	42
Figura 32	Peritônio visceral do GSCA do intestino e omento com fibrose difusa (setas)	43
Figura 33	Peritônio visceral do intestino e omento do GSF com fibrose focal (setas)	43

Figura 34	Peritônio visceral do baço do GSFA com fibrose difusa (++) (setas)	44
Figura 35	Gráfico com o resumo dos achados histomorfológicos em todos os grupos	44
Figura 36	Porcentagem de animais normais na análise histomorfológica pelos pontos	45
Figura 37	Porcentagem de animais com peritonite nos grupos	47

LISTA DE TABELAS E ANEXOS

Tabela 1	Observação da temperatura das bolsas de diálise e do isopor antes da infusão abdominal	21
Tabela 2	Avaliação histomorfológica do peritônio e pontuação de acordo com as alterações	28
Tabela 3	Análise de variância (ANOVA) das variáveis: peso inicial e final, contagem dos mastócitos e análise dos pontos da histomorfologia	31
Tabela 4	Comparações múltiplas das médias dos mastócitos em todos os grupos	32
Tabela 5	Comparações múltiplas das médias dos pontos da análise histomorfológica em todos os grupos	46
Tabela 6	Resultado do exame microbiológico do lavabo peritoneal de todos os animais	47
Anexo 1	Peso inicial e final dos animais em todos os grupos	67
Anexo 2	Contagem de mastócitos em 10 campos aleatórios de cada animal e a média	68
Anexo 3	Análise do peritônio visceral do baço e peritônio parietal no GC	69
Anexo 4	Análise do peritônio visceral do baço e peritônio parietal no GSC	70
Anexo 5	Análise do peritônio visceral do baço e peritônio parietal no GSCA	71
Anexo 6	Análise do peritônio visceral do baço e peritônio parietal no GSF	72
Anexo 7	Análise do peritônio visceral do baço e peritônio parietal no GSFA	73
Anexo 8	Análise da reação inflamatória e fibrose no GC	74
Anexo 9	Análise da reação inflamatória e fibrose no GSC	75
Anexo 10	Análise da reação inflamatória e fibrose no GSCA	76

Anexo 11	Análise da reação inflamatória e fibrose no GSF	77
Anexo 12	Análise da reação inflamatória e fibrose no GSFA	78
Anexo 13	Total dos pontos da análise histomorfológica em todos os animais estudados	79
Anexo 14	Documento do Comitê de Ética e Pesquisa Animal	80

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.1. Anatomia e histologia do peritônio.....	8
2.2. Os efeitos da diálise na membrana peritoneal.....	9
2.3. Considerações sobre a diálise peritoneal experimental.....	14
3. OBJETIVOS.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1. Animais e grupos experimentais.....	20
4.2. Procedimento de diálise.....	22
4.3. Colheita do lavado peritoneal	23
4.4. Técnica de colheita da membrana peritoneal.....	24
4.5. Processamento histopatológico.....	26
4.5.1 Análise histomorfológica e morfométrica do peritônio.....	26
4.6. Análise estatística.....	27
5. RESULTADOS.....	29

5.1. Análise do peso inicial e final dos ratos.....	30
5.2. Contagem de mastócitos.....	31
5.3. Análise histomorfológica do peritônio.....	33
5.3.1. Análise do peritônio visceral do baço.....	33
5.3.2. Análise do peritônio parietal.....	36
5.3.3. Análise da reação Inflamatória e fibrose.....	40
5.4. Resultado dos pontos da análise histomorfológica.....	45
5.5. Resultado do exame microbiológico do lavado peritoneal.....	46
6. DISCUSSÃO.....	48
6.1. Discussão de métodos.....	49
6.2. Discussão de resultados.....	52
7. CONCLUSÃO.....	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
9. ANEXOS.....	66

VICENTE, P.C. **Avaliação de um modelo experimental de diálise peritoneal em ratos e efeito da concentração de glicose e da temperatura no peritônio.** Botucatu, 2007. 80p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Resumo

O procedimento de diálise peritoneal é um método de tratamento renal substitutivo muito utilizado na medicina humana. Os trabalhos experimentais em ratos ajudam a compreender as alterações que ocorrem no peritônio, testar novas soluções e aumentar o entendimento sobre os efeitos da diálise na membrana peritoneal. O objetivo deste trabalho foi introduzir o rato como modelo experimental de diálise peritoneal nesta instituição e estudar o efeito da concentração de glicose e da temperatura no peritônio. Foram utilizados ratos Wistar machos. Os ratos receberam injeção intraperitoneal diária por 30 dias com 10ml de fluidos de DP (GSC, glicose 4,25% temperatura ambiente; GSCA, glicose 4,25% aquecida; GSF, solução fisiológica temperatura ambiente; GSFA, solução fisiológica aquecida) e o grupo controle que não recebeu nenhum fluido. No final do experimento foi realizado lavado peritoneal para exame microbiológico e o sacrifício dos animais para colheita de amostras do peritônio para a histomorfologia e a contagem de mastócitos. Na contagem de mastócitos pode-se observar que os animais dos grupos GSC e GSFA apresentavam uma diferença significativa em relação aos animais do grupo controle. Na análise histomorfológica pode-se observar uma alteração significativa do peritônio entre os grupos GSC, GSCA e GSFA quando comparados com o grupo controle. Conclui-se neste estudo que o rato pode ser utilizado como modelo experimental de diálise peritoneal e que a concentração de glicose e a temperatura alteraram a histomorfologia e a contagem de mastócitos do peritônio.

Palavras-chave: Rato, Diálise Peritoneal, Glicose, Temperatura.

VICENTE, P.C. **Evaluation of an experimental model the peritoneal dialysis in rats and effect of the glucose concentration and temperature in the peritoneum.** Botucatu, 2007. 80p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Abstract

The procedure of the peritoneal dialysis is a method of substitutive renal treatment very used in human medicine. The experimental works in rat help to understand the alterations that happen in the peritoneum, to test new solutions and to increase the comprehension on the effects of the dialysis in the membrane peritoneal. The purpose of this work was to introduce the rat as an experimental model of peritoneal dialysis in this institution and to study the effect of the glucose concentration and temperature in the peritoneum. Male Wistar rats were used. The rats received daily intraperitoneal injection for 30 days with 10 ml of fluids the PD (GSC, glucose 4.25 % room temperature; GSCA, glucose 4.25 % heated up; GSF, physiological saline room temperature; GSFA, heated up physiological saline) and the group control that didn't receive any fluid. In the end of the experiment washed peritoneal was accomplished for microbiologic exam and the sacrifice of the animals for crop of samples of the peritoneum for the histomorphology and the mast cells counting. In the mast cells counting it can be observed that the animals of the groups GSC and GSFA presented a significant difference in relation to the animals of the group controls. In the histomorphologic analysis a significant alteration of the peritoneum can be observed among the groups GSC, GSCA and GSFA comparing with the group control. It follows that the rat can be used as experimental model of dialysis peritoneal and the glucose concentration and temperature altered the histomorphology and the mast cells counting in peritoneum.

Key words: Rat, Peritoneal Dialysis, Glucose, Temperature.

1. INTRODUÇÃO

Diálise Peritoneal (DP) é um processo terapêutico que remove solutos tóxicos dos fluidos corporais e normaliza os solutos endógenos que estão em concentrações alteradas interferindo na fisiologia normal. De modo geral este processo consiste na infusão de uma solução eletrolítica dentro da cavidade abdominal onde em equilíbrio com o plasma por osmose e difusão, atravessam a membrana peritoneal. A solução é então drenada da cavidade abdominal removendo o excesso de solutos e água. Este sistema é repetido o tanto quanto for necessário até: a resolução dos sintomas urêmicos, normalização da hidratação, equilíbrio eletrolítico e ácido-básico ou remoção das toxinas da circulação. Em humanos a DP é indicada para: manejar os dois tipos de insuficiência renal a crônica e aguda, bem como para remover toxinas dializáveis (etilenoglicol, etanol, barbitúricos), para reduzir severos distúrbios metabólicos (hipercalcemia, hipercalemia, encefalopatia hepática), para tratar peritonites, pancreatite, uroabdômen, hipotermia, hipertermia e sobrecarga de fluidos secundária a insuficiência cardíaca (Dzyban et al. 2000).

A DP envolve o transporte de solutos e água através de uma “membrana” que separa dois compartimentos que contêm líquidos. Estes dois compartimentos são: (a) o sangue no capilar peritoneal o qual na insuficiência renal contêm um excesso de uréia, creatinina, potássio e outros; e (b) a solução de DP, que tipicamente contém sódio, cloreto e lactato que é convertida em hiperosmolar pela inclusão de uma alta concentração de glicose (Daugirdas et al. 2003) (Figura 1).

O processo físico de transferência de solutos através de uma membrana semipermeável foi descrito e chamado de diálise pela primeira vez por Thomas Graham em 1861. Ele demonstrou que a uréia poderia atravessar uma membrana de pergaminho e especulou que a técnica poderia ter uma aplicação médica (Coles 1994).

A utilização do peritônio como uma membrana para trocas em seres vivos foi descrita primeiramente por Wegner, investigador alemão, que em 1877

publicou os resultados de estudos experimentais em coelhos perfundindo a cavidade peritoneal com solução salina fria e soluções hipertônicas contendo açúcar ou glicerol, que resultaram em redução da temperatura corporal dos animais e aumentaram o volume do efluente peritoneal respectivamente (apud Caramori 1999).

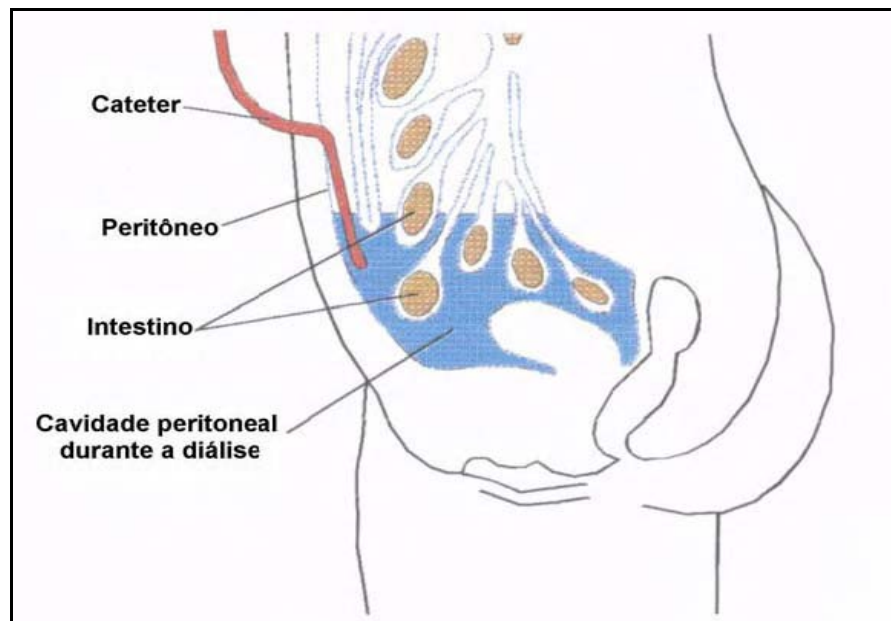


Figura 1. Esquema da diálise peritoneal em humanos com o líquido de diálise na cor azul dentro da cavidade abdominal

Putnam em 1923 foi o primeiro pesquisador a caracterizar o peritônio como uma membrana de diálise em animais. Este trabalho esclareceu a evidência de que a membrana peritoneal era permeável em duas direções, ou seja, ele estabeleceu o princípio do transporte de solutos e a ultrafiltração (UF) que são verdades úteis hoje em dia (Lameire et al. 1998).

Em 1923, Georg Ganter publicou um novo método de remoção de toxinas do sangue através da diálise tornando-se o pioneiro neste tipo de terapia de tratamento renal (Teschner et al. 2004). No mesmo ano ele realizou o primeiro uso clínico da diálise em humanos (apud Caramori 1999).

Apesar da terapia pela diálise peritoneal ter sido introduzida antes da hemodiálise, ela entrou em desuso durante a década de 1960 por causa das desvantagens como a necessidade de um furo abdominal todo dia, o risco de peritonite e perfuração do intestino (Oreopoulos 1978b).

Em 1965, Weston & Roberts desenvolveram um cateter temporário e Bigelow et al. (1973) desenvolveram a prótese de Dean, com isso algumas das desvantagens da DP diminuíram; mas foi o cateter peritoneal permanente projetado por Palmer e modificado por Tenckhoff que estabeleceu a diálise peritoneal crônica como um procedimento seguro, simples e indolor (Oreopoulos 1978a; Oreopoulos 1978b).

Segundo Oreopoulos (1978b), os principais fatores responsáveis pelo retorno da diálise peritoneal crônica como método de diálise foram: um cateter peritoneal permanente; os nefrologistas aceitarem para diálise peritoneal crônica pacientes com mais de 55 anos e aqueles com doenças sistêmicas, que toleram melhor a diálise peritoneal do que a hemodiálise e a diálise peritoneal em casa (Oreopoulos, 1978b).

Desde sua introdução na medicina humana em 1976, a Diálise Peritoneal Ambulatorial Crônica (DPAC), utilizando soluções de diálise processadas em sacos plásticos, ocuparam um importante lugar no controle de pacientes no estágio terminal de doença renal e tem sido considerada uma valiosa alternativa de tratamento em muitos casos (Thornhill & Riviere 1983).

Em paralelo, com o desenvolvimento dos programas clínicos de DPAC na década de 1980, houve um crescente interesse sobre as características de transporte e permeabilidade da membrana peritoneal estimulando os estudos da fisiologia peritoneal em animais (Lameire et al. 1998).

O programa de DPAC foi iniciado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Unesp de Botucatu em março de 1990. Diversas pesquisas estão em desenvolvimento neste serviço, com destaque para os estudos das complicações infecciosas e aquelas que avaliam a eficácia da diálise na remoção de solutos, particularmente em situações de injúria renal aguda. Entretanto, os estudos clínicos falham em acompanhar adequadamente as agressões à membrana peritoneal. Diante disto e para aumentar o entendimento da DP, propomos este modelo experimental para avaliar a estrutura peritoneal e padronizar o método de pesquisa.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Anatomia e histologia do peritônio

O peritônio é uma membrana serosa que reveste a cavidade peritoneal (Figura 2) e é dividido em duas porções: peritônio visceral que reveste o intestino e outras vísceras e peritônio parietal que reveste as paredes da cavidade abdominal. O peritônio visceral responde por aproximadamente 80% da área de superfície peritoneal total e recebe suprimento sanguíneo da artéria mesentérica superior, enquanto a sua drenagem venosa se faz pelo sistema porta. Ao contrário, o peritônio parietal recebe sangue das artérias lombares, intercostais e epigástricas e drena para a veia cava inferior (Daugirdas et al. 2003). As duas mais importantes funções do peritônio consistem em diminuir o atrito e opor resistência às infecções. Uma função menos importante é o armazenamento de gordura, especialmente no omento maior. O omento maior é uma prega peritoneal proeminente que tem origem no estômago, anteriormente ao cólon transverso, ao qual se prende. Quando é tracionado para cima, as alças do intestino delgado podem ser examinadas e o mesentério acompanhado até sua raiz (Gardner et al. 1988).

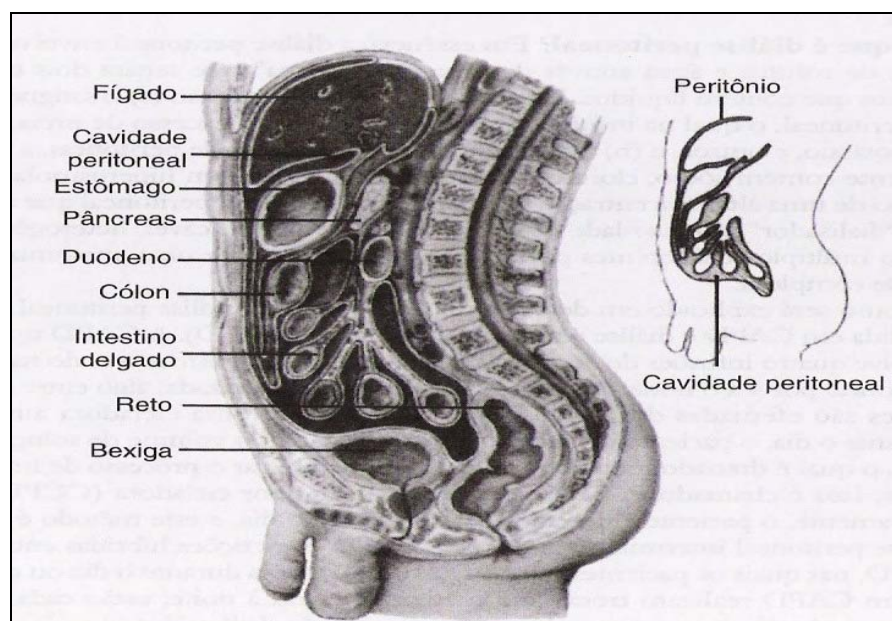


Figura 2. Anatomia simplificada da cavidade peritoneal humana

Histologicamente, a membrana peritoneal consiste de uma monocamada de células mesoteliais com um estroma contendo capilares, fibroblastos dispersos e um número indeterminado de macrófagos teciduais (Williams 1995) (Figura 3).

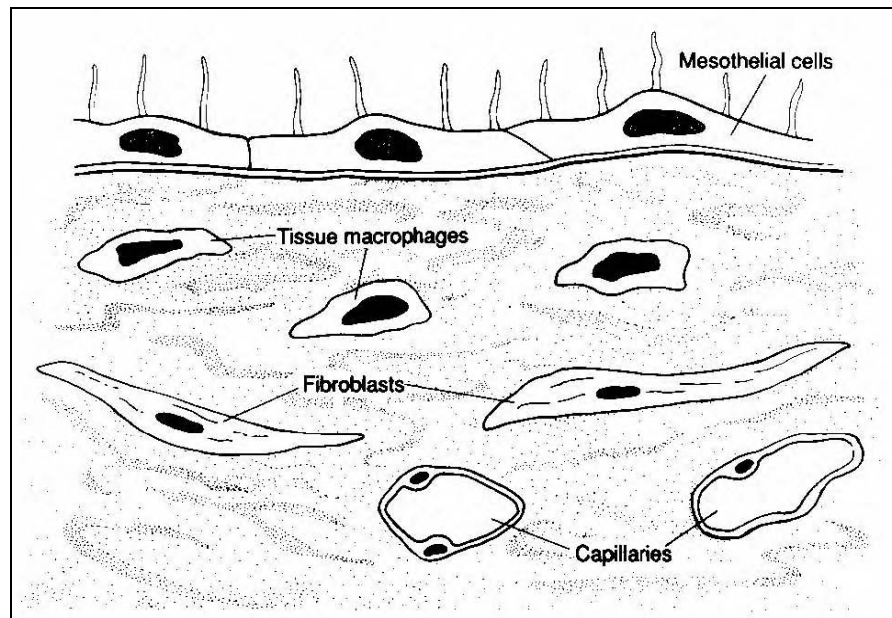


Figura 3. Membrana peritoneal esquematizada

2.2 Os efeitos da diálise na membrana peritoneal

Segundo Dobbie et al. (1994), a DP tem sido empregada como um tratamento de suporte para os pacientes renais nos últimos 40 anos, mas somente nos últimos 28 anos ela tem sido usada continuamente e o peritônio é exposto ao efeito do dialisante diariamente, todo dia, por anos a fio. Diante disto, desde o princípio da DPAC no final dos anos 70, existia uma persistente ansiedade sobre as possíveis lesões que surgiriam na delicada membrana pela natureza contínua da terapia e dos episódios de peritonite freqüentes.

A viabilidade da membrana peritoneal durante longos períodos de DP e a capacidade da membrana de filtrar os líquidos e remover os solutos em pacientes anúricos são as duas maiores complicações nos pacientes em DP (Peng et al. 2000). As soluções de diálise peritoneal (SDP) são consideradas não-fisiológicas ou bioincompatíveis e por causa disto foram observados durante DP crônica um aumento progressivo no transporte de pequenos

solutos com o tempo de tratamento, falha na UF e fibrose peritoneal (Musi et al. 2004).

As alterações peritoneais começam com as modificações mesoteliais e mais tarde envolvem alterações submesoteliais, fibrose e vasculopatias. Após meses ou anos de DP em humanos, fibrose é praticamente um achado constante. Consiste de um tecido esclerótico que raramente se estende para todo o peritônio, mas é limitado em áreas de peritônio parietal e visceral. As características de fibrose podem ser reproduzidas em ratos após DP sem a necessidade de ação de nenhum outro agente no peritônio (Garosi & Di Paolo, 2000).

Durante DPAC várias alterações morfológicas ocorrem no peritônio, incluindo: denudação mesotelial, fibrose intersticial, neovascularização e alterações vasculares como duplicação da membrana basal, fibrose, hialinização da parede vascular. Entre as causas sugeridas para estas alterações histológicas e funcionais são: a resposta de natureza não-fisiológica das SDP em particular, a alta concentração de glicose, a hipertonicidade, o lactato, baixo pH, as peritonites recorrentes, a liberação de plásticos dos materiais utilizados e os avançados produtos finais da glicosilação (Zareie et al. 2003 e Duman et al. 2004).

Em estudos clínicos, as alterações morfológicas vistas no peritônio também podem ser causadas pela ocorrência de peritonite. Peritonites freqüentes podem alterar a morfologia do peritônio e o aumento do transporte da membrana peritoneal (Jonasson & Braide 1998).

Segundo George Wu (1982), o agente osmótico ideal para a DPAC deveria ter as seguintes propriedades: não ser tóxico e bem tolerável; não absorvível assim exerceria um efeito osmótico contínuo e manteria a UF mais prolongada (isto também evitaria a síndrome hiperosmolar secundária à absorção excessiva de partículas osmoticamente ativas), ser facilmente metabolizado como uma fonte de energia; o agente osmótico não deveria ter qualquer efeito prejudicial nas propriedades físicas ou fisiológicas da membrana peritoneal; não deveria causar nenhuma alteração bioquímica ou metabólica e deveria ser barato e facilmente fabricado.

Os estudos *in vitro* da biocompatibilidade do fluido de DP datam de 1981 quando Duwe, Vas e Weatherhead relataram que ambos: baixo pH e hiperosmolalidade dos fluidos de DP comerciais tamponados com lactato inibiam as funções dos leucócitos como: a fagocitose, a atividade bactericida e quimiluminescência. Desde então, rapidamente cresceram o número de estudos *in vitro* com os fluidos de DP que estão sendo publicados e todos sugerem que a combinação do lactato e pH ácido adversamente afetam a função de ambos: leucócitos e células mesoteliais peritoneais (Jorres et al. 1998).

A glicose é conhecida por ser um fator importante de bioincompatibilidade dos fluidos de DP comercialmente viáveis. Pelo menos dois mecanismos estão envolvidos no impacto negativo da glicose na função e estrutura peritoneal: o efeito metabólico direto da alta concentração de glicose (hiperosmolalidade) e a presença dos produtos de degradação da glicose (GPDs) durante a esterilização e armazenamento dos fluidos de diálise peritoneal que podem intensificar os efeitos deletérios da glicose nas soluções de diálise (Styszynski et al. 2003).

A esterilização das soluções de diálise ocorre pela adição de energia na forma de radiação ou de calor. É conhecido que este processo leva a degradação e alteração das moléculas de glicose (Phillips et al. 1958; Feather & Harris 1973) levando a formação dos GPDs (Schalkwijk et al. 1999). O grau de degradação depende de vários fatores diferentes como: modo de esterilização, tempo de armazenamento, pH, luz, concentração de glicose, substâncias catalisadas e temperatura. Relatos antigos mostram que os GPDs são tóxicos a diferentes tipos de células. Um dos primeiros relatos de interesse foi publicado a mais de 100 anos atrás com o artigo de Roux (1887) demonstrando a morte de esporos devido à exposição média de uma fração de carboidratos a luz solar. Em 1935 foi demonstrado por Blank & Arnold que 20 carboidratos diferentes (inclusive a glicose) foram expostos à radiação ultravioleta e inibiram o crescimento de bactérias. Por muitos anos o interesse na degradação da glicose foi focado principalmente na produção de alimentos mais seguros, meios de cultura celular e fluido para injeção intravenosa (Wieslander et al. 1995).

Com o uso por longos períodos SDP convencional altera a função e a morfologia da membrana peritoneal. Um dos efeitos mais desfavoráveis das SDP convencionais é a presença de GPDs. A glicose é facilmente degradada em GPDs quando aquecida bem como durante o armazenamento de fluidos esterilizados. Os GPDs compreendem um grande número de substâncias como: os acetaldeídos, formaldeídos, metilglioxal, 3-deoxiglicosona e 3,4-dideoxiglicosona-3-n com uma média de peso molecular de aproximadamente 100, mas muitos outros GPDs já estão sendo identificados (Kim et al. 2007).

Outra complicação da DP são as peritonites que frequentemente resultam em uma condição clínica que compromete a evolução do organismo, em adição associam-se as alterações funcionais e estruturais da membrana peritoneal com aumento no transporte de solutos, diminuição da UF, aumento da densidade vascular e fibrose. Na urgência de peritonite, são freqüentes: as obstruções do cateter de diálise peritoneal e seus efeitos podem comprometer severamente a interpretação dos resultados experimentais (Mortier et al. 2005). Na medicina humana a peritonite ainda responde pela principal causa de falência do método com retirada temporária ou definitiva da DP (apud Caramori 1999).

Peritonite em modelos experimentais pode ser diagnosticada pela cultura do dialisato e/ou contagem de células sanguíneas brancas (CSB). Suzuki et al. (1995) encontraram um valor de referência na contagem de CSB em um modelo de DP em ratos ao redor de 1000-1700 células/mm³. Em outro estudo, Mortier et al. (2003) encontraram um valor na contagem de CBS em animais com cultura do efluente negativa de 853 células/mm³. Mortier et al. (2005) definiram peritonite como a combinação da cultura positiva e a contagem de CBS do dialisato maior do que 1000 células/mm³.

Os patógenos mais comuns são os organismos gram-positivos, com os *Staphylococci* coagulase-negativos sendo responsáveis por 30 a 40% dos episódios de peritonite em humanos. Entretanto a relativa contribuição dos organismos gram-negativos na DP tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (Gokal 2000).

A alta incidência de infecção intraperitoneal continua sendo um problema importante nos modelos animais de exposição crônica ao dialisante.

Administração profilática de antibióticos pode ser usada para resolver este problema, mas os efeitos isolados dos antibióticos na função e estrutura da membrana peritoneal são desconhecidos. Mortier et al. (2003) concluíram que a administração profilática de oxacilina e gentamicina adequadamente preveniu a infecção peritoneal em um modelo animal de exposição crônica ao dialisante.

Outro achado interessante da DP é o papel dos mastócitos no peritônio. Ele é uma célula inflamatória fundamental, originário da medula óssea e que mostra uma distribuição tecidual peculiar. O peritônio bem como outras superfícies serosas, é um dos poucos tecidos dos quais os mastócitos são comuns. Recentemente, novas funções estão sendo descritas para os mastócitos; já é bem conhecido o papel deles nas doenças alérgicas e na resposta imune contra parasitas, mas eles parecem participar ativamente de funções mais complexas da imunidade adquirida ou inata contra bactérias e vírus. Mais recentemente, vários trabalhos descreveram um papel importante na defesa do peritônio contra infecção. Entre as funções não-imunológicas existem evidências consideráveis dos mastócitos no tecido de remodelação, fibrogênese e angiogênese. Um aumento quantitativo nos mastócitos tem sido descrito em vários modelos de fibrose, incluindo o peritônio. Esta é uma questão não resolvida e o exato papel dos mastócitos precisa ser estabelecido (Jiménez- Heffernan et al. 2006).

Em um modelo de DP no rato, demonstrou-se que a instilação diária de SDP por cinco semanas causou alterações celulares na membrana peritoneal, bem como o aumento do número de mastócitos no omento (Zareie et al. 2005). Wieczorowska-Tobis et al. (2001) encontraram uma quantidade relativamente grande de mastócitos, principalmente no compartimento interno do tecido conjuntivo submesotelial de ratos dialisados com SDP com 3,86% de glicose durante quatro semanas.

Apesar de comum na membrana peritoneal poucos trabalhos tem avaliado os mastócitos durante o tratamento da DP (Jiménez- Heffernan et al. 2006). Hekking et al. (2001) observaram uma diminuição significativa no número de mastócitos da cavidade peritoneal de ratos tratados com DP quando comparados com o controle.

2.3 Considerações sobre a diálise peritoneal experimental

Os modelos animais são utilizados para mimetizar o processo de DP nos humanos. Um modelo *in vivo* tem o potencial de fornecer informações como: 1) biocompatibilidade de novos agentes osmóticos, 2) as modificações sofridas pelos fluidos bem como o tempo de procedimento, 3) a interação que ocorre entre os diferentes tipos de células na membrana, 4) a troca de eletrólitos e líquido que ocorre na microcirculação peritoneal, 5) estudar a fisiologia de transporte da membrana peritoneal, 6) manipulação dos efeitos farmacológicos, 7) estudo dos mecanismos de defesas peritoneais locais contra infecções, 8) alterações morfológicas do peritônio e 9) modelos de uremia para investigar a patofisiologia do estado urêmico (Rubin et al. 1983; Lameire et al. 1998 e Mortier et al. 2005).

Vários grupos de pesquisa trabalham com modelos animais que se diferenciam substancialmente de acordo com a espécie e linhagem dos animais experimentais, método de acesso peritoneal, duração do estudo, valores de transporte dos solutos de UF e diferentes locais de colheita das amostras para a histologia (Mortier et al. 2005).

A estrutura peritoneal é similar em todos os mamíferos, por esta razão, é importante reproduzir as alterações causadas pela DP o mais próximo possível da DP em humanos (Garosi & Di Paolo, 2001). Para isso vários modelos de diálise crônica têm sido usados nos últimos anos. A maioria dos investigadores tem utilizado o rato ou coelho como modelos de DP. Ambos os animais têm suas vantagens e desvantagens. O rato é fácil de alojar, econômico e modelo estável de insuficiência renal crônica (IRC) por isso é o mais usado (Lameire et al. 1998).

Uma desvantagem do uso dos ratos para testar soluções é que a icodextrina (por exemplo) não pode ser avaliada por causa dos altos níveis de amilase intraperitoneais que causam degradação local da icodextrina em associação com aumento da osmolalidade do dialisante. Níveis séricos altos de amilase não são únicos nos ratos, ocorrem também em outros roedores como os camundongos e porquinhos da guinea (Waart et al. 2001 e Mortier et al. 2005).

Embora os modelos com coelhos permitam que a DP seja realizada por um longo período de tempo e mimetizam certos aspectos da situação humana (como a proporção da área de superfície peritoneal e o volume de trocas em coelhos que são similares aos humanos), coelhos são animais mais difíceis de alojar e sensíveis (Garosi & Di Paolo 2001).

Os métodos de instilação dos fluidos de DP são amplamente variáveis (Mortier et al. 2005). Em um estudo comparando três modelos de diálise crônica em ratos, Peng et al. (2000) observaram que o modelo de injeção intraperitoneal (IP) pode ser o método de escolha para testar novas SDP, mas deve-se tomar cuidado para não puncionar o intestino ou injetar o fluido dentro da parede abdominal.

O volume instilado nos ratos também tem sido uma questão de debate entre os grupos de pesquisa. A infusão de grandes volumes causa angústia respiratória. A quantidade de líquido instilada nos modelos de DP varia de 10ml a 20ml chegando até a 25ml. A frequência de instilação também varia amplamente entre os diferentes grupos de pesquisa, variando de uma a duas vezes, ou até três vezes por dia (Mortier et al. 2005).

Outra dificuldade dos pesquisadores é sobre a colheita de amostras de tecido para avaliação do peritônio. Muitos pesquisadores usam principalmente o peritônio visceral enquanto outros exclusivamente o peritônio parietal (Mortier et al. 2005). Análises pareadas de biópsias de peritônio parietal e visceral nos humanos sugerem que as alterações na membrana visceral são menos pronunciadas do que as da membrana parietal (Williams et al., 2003). O inverso foi observado em alguns estudos em animais (De Vriese et al. 2002 e Martin-Martinez et al. 2004). Outro grupo de pesquisa demonstrou que diferentes tecidos peritoneais (peritônio visceral, peritônio parietal, omento) podem responder diferentemente à exposição de fluidos de DP (Hekking et al. 2001 e Zareie et al. 2001). Deste modo erros podem ser introduzidos quando amostras são tiradas de lugares diferentes do peritônio e embora não exista um consenso de um lugar representativo onde as amostras de peritônio devem ser obtidas, está claro que uma retirada sistemática das amostras é essencial (Mortier et al. 2005).

Independente do modelo animal escolhido, o principal problema para estudar a estrutura da membrana peritoneal é a colheita. O mesotélio seca rapidamente quando exposto ao ar. Para prevenir danos devido a artefatos, o material normalmente é lavado e fixado tão logo a cavidade peritoneal seja aberta (Garosi & Di Paolo 2001). Na experiência de Di Paolo et al. (1995) a fixação em *in vivo* é o melhor caminho para proteger a amostra de artefatos.

3. OBJETIVOS

- 1) Introduzir um modelo experimental de diálise peritoneal nas pesquisas da instituição.
- 2) Avaliar o impacto da concentração de glicose e da temperatura através da análise histomorfológica e contagem de mastócitos na membrana peritoneal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e grupos experimentais

Foram utilizados (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, adultos, machos, com massa inicial variando de 170 – 305 g, média de 256,4 g ($\pm$ 28,9 g), provenientes do Biotério Central da UNICAMP – Campinas/SP. Os animais foram divididos em cinco grupos assim constituídos:

1. Grupo Solução Concentrada (GSC) - Neste grupo os ratos receberam 10 ml de fluido de diálise com 4,25% de glicose armazenada em temperatura ambiente, através de injeção intraperitoneal (IP) diária, durante quatro semanas. Este grupo foi constituído por 12 animais.

2. Grupo Solução Concentrada Aquecida (GSCA) - Neste grupo os ratos receberam 10 ml de fluido de diálise com 4,25% de glicose, através de IP diária, aquecida durante quatro semanas. Este grupo foi constituído por 12 animais.

3. Grupo Solução Fisiológica NaCl 0,9% (GSF) - Neste grupo os ratos receberam 10 ml de solução fisiológica NaCl 0,9%, armazenada em temperatura ambiente, através de IP diária, durante quatro semanas. Este grupo foi constituído por 12 animais.

4. Grupo Solução Fisiológica NaCl 0,9% Aquecida (GSFA) - Neste grupo os ratos receberam 10 ml de solução fisiológica NaCl 0,9%, através de IP diária, aquecida durante quatro semanas. Este grupo foi constituído por 12 animais.

5. Grupo Controle (GC) – Neste grupo os animais não receberam nenhuma IP e foram mantidos no laboratório por quatro semanas. Este grupo foi constituído por nove animais.

Quatro horas antes da realização do procedimento de diálise, foram colocadas panelas no fogão com água para ferver. Após 15 a 20 minutos a água quente era colocada em quatro bolsas térmicas com capacidade de dois litros (tanto a bolsa de diálise como a bolsa de solução fisiológica foram encaixadas entre as duas bolsas térmicas). A caixa térmica de isopor era montada da seguinte forma: bolsa de água quente no fundo, bolsa de diálise e

bolsa de água quente por cima, uma toalha, novamente uma bolsa de água quente, a bolsa de solução fisiológica e a última bolsa de água quente e o isopor era fechado. Este procedimento de aquecimento foi feito desta forma para repetir as mesmas condições que os pacientes da DP fazem em suas casas para aquecer a bolsa antes da infusão (Figura 4 e Figura 5) (Tabela 1).



Figura 4. Montagem das bolsas



Figura 5. Caixa térmica de isopor

Tabela 1. Observação da temperatura das bolsas de diálise e do isopor antes da infusão abdominal.

Data	Glicose Ambiente	NaCl 0,9% Ambiente	Glicose Aquecida	NaCl 0,9% Aquecida	Temperatura do Isopor após 3,5 horas de aquecimento
20/05	24,2 °C	24,2°C	43,2°C	45,2°C	49,8 °C
23/05	21,2°C	21,7°C	40,4°C	43,2°C	45,2°C
24/05	22,1°C	22,1°C	46,6°C	50,6°C	47,0°C
25/05	22,3°C	22,3°C	46,2°C	45,1°C	45,3°C
30/05	22,2°C	22,2°C	45,5°C	47,4°C	43,2°C
31/05	22,4°C	22,4°C	47,4°C	47,4°C	47,0°C
01/06	22,4°C	22,4°C	45,6°C	45,3°C	46,8°C
02/06	22,2°C	22,2°C	46,8°C	48,3°C	46,3°C
06/06	22,3°C	22,3°C	48,2°C	48,2°C	43,0°C
07/06	21,5°C	21,5°C	45,8°C	44,6°C	47,4°C
08/06	22,0°C	22,0°C	49,3°C	48,0°C	49,7°C
09/06	22,7°C	22,7°C	52,2°C	48,3°C	46,4°C
13/06	-	-	48,2°C	49,5°C	43,5°C

O procedimento de diálise foi realizado uma vez por dia, durante 30 dias, no período da manhã, entre 8:00 e 11:00 horas. Os animais foram pesados duas vezes por semana e no primeiro e último dia de experimento.

Todos os animais foram deixados em observação para adaptação durante três semanas antes do experimento. Os animais foram mantidos sob condições convencionais de laboratório e tinham livre acesso à comida e água.

Os animais que viessem a óbito durante o experimento seriam submetidos a exames *post mortem*. Após quatro semanas todos os animais foram sacrificados e submetidos a exames da cavidade abdominal e colheita de amostras do peritônio.

Todos os procedimentos realizados com os animais obedeceram aos princípios éticos estabelecidos pelo Comitê de Ética desta Universidade para a experimentação animal, protocolo número 62/2006-CEEA (Anexo 14).

4.2 Procedimento de diálise

Os animais foram posicionados em decúbito dorsal e o abdômen foi desinfetado com iodo-povidine. Foi injetado intraperitonealmente com uma seringa de 10 ml e uma agulha Nº 22 do lado abdominal esquerdo: 10 ml de solução de diálise com 4,25% de glicose em temperatura ambiente no grupo GSC, 10 ml de: solução de diálise com 4,25% de glicose aquecida no grupo GSCA, 10 ml de solução fisiológica NaCl 0,9% em temperatura ambiente no grupo GSF e 10 ml de solução fisiológica NaCl 0,9% aquecida no grupo GSFA (Figura 6 e 7).



Figura 6 e 7. Procedimento de diálise

4.3 Colheita do lavado peritoneal

Após quatro semanas foi feita a indução com anestesia geral com pentobarbital de sódio intramuscular na dose de 1 ml/Kg, assepsia com iodo-povidine no abdômen, abertura de uma pequena janela na pele na região abdominal ventral esquerda para introdução no peritônio de 40 ml de solução salina isotônica para colheita do lavado peritoneal (Figura 8 e 9). Para estudar a presença de peritonite foram preparados no Laboratório de Microbiologia da Unesp – Botucatu, dois frascos com meios enriquecidos próprios para o crescimento bacteriano: o TSB (caldo tripticasi soji) para bactérias aeróbias e o Tioglicolato para bactérias anaeróbias, e placas para semeadura: uma contendo ágar sangue (meio de cultura columbia ágar base acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado) e a outra com meio de cultura ágar MacConkey.



Figura 8. Introdução da solução salina no rato anestesiado



Figura 9. Colheita do lavado peritoneal

Logo em seguida foi feita uma massagem abdominal leve. Foram colhidos assepticamente 10 ml de lavado peritoneal (Figura 14) e introduzidos 5 ml em cada um dos frascos com caldos enriquecidos (TSB e Tioglicolato). Ao mesmo tempo foi feita a primeira semeadura nas duas placas. Essas placas foram incubadas a 37° C por 24 horas para avaliar se existia crescimento bacteriano.

Os frascos com caldos enriquecidos também foram levados para incubação a 37° C e observados para a presença de turvação diariamente durante cinco dias. Se fosse detectado qualquer sinal de turvação nesses caldos, eles eram passados pelo procedimento de semeadura nas duas placas com meios de cultura, com observação das placas em 24 horas. As placas que apresentavam crescimento bacteriano eram separadas para realização de testes bioquímicos para detectar o tipo de bactéria.

Ao final de cinco dias todos os caldos foram semeados nas duas placas com meios de cultura para confirmar se estas amostras realmente estavam negativas.

4.4 Técnica de colheita da membrana peritoneal

Após a colheita do lavado, 10 ml de Formol a 10% foi introduzido na cavidade abdominal para fixação antes da laparotomia. Vinte minutos após a introdução do fixador, o abdômen foi aberto e amostras do peritônio foram colhidas. Essas amostras foram colhidas da parede abdominal ventral (peritônio parietal) direito (do lado contrário de onde foram feitas a IP) (Figura 10 e 11), do baço com peritônio visceral (Figura 12), do intestino com o omento (Figura 13) e do mesentério inteiro (Figura 14); e foram colocados em frascos com formol a 10% por 24 horas. Após isso todas as amostras, exceto a do mesentério inteiro, foram transferidas para frascos com álcool 70% (Figura 21).

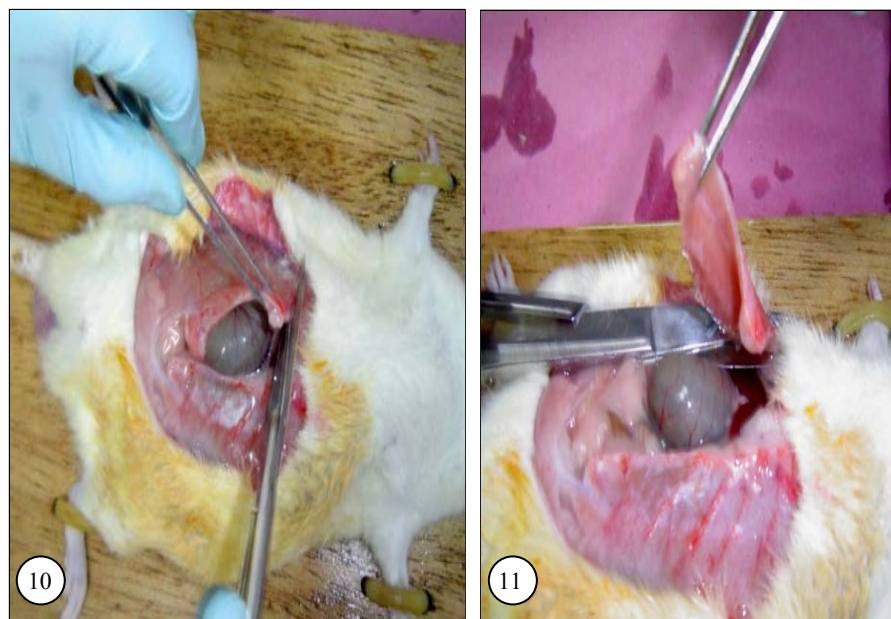


Figura 10 e 11. Procedimento de colheita do peritônio parietal na região abdominal direita



Figura 12. Procedimento de colheita do baço com o peritônio visceral

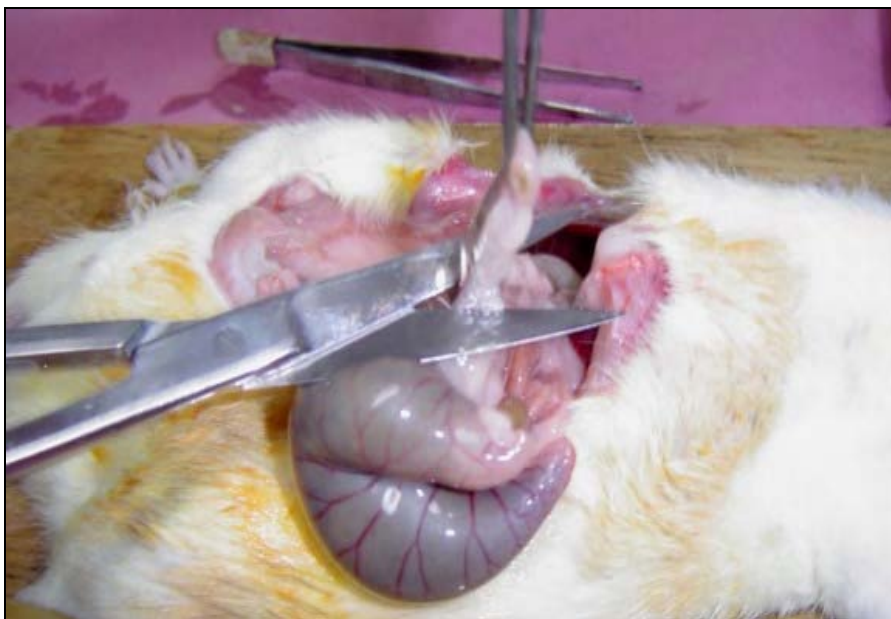


Figura 13. Procedimento de colheita do intestino com o omento



Figura 14. Montagem do mesentério no isopor

4.5 Processamento histopatológico

As amostras foram processadas após 24 horas dentro do álcool 70% pelo procedimento padrão do Laboratório de Patologia – Faculdade de Medicina- Unesp – Botucatu, e coradas como corante de Tricrômio de Masson e examinadas em microscópio óptico. O mesentério após a fixação no formol foi cortado, colocado em uma lâmina de vidro e corado com o Azul de Toluidina 1% para visualização dos mastócitos da análise morfométrica.

4.5.1 Análise histomorfológica e morfométrica do peritônio

A análise histomorfológica foi feita com base nos achados dos três cortes histológicos corados com Masson. Para uma comparação objetiva foi criada uma tabela de avaliação com as principais alterações. Usando o grupo controle como base, quando existiam alterações, elas foram quantificadas utilizando-se cruzes (+, ++, +++) sendo: uma cruz grau leve, duas cruzes grau moderado e três cruzes grau grave; e para cada alteração foi dado um valor numérico de pontuação levando-se em conta que quanto maior o número mais grave a alteração. Foram observados: 1) presença ou ausência de transformação cúbica das células mesoteliais ao redor do baço e o grau, 2) presença ou ausência de espessamento do peritônio parietal e o grau, 3) presença ou ausência de reação inflamatória e quando presente se esta reação era

localizada ou difusa e o grau e 4) presença ou ausência de fibrose e se era localizada ou difusa. No final da avaliação os pontos de cada animal foram somados (Tabela 2).

O tecido foi considerado com fibrose quando apresentava uma reação inflamatória organizada com a presença de neovascularização, espessamento submesotelial e atividade fibroblástica.

A análise morfométrica foi feita no microscópio modelo Axiophot 2 da marca Zeiss® usando a câmera digital para captura de imagens Axiocam HRc. O software para análise dos dados utilizado foi o Axiovision 4.1. Para esta análise contamos os mastócitos em 10 campos diferentes de cada lâmina no aumento de 10X, fechando antecipadamente as lâminas com códigos para que a contagem fosse imparcial.

4.6 Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando-se a ANOVA (análise da variância) para as variáveis: peso inicial e final, contagem do número de mastócitos e análise dos pontos da avaliação histomorfológica do peritônio. Quando a análise da variância apresentou diferença estatística significativa, o teste de Tukey para comparações múltiplas foi utilizado. Foi considerado altamente significativo estatisticamente quando $p < 0,01$ e significativo quando $p < 0,05$.

Tabela 2. Avaliação histomorfológica do peritônio e pontuação de acordo com as alterações.

Morfologia do peritônio			Pontuação
Espessamento do peritônio parietal	Ausente (epitélio pavimentoso simples)		0
	Espessado	Leve (+)	1
		Moderado (++)	2
		Grave (+++)	3
Transformação das células mesoteliais do peritônio ao redor de baço	Normal (células mesoteliais planas)		0
	Cúbicas	Leve (+)	1
		Moderado (++)	2
		Grave (+++)	3
Reação inflamatória	Ausente		0
	Presente	Local Leve (+)	1
		Local Moderada (++)	2
		Local grave (+++)	3
		Difusa Leve (+)	2
		Difusa Moderada (++)	4
Fibrose	Ausente		0
	Presente	Focal	3
		Difusa	4

5. RESULTADOS

5.1 Análise do peso inicial e final dos ratos

Os animais do GSC estavam com peso inicial variando de 253 - 299 g, média de 272,4 g ($\pm 15,8$ g); os animais do GSCA estavam com peso inicial variando de 226 - 295 g, média de 261,6 g ($\pm 20,1$ g); os animais do GSF estavam com peso inicial variando de 234 - 291 g, média de 259,9 g ($\pm 19,8$ g); os animais do GSFA estavam com peso inicial variando de 231 - 305 g, média de 258,8 g ($\pm 24,4$ g) e finalmente os animais do GC estavam com peso inicial variando de 170 - 303 g, média de 220,4 g ($\pm 40,9$ g) (Anexo1).

Quando se comparou a média dos pesos iniciais dos animais em todos os grupos pode-se observar diferença altamente significativa ($p=0,0003$). (Tabela 3). Utilizando-se o teste para comparações múltiplas do peso inicial, pode-se observar que a média do peso inicial do grupo GC apresentava diferença significativa em relação aos demais grupos (GSC, GSCA, GSF e GSFA).

Os animais do GSC estavam com peso final variando de 341-452 g, média de 399,9 g ($\pm 31,7$ g); os animais do GSCA estavam com peso final variando de 337- 445 g com média de 389,9 g ($\pm 36,8$ g); os animais do GSF estavam com peso final variando de 348 - 473 g, média de 398,8 g ($\pm 42,4$ g); os animais do GSFA estavam com peso final variando de 344 - 452 g, média de 393,3 g ($\pm 29,8$ g) e finalmente nos animais do GC estavam com peso final variando de 268 - 448 g, média de 343,7 g ($\pm 59,3$ g) (Anexo1).

Quando se comparou a média dos pesos finais dos animais em todos os grupos pode-se observar diferença estatística significativa ($p=0,0182$) (Tabela 3). Utilizando-se o teste para comparações múltiplas do peso final, pode-se observar que a média do peso final do grupo GC apresentava diferença significativa em relação aos grupos GSC e GSF.

Durante a colheita de material dos animais do GC o animal número 3 foi descartado da análise histomorfológica porque apresentava neoplasia abdominal.

Tabela 3. Análise de Variância (ANOVA) das variáveis: peso inicial, peso final, contagem dos mastócitos e análise dos pontos da histomorfologia

FV	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Quadrados Médios	F	P
Peso inicial	15265,751	4	3816,438	6,28**	0,0003
Peso final	21072,944	4	5268,236	3,27*	0,0182
Contagem dos Mastócitos	1,18E-6	4	2,96E-7	3,68**	0,0103
Análise dos Pontos da Morfologia	140,065	4	35,016	4,21**	0,0051

* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** - Significativo ao nível de 1% de probabilidade

5.2 Contagem de mastócitos

Os animais do grupo GSC apresentaram o número de mastócitos variando de 881 a 1655, média de 1249,2 ($\pm$ 257,4), os animais do grupo GSCA apresentaram o número de mastócitos variando de 723 a 1502, média de 1067,6 ($\pm$ 280,6), os animais do grupo GSF apresentaram o número de mastócitos variando de 682 a 2414, média de 1189,4 ($\pm$ 502,5), os animais do grupo GSFA apresentaram o número de mastócitos variando de 846 a 3009, média de 1281,2 ($\pm$ 613,5) e finalmente os animais do grupo GC apresentaram o número de mastócitos variando de 497 a 1467, média de 851,9 ($\pm$ 278,4) (Figura 15 e 16) (Anexo 2).

Comparando-se a média da contagem de mastócitos de todos os animais em todos os grupos pode-se observar diferença altamente significativa ($p=0,0103$) (Tabela 2) com o grupo GC apresentando a menor média, 851,9 mastócitos e o grupo GSFA a maior média, 1281,2 (Anexo 2). Utilizando-se o teste para comparações múltiplas pode-se observar que o grupo GC apresentava diferença significativa quando comparado com os grupos GSFA e GSC (Tabela 4).

Tabela 4. Comparações múltiplas das médias dos mastócitos em todos os grupos

(I) Grupo	(J) Grupos	Diferença de Média (I-J)
GC	GSC	0,00044452*
	GSCA	0,00028360
	GSF	0,00032157
	GSFA	0,00039757*
GSC	GC	-0,00044452*
	GSCA	-0,00016092
	GSF	-0,00012296
	GSFA	-0,0004695
GSCA	GC	-0,00028360
	GSC	0,00016092
	GSF	0,00003797
	GSFA	0,00011397
GSF	GC	-0,00032157
	GSC	0,00012296
	GSCA	-0,00003797
	GSFA	0,00007600
GSFA	GC	-0,00039757*
	GSC	0,00004695
	GSCA	-0,00011397
	GSF	-0,00007600

Grupo (I) comparado com todos os outros Grupos (J)

* Houve diferença significativa.

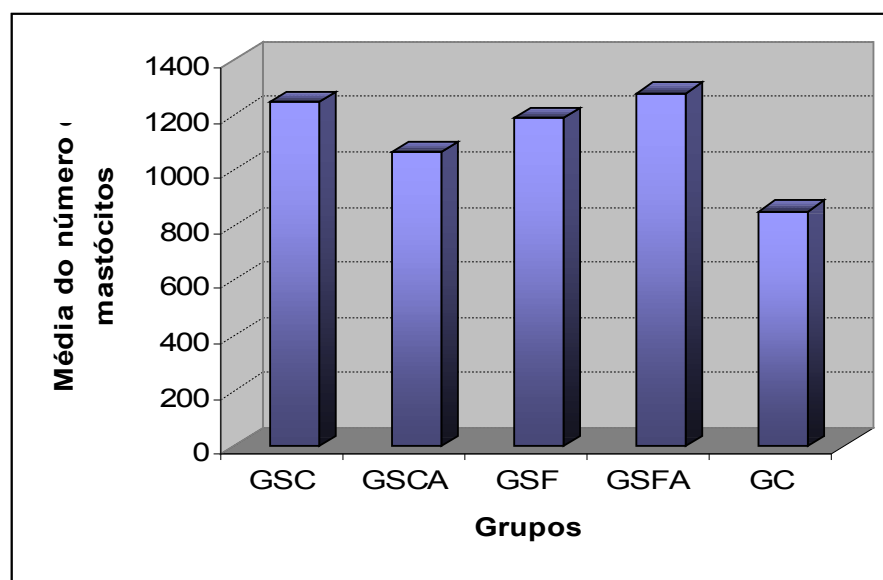


Figura 15. Gráfico com a média de mastócitos em todos os grupos

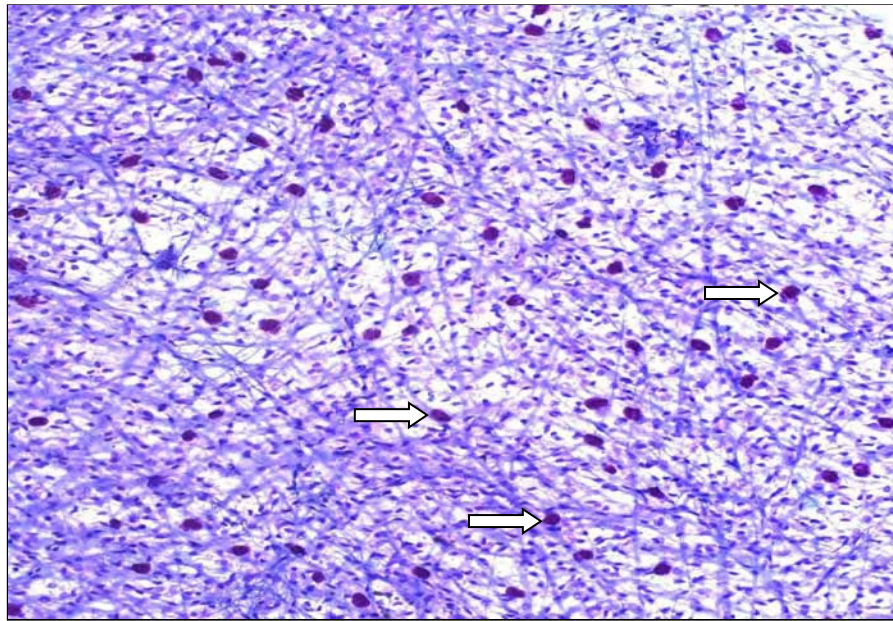


Figura 16. Lâmina de mesentério corada com azul de toluidina com vários mastócitos (setas)

5.3 Análise histomorfológica do peritônio

5.3.1 Análise do peritônio visceral do baço

Estudando-se a reação do peritônio visceral do baço nos animais do grupo GC pode-se observar que todos os animais apresentaram um epitélio pavimentoso simples (Figura 17 e 35) (Anexo 3).

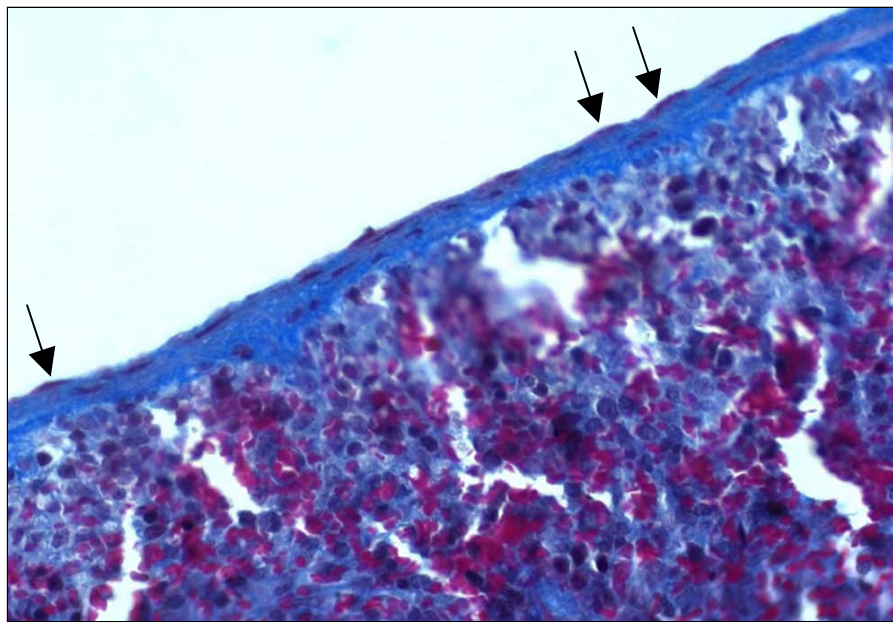


Figura 17. Peritônio visceral do baço com epitélio pavimentoso simples no GC. Veja as células mesoteliais planas (setas)

Nos animais do grupo GSC pode-se observar que cinco dos 12 animais apresentaram um epitélio pavimentoso simples; que é o tipo de epitélio normalmente encontrado em um peritônio que não sofreu nenhum tipo de agressão. Os outros sete animais apresentaram alterações epiteliais sendo que: quatro animais apresentaram uma leve (+) transformação cúbica das células mesoteliais, um animal apresentou uma grave (+++) transformação cúbica das células mesoteliais e dois animais apresentaram características moderadas (++) de transformação cúbica das células mesoteliais (Figura 18 e 35) (Anexo 4).

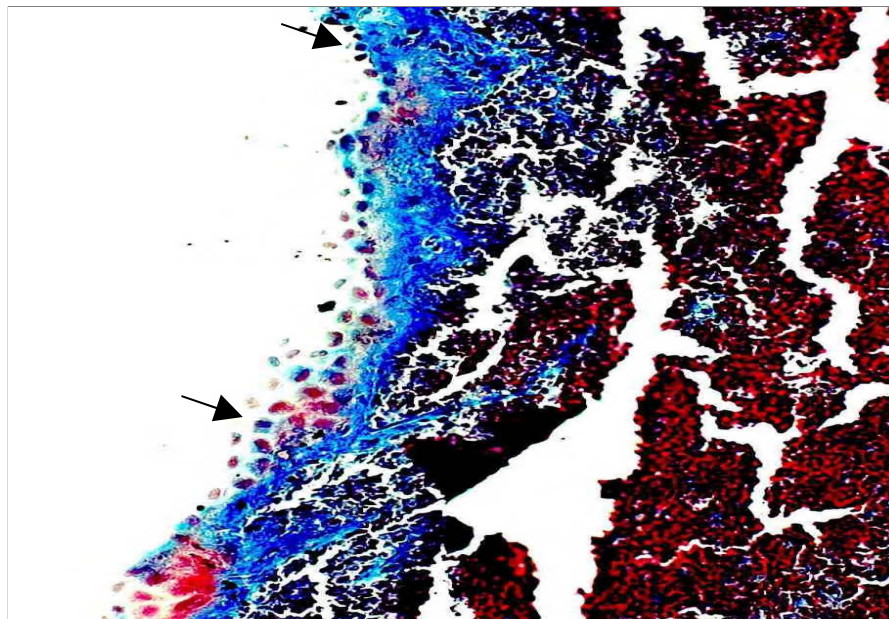


Figura 18. Peritônio visceral do baço do GSC com transformação cúbica das células mesoteliais grave (+++) (setas)

Nos animais do grupo GSCA pode-se observar que dez dos 12 animais pertencentes a este grupo apresentaram um epitélio pavimentoso simples. Um animal apresentou leve (+) transformação cúbica das células mesoteliais e um animal apresentou moderada (++) transformação cúbica das células mesoteliais (Figura 19 e 35) (Anexo 5).

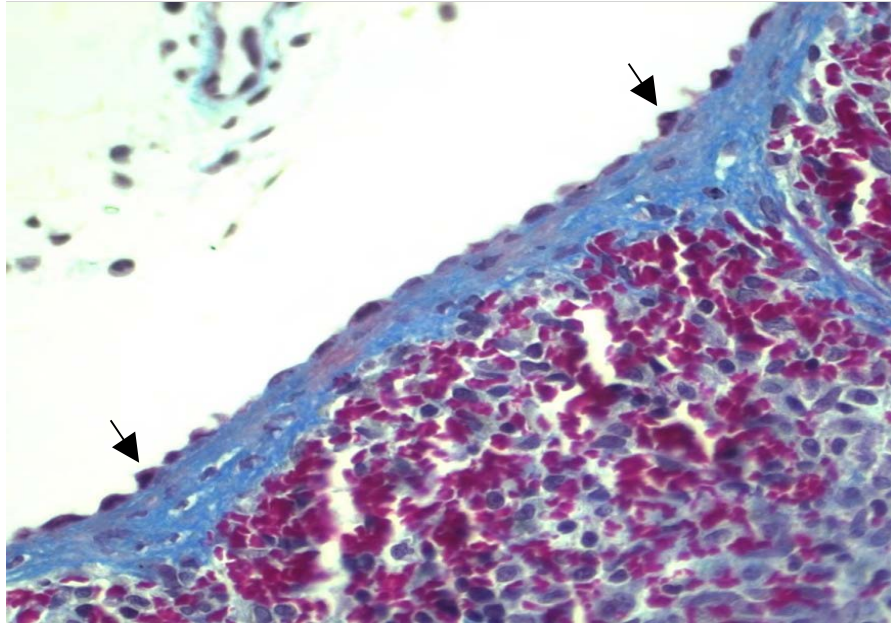


Figura 19. Peritônio visceral do baço no GSCA com transformação cúbica das células mesoteliais grau moderado (++) (setas)

Nos animais do grupo GSF pode-se observar que nove dos 12 animais pertencentes a este grupo apresentaram um epitélio pavimentoso simples. Três animais deste grupo apresentaram transformação cúbica das células mesoteliais num grau leve (+) (Figura 20 e 35) (Anexo 6).

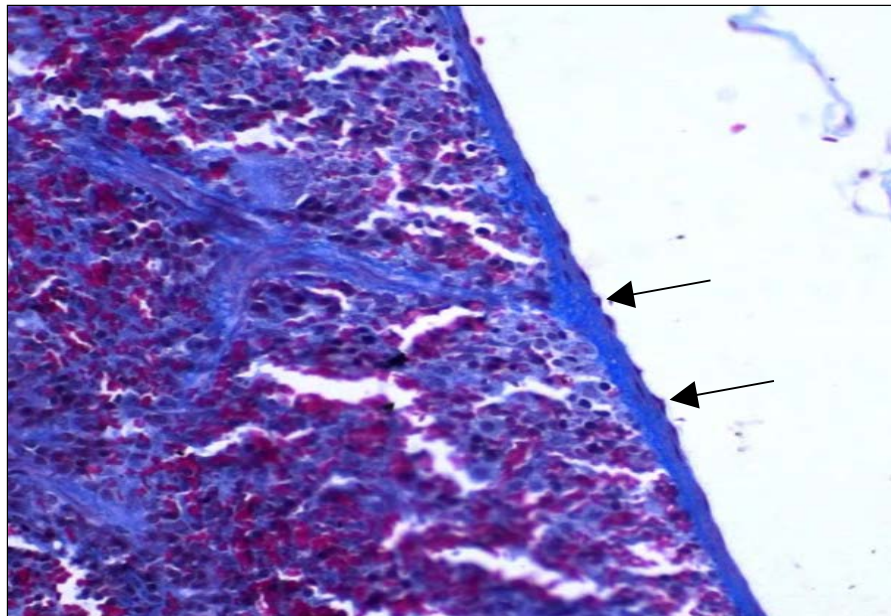


Figura 20. Peritônio visceral do baço no GSF com transformação cúbica das células mesoteliais de grau leve (+) (setas)

Nos animais do grupo GSFA pode-se observar que nove dos 12 animais pertencentes a este grupo apresentaram um epitélio pavimentoso simples (Figura 21). Dois animais deste grupo apresentaram transformação cúbica das células mesoteliais num grau moderado (++) e um animal apresentou transformação cúbica num grau leve (+) (Figura 35) (Anexo 7).

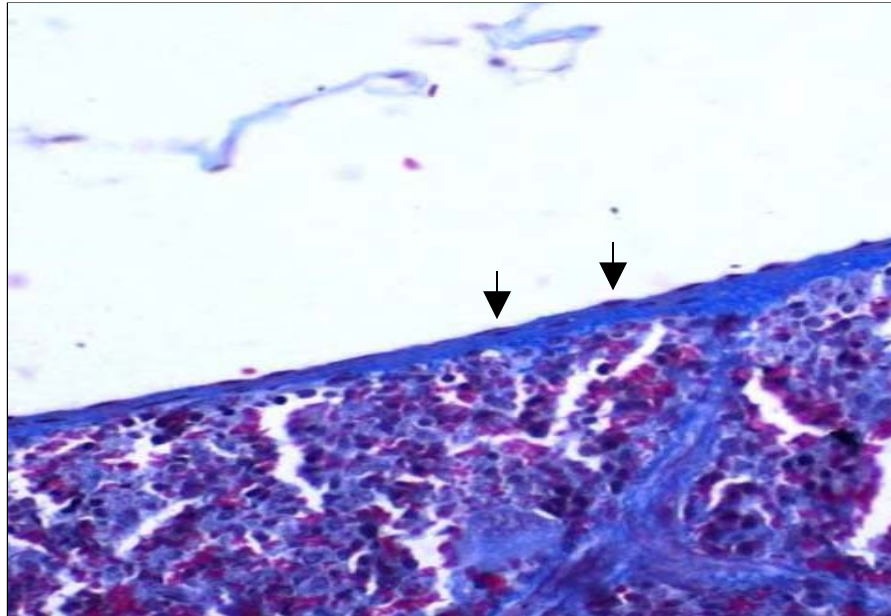


Figura 21. Peritônio visceral do baço no GSFA com células mesoteliais planas normais (setas)

5.3.2 Análise do peritônio parietal

Estudando-se a reação do peritônio parietal do GC, pode-se observar que todos os animais apresentavam um epitélio pavimentoso simples e a camada submesotelial sem edema ou espessamento (Figura 22 e 35) (Anexo 3).

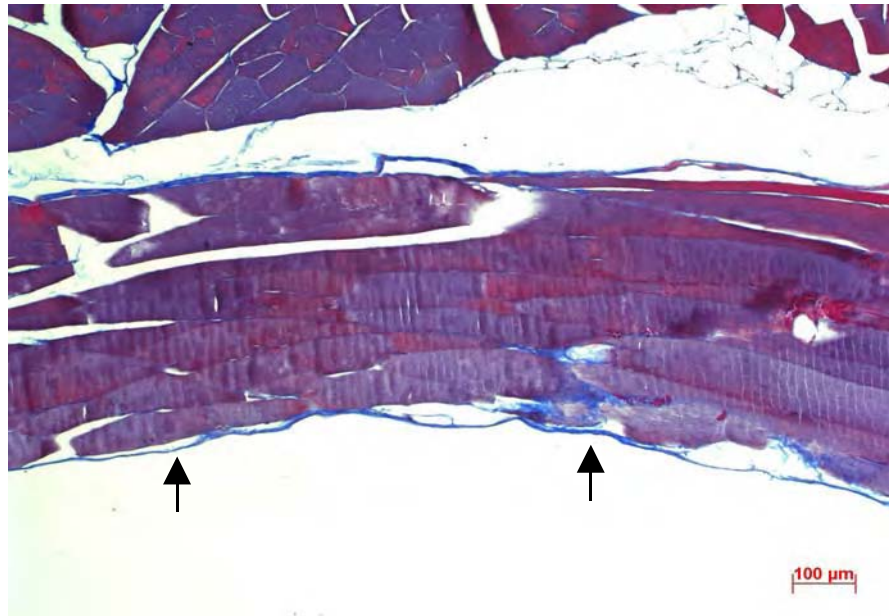


Figura 22. Peritônio parietal normal com epitélio pavimentoso simples sem evidência da camada submesotelial no GC (setas)

No GSC, pode-se observar que dois dos 12 animais estavam normais sem sinais de espessamento. Dos 10 animais com alteração na camada submesotelial do peritônio parietal, três animais apresentaram um espessamento grave (+++), três animais apresentaram um espessamento moderado (++) e quatro animais apresentaram um espessamento leve (+) (Figura 23 e 35) (Anexo 4).

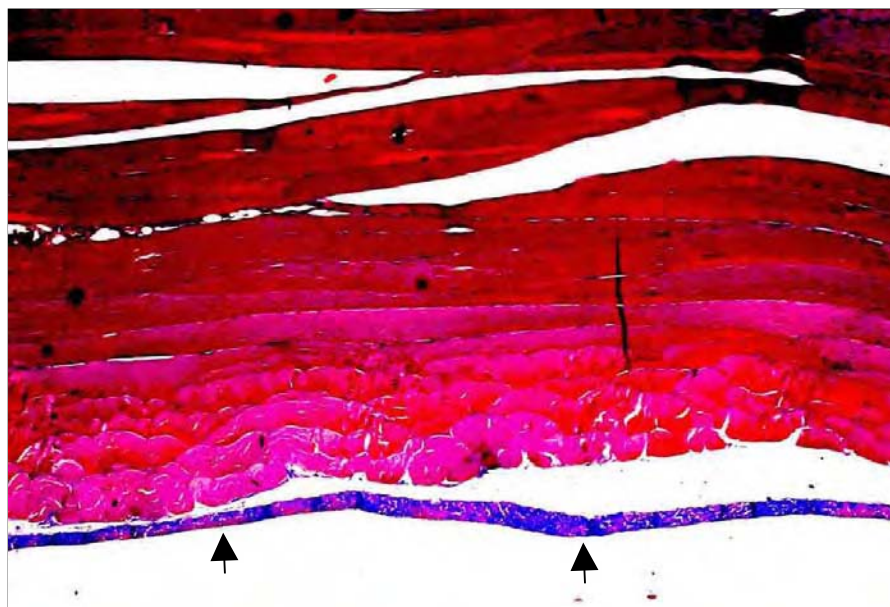


Figura 23. Peritônio parietal do GSC com espessamento grave (+++) (setas)

No GSCA, pode-se observar que um dos 12 animais estava normal, sem sinais de espessamento. Dos 11 animais com alteração na camada submesotelial do peritônio parietal, um animal apresentou um espessamento grave (+++), cinco animais apresentaram um espessamento moderado (++) e cinco animais apresentaram um espessamento leve (+) (Figura 24 e 35) (Anexo 5).

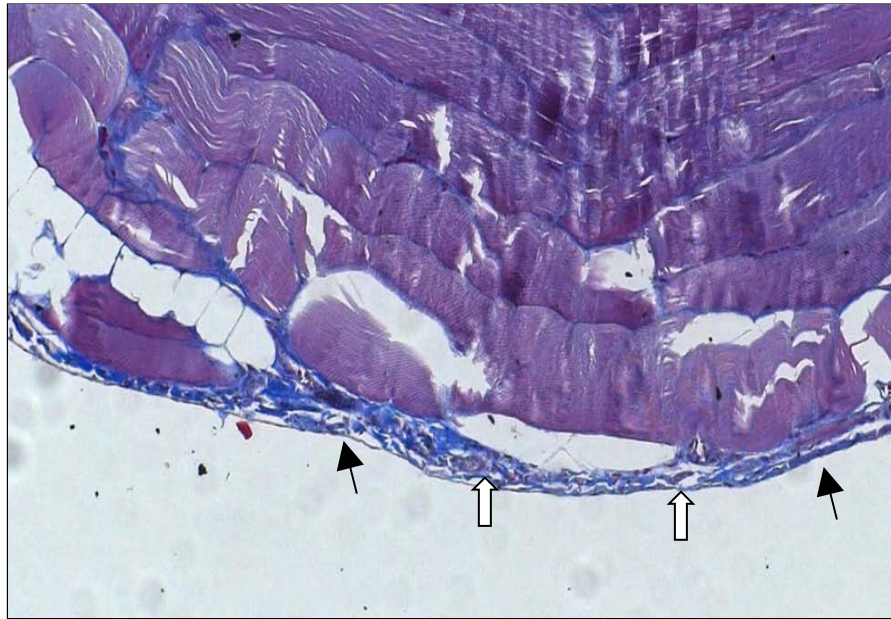


Figura 24. Peritônio parietal do GSCA com espessamento grave (+++) (setas finas) e reação inflamatória (ponta das setas largas)

No GSF pode-se observar que um dos 12 animais estava normal. Dos 11 animais com alteração na camada submesotelial do peritônio parietal, um animal apresentou um espessamento grave (+++), três animais apresentaram um espessamento moderado (++) e sete animais apresentaram um espessamento leve (+) (Figura 25 e 35) (Anexo 6).

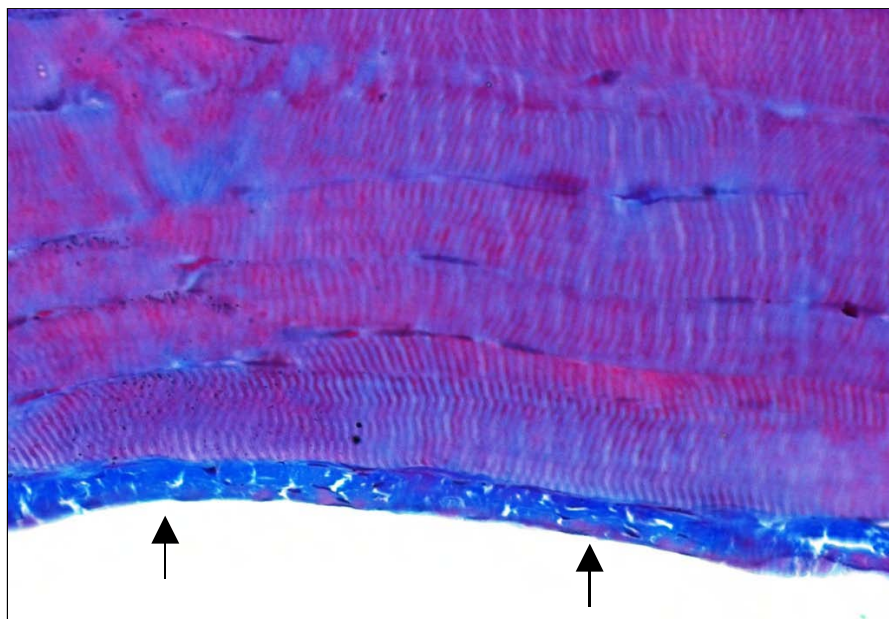


Figura 25. Peritônio parietal do GSF com espessamento grave (+++) (setas)

No GSFA, pode-se observar que nenhum animal estava normal. Dos 12 animais com alteração na camada submesotelial do peritônio parietal, quatro animais apresentaram um espessamento grave (+++), dois animais apresentaram um espessamento moderado (++) e seis animais apresentaram um espessamento leve (+) (Figura 26 e 35) (Anexo 7).

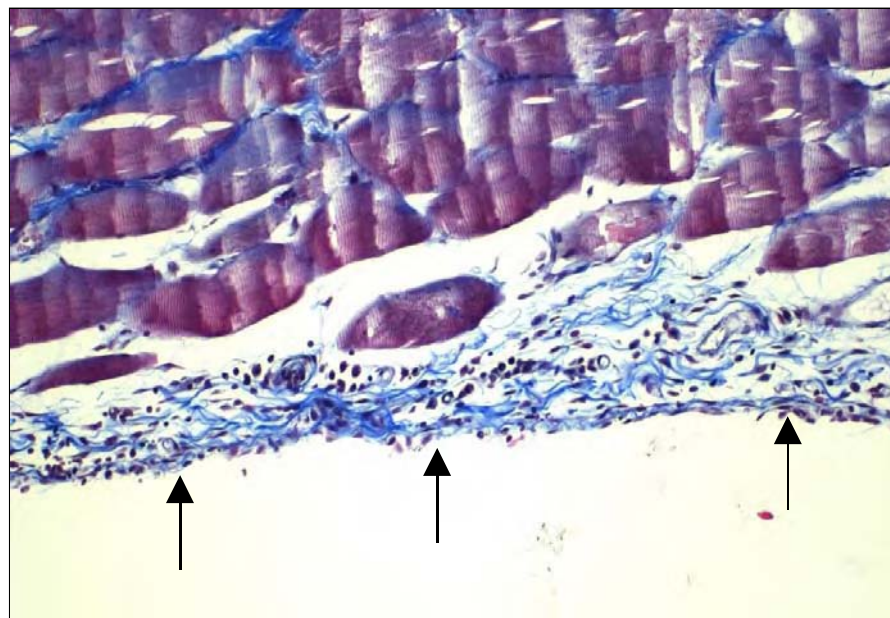


Figura 26. Peritônio parietal do GSCA com espessamento grave (+++) e reação inflamatória difusa (++) (setas)

5.3.3 Análise da reação inflamatória e fibrose

Estudando-se à reação inflamatória do peritônio no GC podemos observar que em três dos oito animais não foram visualizadas células inflamatórias. Esta reação inflamatória foi local com grau leve (+) em quatro animais e foi difusa com grau leve (+) em um animal. Como descrito na revisão da literatura uma das funções mais importantes do peritônio é de opor resistência às infecções, então, é de se esperar que uma pequena quantidade de células de defesa esteja presente neste tecido, por isso uma leve reação inflamatória é normal. Quando presente a reação inflamatória foi observada no peritônio visceral do baço em cinco animais. A presença de fibrose foi avaliada em todas as lâminas. No grupo GC nenhum animal apresentou fibrose (Figura 27 e 35) (Anexo 8).

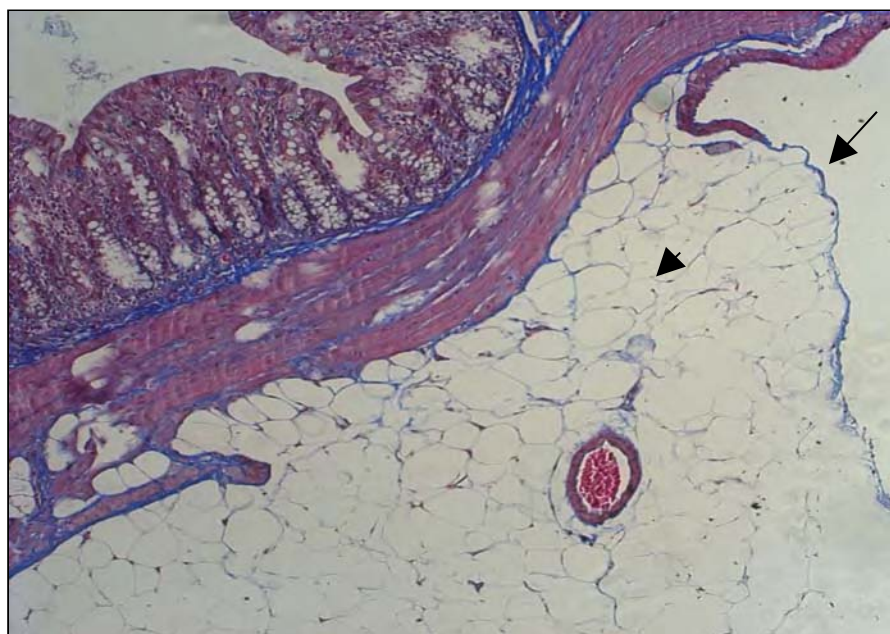


Figura 27. Peritônio visceral do intestino e omento no GC normal (setas)

No GSC pode-se observar que somente três dos 12 animais não apresentaram reação inflamatória. Esta reação inflamatória foi focal em seis e difusa em três; sendo que dos seis animais com reação focal, cinco apresentaram um grau leve (+) um com grau moderado (++), dos três animais com reação difusa, dois apresentaram de forma leve (+) e um animal de forma moderada (++). A reação inflamatória quando presente foi visualizada no peritônio visceral do baço (Figura 28). Na análise da fibrose três animais

apresentaram características de fibrose sendo dois animais com fibrose focal e um animal com fibrose difusa (Figura 29 e 35) (Anexo 9).

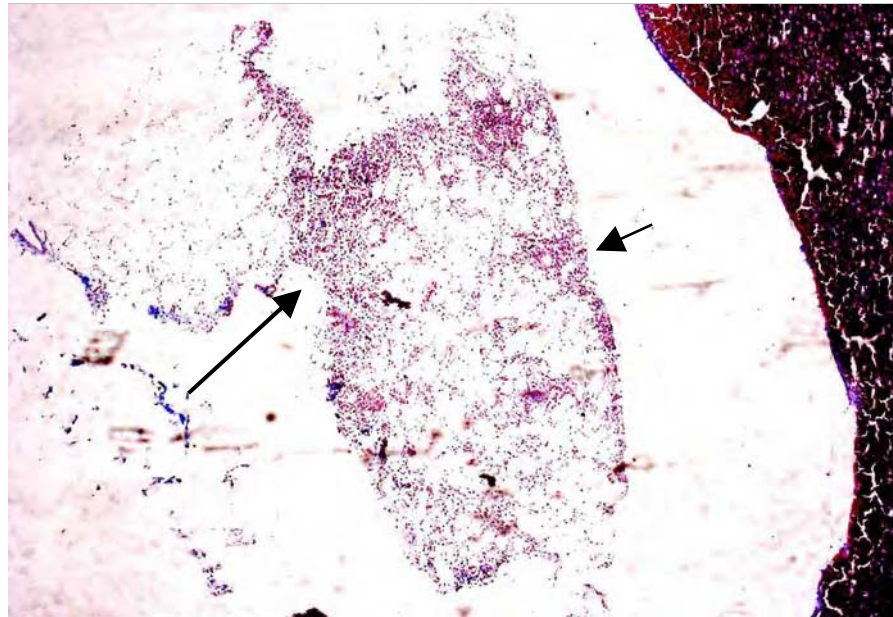


Figura 28. Peritônio visceral do baço do GSC com reação inflamatória local moderada (++) (setas)

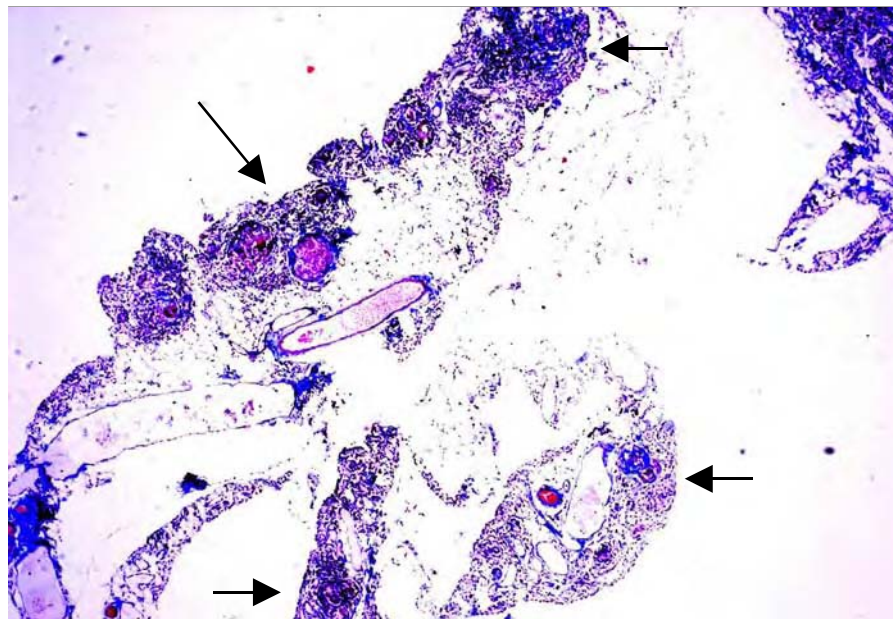


Figura 29. Peritônio visceral do baço no GSC com fibrose difusa (setas)

No GSCA, pode-se observar que somente três dos 12 animais não apresentaram reação inflamatória. Esta reação inflamatória foi focal em sete e difusa em dois; sendo que dos sete animais com reação focal, cinco apresentaram um grau leve (+) e dois com grau moderado (++) , dos dois

animais com reação difusa, um apresentou uma forma leve (+) e um animal apresentou a forma moderada (++). A reação inflamatória quando presente foi visualizada no peritônio visceral do baço, no intestino e no omento. Sete animais apresentaram características de fibrose sendo seis animais com fibrose focal e um animal com fibrose difusa (Figuras 30, 31, 32 e 35) (Anexo 10).

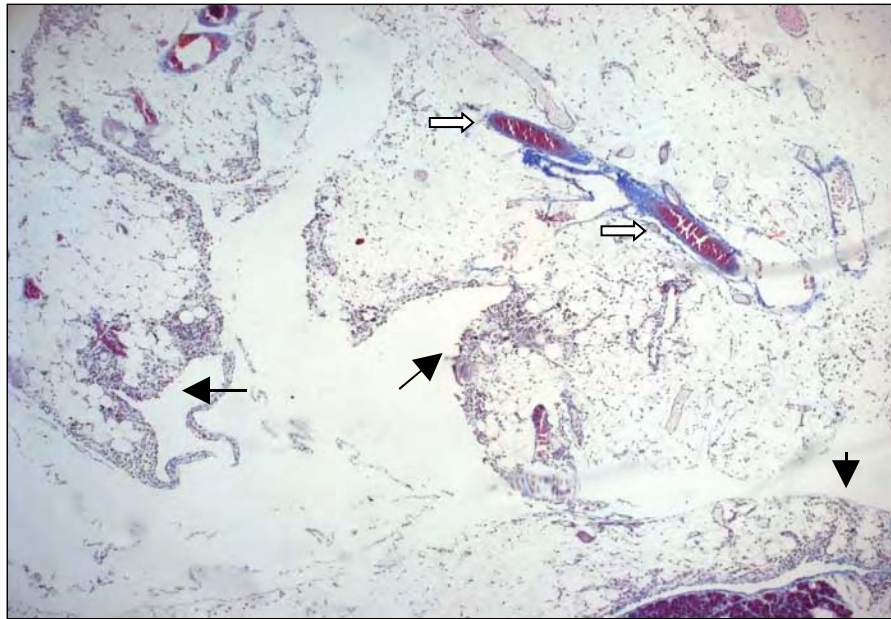


Figura 30. Peritônio visceral do baço do GSCA com reação inflamatória difusa (+) (setas) e fibrose focal (setas largas)

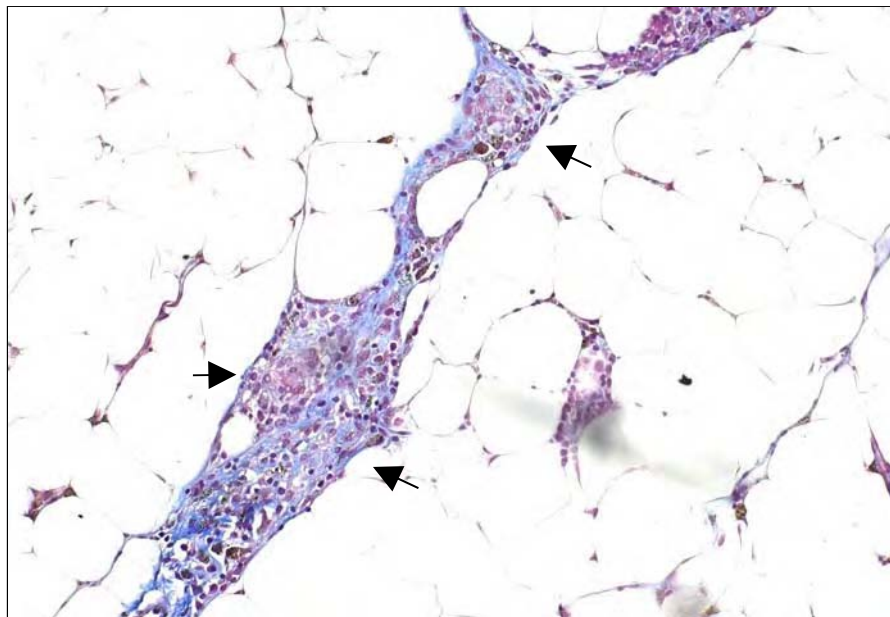


Figura 31. Peritônio visceral do intestino e omento do GSCA com fibrose focal (setas)

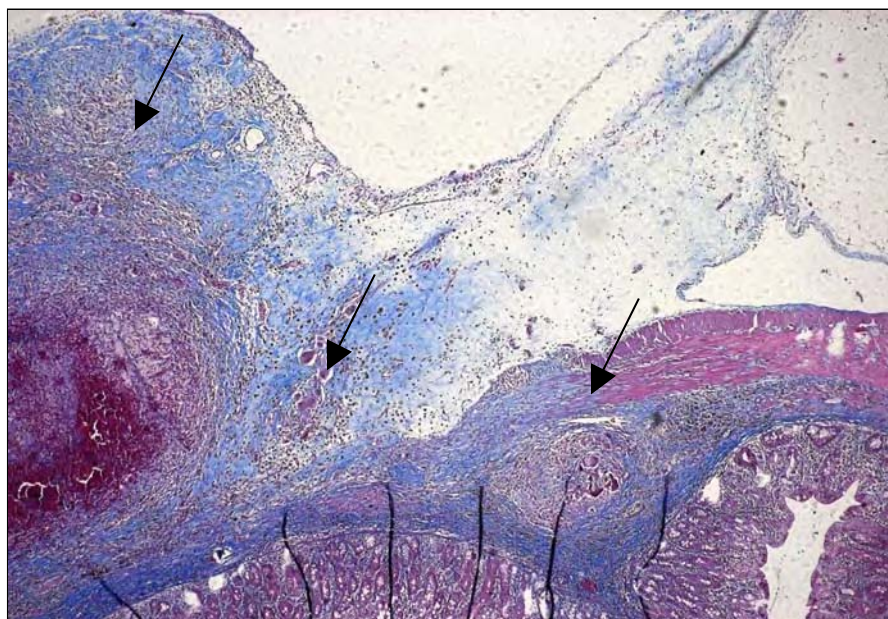


Figura 32. Peritônio visceral do GSCA do intestino e omento com fibrose difusa (setas)

No GSF, pode-se observar que quatro dos 12 animais não apresentaram reação inflamatória. Esta reação inflamatória foi focal em todos os oito animais. A reação inflamatória foi visualizada no peritônio visceral do baço e no peritônio visceral intestino e omento. Cinco animais apresentaram características de fibrose sendo todos os animais com fibrose focal (Figura 33 e 35) (Anexo 11).

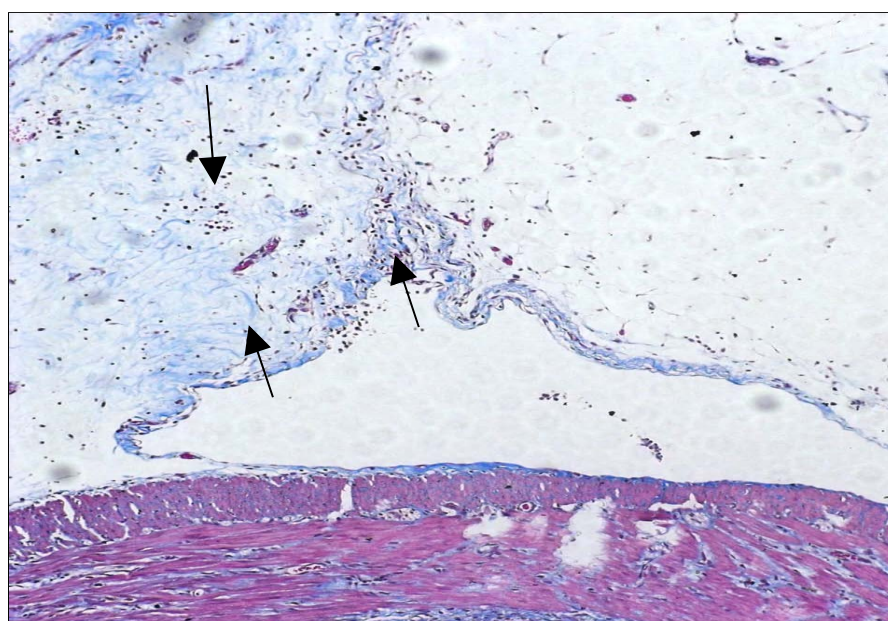


Figura 33. Peritônio visceral do intestino e omento do GSF com fibrose focal (setas)

No GSFA, pode-se observar que somente um dos 12 animais não apresentou reação inflamatória. Esta reação inflamatória foi focal com grau leve (+) em oito animais e difusa com grau moderado (++) em três animais. A reação inflamatória foi visualizada no peritônio visceral baço, no peritônio visceral do intestino e omento. Oito animais apresentaram características de fibrose sendo seis animais com fibrose focal e dois com fibrose difusa (Figura 34 e 35) (Anexo 12).

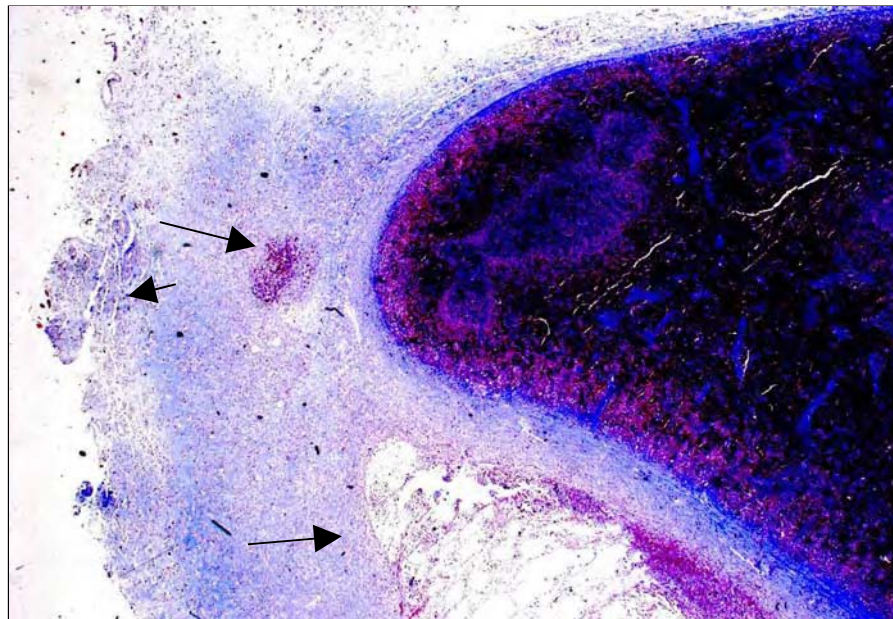


Figura 34. Peritônio visceral do baço do GSFA com fibrose difusa (++) (setas)

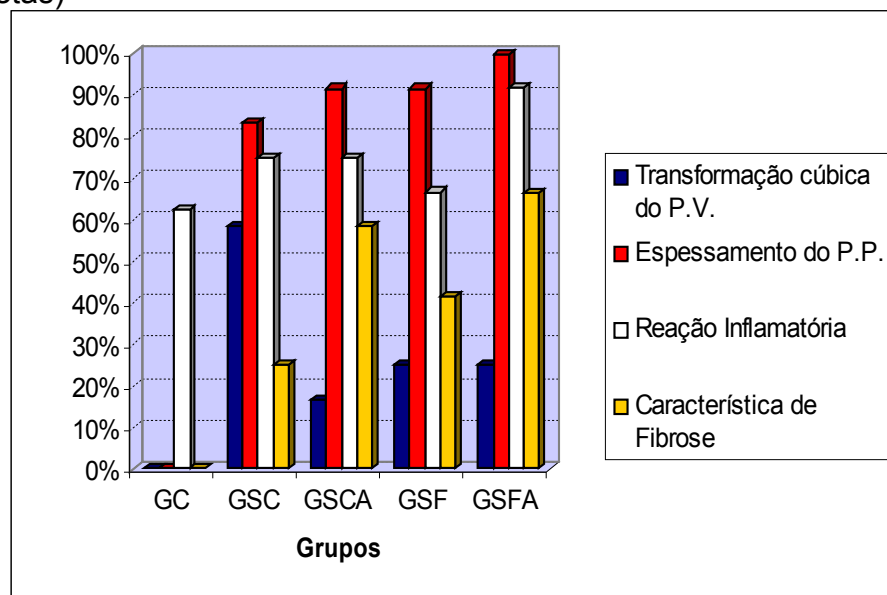


Figura 35. Gráfico com o resumo dos achados histomorfológicos em todos os grupos

5.4 Resultado dos pontos da análise histomorfológica

Utilizando a Tabela 1 do material e métodos para quantificar os achados da análise histomorfológica pode-se observar que os animais do GC apresentaram uma variação de zero a dois pontos na soma das análises (espessamento do peritônio parietal, transformação epitélio peritoneal do baço, reação inflamatória e fibrose) sendo considerados normais. Na soma das análises dos animais do GSC observamos uma variação de um a 14 pontos, sendo que cinco dos 12 animais apresentaram de um a dois pontos no total, considerados desta forma normais. No GSCA observamos uma variação de um a dez pontos, sendo que dois dos 12 animais apresentaram um ponto no total. No GSF observamos uma variação de um a oito pontos, sendo que cinco dos 12 animais apresentaram uma variação de um a dois pontos no total. No GSFA observamos uma variação de dois a 13 pontos, sendo que três dos 12 animais apresentaram dois pontos no total (Anexo 13).

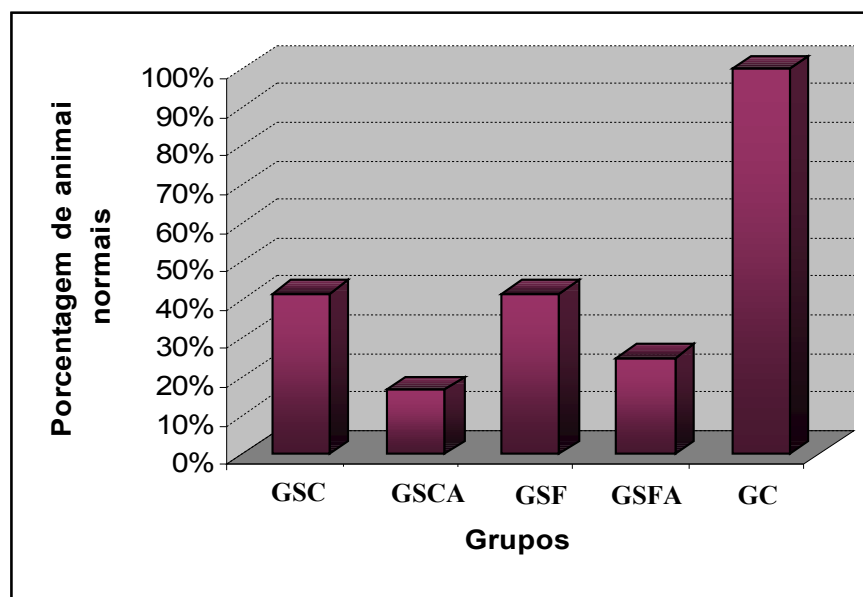


Figura 36. Porcentagem de animais normais na análise histomorfológica pelos pontos

Comparando-se os pontos da análise histomorfológica dos grupos estudados pode-se observar diferença altamente significativa ($p=0,0051$) (Tabela 2). Aplicando-se o teste para comparações múltiplas pode-se observar diferença significativa entre os animais do grupo GC com os animais dos grupos GSC, GSCA e GSFA (Tabela 5).

Tabela 5. Comparações múltiplas das médias dos pontos da análise histomorfológica em todos os grupos

(I) Grupo	(J) Grupos	Diferença de Média (I-J)
GC	GSC	-3,83*
	GSCA	-4,17*
	GSF	-3,08
	GSFA	-5,17*
GSC	GC	3,83*
	GSCA	-0,33
	GSF	0,75
	GSFA	-1,33
GSCA	GC	4,17*
	GSC	0,33
	GSF	1,08
	GSFA	-1,00
GSF	GC	3,08
	GSC	-0,75
	GSCA	-1,08
	GSFA	-2,08
GSFA	GC	5,17*
	GSC	1,33
	GSCA	1,00
	GSF	2,08

Grupo (I) comparado com todos os outros Grupos (J)

* Houve diferença significativa.

5.5 Resultado do exame microbiológico do lavado peritoneal

Dos 56 animais utilizados neste estudo apenas 10 animais (17,85%) apresentaram peritonite. Dos 10 animais que apresentaram peritonite, em nove animais (90%) foi causada por organismos Gram-negativos e em apenas um animal (10%) foi por organismo Gram-positivo (Figura 37) (Tabela 6).

Tabela 6. Resultado do exame microbiológico do lavado peritoneal de todos os animais

Animal	GSC	GSCA	GSF	GSFA	GC
1	<i>Escherichia coli</i>	Negativo	<i>Klebsiella sp.</i>	Negativo	Negativo
2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> + <i>Klebsiella sp</i>	<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>	<i>Klebsiella sp</i> + <i>Enterobacter sp</i>	*
4	Negativo	Negativo	<i>Escherichia coli</i> + <i>Enterobacter sp.</i>	<i>Escherichia coli</i> + <i>Enterobacter sp</i>	Negativo
5	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	Negativo	Negativo	Negativo
6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
10	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-
11	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-
12	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-

* Animal descartado

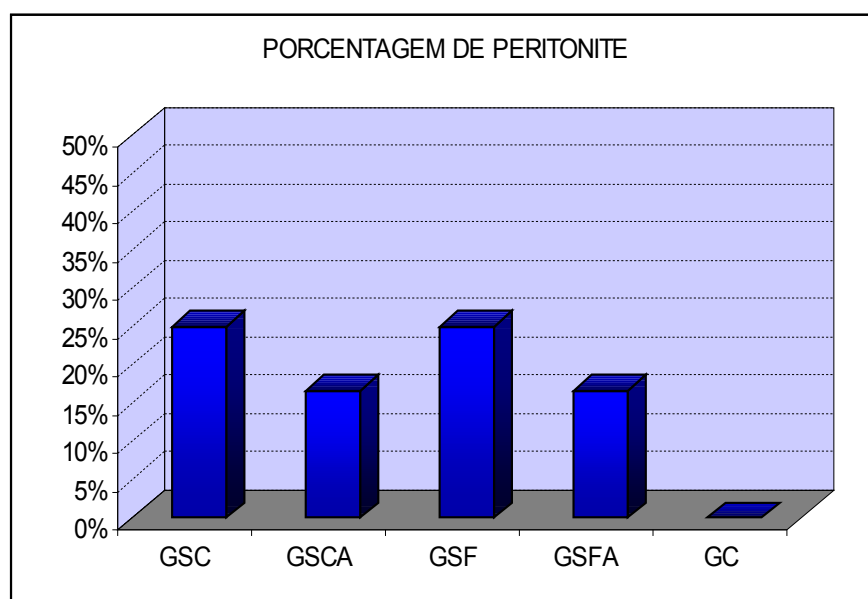


Figura 37. Porcentagem de animais com peritonite nos grupos

6. DISCUSSÃO

6.1 Discussão de métodos

A maioria dos pesquisadores tem usado ou o rato ou o coelho como modelos experimentais de DP, nós escolhemos os ratos, pois são: fáceis de manter em laboratório, econômicos, modelos estáveis de IRC (insuficiência renal crônica) (Zareie et al. 2004), são dóceis, brigam menos que os outros animais experimentais como os camundongos e podem ser mantidos em grupos do mesmo sexo. Uma desvantagem dos ratos é que eles são pequenos tornando a drenagem do dialisato difícil de recuperar (Lameiere et al. 1998). As linhagens de ratos mais utilizadas são o Wistar albino e o Sprague-Dawley albino, mas existem outras linhagens de ratos como o SHR (Spontaneously Hipertensive Rat), Lewis albino e o F344 albino; nós optamos trabalhar com a linhagem Wistar albino macho, pois é a linhagem de escolha do nosso laboratório para as pesquisas e os machos porque eles não sofrem alterações hormonais como as fêmeas.

Para realizar o procedimento de diálise o método de escolha foi a infusão de líquido intraperitoneal por punção diária sem anestesia. Segundo Peng et al. (2000), o método de IP pode ser o método de escolha tomando-se cuidado para não injetar o fluido no intestino ou dentro da parede abdominal. Segundo Musi et al. (2004) repetidas injeções com pequenos volumes IP diariamente em ratos, parecem representar uma boa técnica de investigação não-invasiva da biocompatibilidade dos fluidos de DP. A diferença mais importante entre modelo experimental e a diálise clínica são: ausência de uremia e o fato do volume instilado não ser drenado. No nosso trabalho esta desvantagem não se torna importante visto que não faremos nenhum acompanhamento da drenagem do líquido peritoneal nem das alterações causadas pela uremia.

Não existe um consenso sobre um período de exposição ótimo. Segundo Mortier et al. (2005) o tratamento de 12 semanas ou mais é necessário para obter alterações significantes sob as soluções testadas. Segundo Jonasson & Braide (1998) que compararam dois fluidos de DP [Gambrosol® (2,5% de glicose e pH 5,3) e o PD-BIO® (2,5% de glicose e pH 6,3)] com um grupo

controle em durações de DP e frequências de instilação diferentes, concluíram que infusões de fluidos de DP mais frequentes numa curta duração (instilação de três vezes por dia durante quatro a cinco dias) parecem ter causado mais alterações peritoneais do que após uma exposição mais longa e numa frequência menor (instilação uma vez por dia durante quatro semanas). No nosso trabalho a frequência de instilação (uma vez ao dia) e o tempo de diálise (quatro semanas) foram iguais em todos os grupos.

Já existem várias soluções de diálise peritoneal no mercado e outras sendo testadas experimentalmente. Os trabalhos experimentais que estudam a solução de diálise com glicose normalmente utilizam a solução de DP com 3,86% (Peng et al. 2000, Wieczowoska-Tobis et al. 2001, Mortier et al. 2004, Zareie et al., 2004, 2004b) ou 4,25% (Suzuki et al. 1995, Margetts et al. 2001, Wang et al. 2001, Kim et al. 2007) de glicose. Nós escolhemos a solução de DP Dianel® PD2 da Baxter Hospitalar com 4,25% de glicose por ser mais concentrada.

Além da solução de diálise com glicose a 4,25% nós utilizamos como base o grupo controle que não recebeu nenhum líquido peritoneal e a solução de NaCl 0,9% chamada de solução “salina fisiológica”, que é amplamente utilizada em vários procedimentos médicos como: lavagem de cavidades corpóreas, limpeza de feridas externas (Brebrowicz & Oreopoulos 2005) e em outros trabalhos experimentais de DP em ratos (Hekking et al. 1998, Duman et al. 2000, Styszynski et al. 2002, Zhuo et al. 2005).

Não existe um consenso sobre qual porção do peritônio (parietal ou visceral) deveria ser usado em estudos sobre a morfologia. Análises de biópsias pareadas em humanos de peritônio parietal e visceral sugerem que as alterações na membrana visceral são menos pronunciadas que as do peritônio parietal (Williams et al. 2003). O inverso foi observado em alguns estudos animais (De Vriese et al. 2002, Martin-Martinez et al. 2004). Outros grupos demonstraram que diferentes tecidos peritoneais (peritônio visceral, peritônio parietal e omento) podem responder diferentemente a exposição dos fluidos de DP (Hekking et al. 2001, Zareie et al. 2003). Erros podem ser introduzidos quando as amostras são colhidas de lugares diferentes do peritônio (Mortier et al. 2005). Diante destas dúvidas nós decidimos trabalhar tanto com o peritônio

parietal quanto com o visceral e tomamos muito cuidado para colher as amostras sempre dos mesmos lugares em todos os animais. A diferença que nós percebemos quando trabalhamos com tecidos peritoneais diferentes é que a avaliação do peritônio deve ser diferenciada. Nas amostras de peritônio visceral do baço a transformação cúbica das células mesoteliais fica mais evidente do que nas amostras do peritônio parietal, da mesma forma que a avaliação de espessamento do peritônio no peritônio parietal é mais evidente que nas outras amostras. Já o peritônio visceral do intestino e omento quase não ajudaram muito na avaliação histomorfológica.

Independente da escolha do modelo animal um dos problemas para estudar a estrutura da membrana peritoneal é a colheita da amostra. O tecido peritoneal seca rapidamente quando exposto ao ar. Para prevenir as alterações devido a artefatos, a amostra peritoneal normalmente é fixada tão logo a cavidade peritoneal é aberta. Na experiência de Garosi & Di Paolo (2001) a fixação *in vivo* é a melhor maneira de proteger as amostras colhidas. Quando o coelho era sacrificado para a colheita de material, solução de glutaraldeído tamponada a 2% com 0,2 M de cacodilato sódico era infundida simultaneamente na veia periférica (normalmente 20 ml por coelho) e dentro da cavidade abdominal via cateter peritoneal (30 ml/Kg por coelho). O animal morre imediatamente e a cavidade peritoneal toda e os tecidos adjacentes são fixados antes da dissecação cirúrgica e a exposição ao ar. No nosso trabalho, nós modificamos a técnica porque não trabalhamos com coelho e também não iríamos realizar análise na microscopia eletrônica, deste modo, substituímos a solução fixadora proposta por Di Paolo & Garosi por formol tamponado. Os ratos anestesiados morreram imediatamente após a infusão do formol, que foi deixado agir na cavidade peritoneal por mais ou menos 20 minutos, para que, ao abrir a cavidade peritoneal para realizar a colheita das amostras, o peritônio já estivesse em processo de fixação não sofrendo alterações pela exposição ao ar.

A ausência de profilaxia para infecções permitiu a avaliação de peritonites neste modelo de diálise. Não existe um consenso sobre como deve ser feito o exame para avaliação de peritonite nos trabalhos experimentais com ratos e quase não há estudos que pesquisam o agente microbiológico causador da

peritonite em ratos como há em humanos. Wieczorowska-Tobis et al. (2004) em um modelo experimental utilizando ratos e inserindo o cateter peritoneal para realizar a diálise, diagnosticava peritonite analisando a turbidez do efluente peritoneal e a contagem total de células do dialisato ≥ 4500 células/ μL e com uma fração de neutrófilos $>35\%$. De Vriese et al. (2002) e Mortier et al. (2004), também em trabalhos experimentais com ratos, colhiam amostras de dialisato pelo cateter de diálise para cultura e contagem de CSB. Nestes trabalhos a infecção era arbitrariamente definida pela cultura positiva bem como a contagem das CSB ser maior que $1000/\text{mm}^3$.

6.2 Discussão de resultados

Quando avaliamos o peso final não imaginávamos que ocorreria diferença estatística entre os grupos e nenhum trabalho pesquisado comenta nada sobre alteração do peso entre grupos dialisados e grupos controle. No trabalho de Zareie et al. (2003) comparando grupos de ratos em diálise com tampão de lactato, solução de diálise esterilizada aquecida, solução de diálise esterilizada por filtração e ratos não tratados, eles não encontraram diferença estatística entre a média de pesos.

No nosso trabalho, observamos uma diferença significativa entre a média do número de mastócitos do mesentério entre os grupos. Quando comparamos os grupos entre si, observamos uma diferença significativa entre o GC com os animais do grupo GSC e GSFA, nos outros dois grupos (GSCA e GSF) não chegaram a mostrar diferença estatística para o grupo controle, mas a média de mastócitos foi numericamente maior. Em trabalhos utilizando pacientes humanos, Jiménez-Heffernan et al. (2006) quantificaram a quantidade de mastócitos no peritônio parietal de quatro grupos de pacientes humanos: normais, pacientes urêmicos que nunca fizeram DP, pacientes em DP e pacientes não-renais com hérnia inguinal. Eles observaram que os mastócitos estavam significativamente diminuídos no peritônio dos pacientes em DP quando comparados com os outros grupos. Já Zareie et al. (2001) trabalhando com fluido de DP com 3,86% de glicose em ratos, observaram um dramático acúmulo de mastócitos no omento de ratos que receberam DP comparados

com os animais do grupo controle que não foram tratados. Em um outro trabalho mais recente Zareie et al. (2005) comparando fluido padrão de DP com 3,86% de glicose (Dianel PD4®) com fluido de DP com aminoácidos (Nutrinal PD4®) e um grupo controle em ratos, observaram que o número de mastócitos do omento estava significativamente aumentado nos grupos tratados com diálise quando comparados com o grupo controle. Quando os grupos tratados com diálise foram comparados entre si, não apresentaram diferença significativa. Os achados dos trabalhos de Zareie et al. (2001 e 2006) são semelhantes aos nossos, apesar das amostras de peritônio utilizadas e soluções de DP serem diferentes, eles também observaram aumento do número de mastócitos dos ratos expostos a DP. Já no trabalho com pacientes humanos, parece que os mastócitos atuam de forma diferente, pois observaram o inverso, houve diminuição do número de mastócitos no peritônio dos pacientes de DP.

Fazendo uma análise subjetiva dos dados do exame morfológico podemos observar que: no GSC o peritônio visceral do baço estava com transformação cúbica das células mesoteliais mais evidentes do que os outros grupos; o espessamento do peritônio parietal encontrava-se alterado em todos os grupos quando comparado com o controle, sugerindo que o peritônio parietal seja um tecido mais sensível sendo altamente responsivo a ambas as soluções adicionadas na cavidade peritoneal; a reação inflamatória não apresentou muita diferença entre o controle e os outros grupos, exceto no grupo GSFA e a presença de fibrose estava presente em um maior número de animais nos grupos GSCA e GSFA sugerindo que a infusão abdominal de soluções aquecidas predispõe às alterações mais graves no peritônio. Diante disto podemos perceber que o peritônio reage de forma diferente a uma agressão dependendo da sua localização, o que torna sua avaliação muito difícil, principalmente para comparação de dados, como mencionado na discussão de métodos. Este dado também foi observado no trabalho de Musi et al. (2004) trabalhando com amostras do peritônio diafragmático, intestinal e fígado; com várias soluções de diálise em ratos. Também neste trabalho eles observaram que a fração de células mesoteliais com transformação cúbica no peritônio diafragmático estava aumentada no grupo que recebeu solução de

diálise comercial com 4% de glicose (Gambrosol®) quando comparado com os outros grupos.

Outro dado que merece a atenção neste trabalho é a comprovação de que a solução de NaCl 0,9% foi tão agressiva ao peritônio quanto à solução de diálise com glicose. Realizando uma revisão mais profunda encontramos trabalhos questionando o papel da solução de NaCl 0,9% em outros procedimentos médicos como a diálise. Phillips & Dudley (1984) em experimento com lavagem da cavidade abdominal em modelos animais com NaCl 0,9% em temperatura ambiente, observaram mais adesões quando comparados com aqueles animais em que não foi feita nenhuma lavagem. Mais tarde, Kappas et al. (1988), perceberam que a lavagem abdominal com solução salina em temperatura normal (que é mais baixa que a corporal) em ratos não aumentou a formação de adesões peritoneais, só que, esta mesma solução aquecida (ao redor dos 40°C) o número e a intensidade de adesões peritoneais foram maiores, esta relação do aquecimento foi percebida durante a avaliação morfológica da presença de fibrose como visto no parágrafo anterior. Styszynski et al. (2002), demonstraram que a solução de NaCl 0,9% causou uma reação inflamatória severa quando administrada IP, duas vezes ao dia durante quatro semanas. Os ratos que receberam só a solução de NaCl 0,9% a contagem de células do dialisante, a permeabilidade às proteínas e a concentração de óxido nítrico permaneceram altas durante as quatro semanas do experimento enquanto que o outro grupo que recebeu a solução salina suplementada com glicose apresentou uma baixa concentração dos fatores mencionados anteriormente. No nosso experimento podemos perceber que a solução salina fisiológica aquecida (GSFA) alterou o peritônio tanto quanto a solução de glicose aquecida (GSCA) quanto a glicose (GSC) em temperatura ambiente. A solução salina fisiológica em temperatura ambiente também alterou o peritônio só que estatisticamente não foi percebido. Segundo Wang et al. (1999) e Breborowicz et al. (2005), a solução salina fisiológica não é biocompatível como solução de diálise peritoneal e não deveria ser usada como solução controle ou lavagem de cavidades.

Nesta pesquisa a maioria dos patógenos causadores de peritonite foram organismos Gram-negativos como: *E. coli*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp*, e em

apenas um animal encontramos os *Staphylococcus* coagulase-negativo. Segundo Choi et al. (2006) o patógeno *Brevundimonas vesicularis* foi o microorganismo mais freqüente de infecção em DP em ratos. Outros patógenos que causaram infecções incluem os *Staphylococcus* coagulase-negativo, *S. aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus/Staphylococcus* e *Pseudomonas spinosa*. Já no trabalho de Mortier et al. (2003) os agentes causadores de infecção em ratos foram os *Staphylococcus* coagulase–negativo, *S. aureus*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli* e *Streptococcus viridans*. A técnica de diálise usada com punção intraperitoneal poderia explicar a distribuição microbiológica com predominância de Gram-negativos no efluente peritoneal estudado. Todavia, a ocorrência de peritonite sem ter sido realizada a antibioticoterapia profilática não é uma ocorrência que inviabiliza a técnica, desde que realizada com cuidado.

7. CONCLUSÃO

Um modelo experimental de diálise peritoneal utilizando o rato foi introduzido nas pesquisas desta instituição.

A concentração de glicose e a temperatura alteraram a histomorfologia do peritônio. Na contagem dos mastócitos os grupos GSC e GSFA apresentaram diferença estatística com o GC, ou seja, a concentração de glicose e a temperatura alteraram a contagem de mastócitos só que não ao mesmo tempo como aconteceu na análise histomorfológica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIGELOW, P.; OREOPOULOS, D.G.; DE VEBER, G.A. The use of the Dean's prothesis in patients on chronic peritoneal dialysis. *Can. Med. Assoc. J.*, v.109, n. 17, p.999-1001, 1973.

BLANK, I.H.; ARNOLD, W. The inhibition of growth of *Bacillus subtilis* by ultra-violet irradiated carbohydrates. *J. Bacteriol*, v.30, n.5, p.507-511, 1935.

BREBOROWICZ, A.; OREOPOULUS, D.G. Is normal saline harmful to the peritoneum. *Perit. Dial. Int.*, v.25, suppl.4, p.S67-70, 2005.

CARAMORI, J.C.T. *Peritonites em pacientes tratados com diálise peritoneal ambulatorial contínua: estudo clínico e microbiológico*. 1999. 132f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CHOI, J.; CREDIT, K.; HENDERSON, K.; DEVERKADRA, R.; VANPELT, H.M.; HE, Z.; FLESSNER, M.F. Antibiotic prophylaxis in an animal model of chronic peritoneal exposure. *Perit. Dial. Int.*, v.26, n.2, p.249-258, 2006.

COLES, G.A. Renal dialysis. *BMJ*, v.309, n.6952, p.489, 1994.

DAUGIRDAS, J.T.; BLAKE, P.G.; ING, T.S. *Manual de diálise*. 3 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2003. 714p.

DE VRIESE, A.S.; MORTIER, S.; CORNELISSEN, M.; PALMANS, E.; VANACKER, N.J.; LEYSSENS, A.; FAICT, D.; DE RIDDER, L.; LAMEIRE, N.H. The effects of heparin administration in an animal model model of chronic peritoneal dialysate exposure. *Perit. Dial. Int.*, v.72, n.5, p.566-572, 2002.

DI PAOLO, N.; GAROSI, G.; PETRINI, G.; TRAVERSARI, L.; ROSSI, P. Peritoneal dialysis solution biocompatibility testing in animals. *Perit. Dial. Int.*, v.15, suppl.7, p.S61-69, 1995.

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.

DOBBIE, J.W.; ANDERSON, J.D.; HIND, C. Long-term effects of peritoneal dialysis on peritoneal morphology. *Perit. Dial. Int.*, v.14, suppl.3, p.S16-20, 1994.

DUMAN, S.; GÜNAL, A.I.; SEN, S.; ASÇI, G.; ÖZKAHYA, M.; TERZIOGLU, E.; AKÇIÇEK, F.; ATABAY, G. Does enalapril prevent peritoneal fibrosis induced by hypertonic (3.86 %) peritoneal dialysis solution?, *Perit. Dial. Int.*, v.21, n.2, p.219-224, 2000.

DUMAN, S.; WIECZOROSKA-TOBIS, K.; STYSZYNSKI, A.; KWIATKOWSKA, B.; BREBOROWICZ, A.; OREOPOULOS, D.G. Intraperitoneal enalapril ameliorates morphologic changes induced by hypertonic peritoneal dialysis solutions in rat peritoneum. *Adv. Perit. Dial.*, v.20, p.31-36, 2004.

DUWE, A.K.; VAS, S.I.; WEATHERHEAD, J.W. Effects of the composition of peritoneal dialysis fluid on chemiluminescence, phagocytosis, and bactericidal activity in vitro. *Infect. Immun.*, v.33, n.1, p.130-135, 1981.

DZYBAN, L.A.; LABATO, M.A.; ROSS, L.A. CVT update: Peritoneal Dialysis. In: Kirk R.W. *Current Veterinary Therapy XIII: Small Animal Practice*. 1 ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000. p.859-861.

FEATHER, S.M.; HARRIS, J.F. Dehydration reaction of carbohydrates. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, v.28, p.161-237, 1973.

GANTER, G. On the elimination of toxic substances from the blood by dialysis. *Munch. Med. Wochenschr.*, v. 50, n.2, p. 1478–1480, 1923.

GARDNER, E. Visceras abdominais e peritoneu. In: Gray, D.J.; Rahilly, R.O. *Anatomia: Estudo Regional do Corpo Humano*. 4 ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1988. chap. 34, p.357- 366.

GAROSI, G.; DI PAOLO, N. Peritoneal sclerosis: One or two nosological entities? *Sem. Dial.*, v.13, n.5, p.297-308, 2000.

GAROSI, G.; DI PAOLO, N. The rabbit model in evaluating the biocompatibility in peritoneal dialysis. *Nephrol. Dial. Transp.*, v.16, n.3, p.664-665, 2001.

GOKAL, R. Peritoneal dialysis: Prevention and control of infection. *Drug Ag.*, v.17, n.4, p. 269-282, 2000.

HEKKING, L.H.P.; ZAREIE, M.; DRIESPRONG, B.A.; FAICT, D.; WELTEN, A.G.A.; GREEUW, de I.; SCHADEE-EESTERMANS, I.L.; HAVENITH, C.E.G.; VAN DE BORN, J.; WEE, P.M.T.; BEELEN, R.H.J. Better preservation of peritoneal morphologic features and defense in rats after long-term exposure to a bicarbonate/lactate-buffered solution. *J. Am. Soc. Nephrol.*, v.12, n.12, p.2775-2786, 2001.

JIMÉNEZ-HEFFERNAN, J.A.; BAJO, M.; PERNA, C.; DEL PESO, G.; LARRUBIA, J.R.; GAMALLO, C.; SÁNCHEZ-TOMERO, J.A.; LÓPEZ-CABRERA, M.; SELGAS, R. Mast cell quantification in normal peritoneum and during peritoneal dialysis treatment. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v. 130, n.8, p.1188-1192, 2006.

JONASSON, P; BRAIDE, M. A commercially available PD fluid with pH and low GPD induces different morphological changes of rat peritoneum in intermittent PD. *Adv. Perit. Dial.*, v.14, p.48-53, 1998.

JORRES, A.; BENDER, T.O.; FINN, A.; WITOWSKI, J.; FRÖHLICH, S.; GAHL, G.M.; FREI, U.; KECK, H.; DEETJEN-PASSLICK, J. Biocompatibility and buffers: effect of bicarbonate-buffered peritoneal dialysis fluids on peritoneal cell function. *Kidney Int.*, v.54, n.6, p.2184-2193, 1998.

KAPPAS, A.M.; FATOUROS, M.; PAPADIMITRIOU, K.; KATSOUYANNOPOULOS, V.; CASSIOUMIS, D. Effect of intraperitoneal saline irrigation at different temperatures on adhesion formation. *Br. J. Surg.*, v. 75, n.9, p.854-856, 1988.

KIM, C.D.; KWON, H.; PARK, S.; OH, E.; KIM, M.; CHOI, S.; CHOI, M.; KIM, I.; PARK, M.; KIM, Y.; KIM, Y. Effects of low glucose degradation products peritoneal dialysis fluid on the peritoneal fibrosis and vascularization in a chronic rat model. *Ther. Aph. Dial.*, v.11, n.1, p.56-64, 2007.

LAMEIRE, N.; BIESEN, W.V.; LANDSCHOOT, M.V.; WANG, T.; HEIMBÜRGER, O.; BERGSTRÖM, J.; LINDHOLM, B.; HEKKING, L.P.H.; HAVENITH, C.E.G.; BEELEN, R.H.J.. Experimental models in peritoneal dialysis: A European experience. *Kidney Int.*, v.54, n.6, p.2194-2206, 1998.

MARGETTS, P.T.; KOLB, M.; YU, L.; HOFF, C.M.; GAULDIE, J. A chronic inflammatory infusion model of peritoneal dialysis in rats. *Perit. Dial. Int.*, v.21, suppl.3, p.S368-372, 2001.

MARTIN-MARTINEZ, M.D., STOENOIU, M., VERKAEREN, C., DEVUYST, O., DELPORTE, C. Recombinant adenovirus administration in rat peritoneum: endothelial expression and safety concerns. *Nephrol. Dial. Transp.*, v.19, n.5, p.1293-1297, 2004.

MORTIER, S.; DE VRIESE, A.S.; LEYSSENS, A.; VANACKER, N.J.; FAICT, D.; CORNELISSEN, M.; DE RIDDER, L.; LAMEIRE, N.H. Antibiotic administration in an animal model of chronic peritoneal dialysate exposure. *Perit. Dial. Int.*, v.23, n.4, p.331-338, 2003.

MORTIER, S.; FAICT, D.; SCHALKWIJK, C.G.; LAMEIRE, N.H.; DE VRIESE, A.S. Long-term exposure to new peritoneal solutions: Effects on the peritoneal membrane. *Kidney Int.*, v.66, n.3, p.1257-1265, 2004.

MORTIER, S.; LAMEIRE, N.H.; VRIESE, A.S. Animal models in peritoneal dialysis research: A need for consensus. *Perit. Dial. Int.*, v.25, n.1, p.16-24, 2005.

MUSI, B.; BRAIDE, M.; CARLSSON, O.; WIESLANDER, A.; ALBREKTSSON, A.; KETTELER, M.; WESTENFELD, R.; FLOEGE, J.; RIPPE, B. Biocompatibility of peritoneal dialysis fluids: long-term exposure of nonuremic rats. *Perit. Dial. Int.*, v.24, n.1, p.37-47, 2004.

OREOPOULOS, D.G. Chronic peritoneal dialysis. *Clin. Nephrol.*, v.9, n.4, p.165-173, 1978a.

OREOPOULOS, D.G. Renewed interest in chronic peritoneal dialysis. *Kidney Int.*, v.13, suppl.8, p.S117-119, 1978b.

PENG, W.X.; GUO, Q.; LIU, S.; LIU, C.; LINDHOLM, B.; WANG, T. Comparison of three chronic dialysis models. *Adv. Perit. Dial.*, v.16, p.51-54, 2000.

PHILLIPS, G.O.; MOODY, G.J.; MATTOK, G.L. Radiation chemistry of carbohydrates. Part 1. Action of ionizing radiation on aqueous solutions of D-glucose. *J. Chem. Soc.*, v.52, p.3522-3534, 1958.

PHILLIPS, R.K.; DUDLEY, H.A. The effect of tetracycline lavage and trauma on visceral and parietal peritoneal ultrastructure and adhesion formation. *Br.J. Surg.*, v.71, n.7, p.537-539, 1984.

PUTNAM, T.J. The living peritoneum as a dialysing membrane. *Am. J. Physiol.*, v.63, n.3, p.548-565, 1923.

ROUX, P.A. De l'action de la lumière et de L'air. *Ann. Inst. Pasteur*, v.1, p.445-452, 1887.

RUBIN, J.; Jones, Q.; Quillen, E.; Bower, J.D. A model of long-term peritoneal dialysis in the dog. *Nephron*, v.35, n.4, p.259-263, 1983.

SCHALKWIJK, C.G.; POSTHUMA, N.; TEN BRINK, H.J.; TER WEE, P.M.; TERLINK, T. Induction of 1,2-dicarbonyl compounds, intermediates in the formation of advances glycation end-products, during heat-sterilization of glucose-based peritoneal fluids. *Perit. Dial. Int.*, v.19, n.4, p.325-333, 1999.

STYSZYNSKI, A.; PODKOWKA, R.; WIECZOROWSKA-TOBIS, K.; KWIATKOWSKA, B.; KSIAZEK, K.; BREBOROWICZ, A.; OREOPOULOS, D.G. Glucose suppresses peritoneal inflammatory reactions and mesothelial hyperplasia caused by intraperitoneal saline infusion. *Adv. Perit. Dial.*, v.18, p. 21-25, 2002.

STYSZYNSKI, A.; KWIATKOWSKA, B.; WIECZOROWSKA-TOBIS, K.; BREBOROWICZ, A.; OREOPOULOS, D.G.. Glucose and Mannitol have different effects on peritoneal morphology in chronically dialyzed rats. *Adv. Perit. Dial.*, v.19, p. 15-19, 2003.

SUZUKI, K.; KHANNA, R.; NOLPH, K.D.; TWARDOWSKI, ZJ.; MORE, H.L. Expected white blood cell counts and differentials in a rat model of peritoneal dialysis. *Perit. Dial. Int.*, v.15, n.2, p.142-146, 1995.

TESCHNER, N.; HEIDLAND, A.; KLASSEN, A.; SEBEKOVA, K.; BAHNER, U. Georg Ganter – a pioneer of peritoneal dialysis and his tragic academic demise at the hand of the Nazi regime. *J. Nephrol.*, v.17, n.3, p. 457-460, 2004.

THORNHILL, J.A.; RIVIERE J.E. Peritonitis associated with peritoneal dialysis: diagnosis and treatment. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.182, n.7, p. 721-724, 1983.

WAART, D.R.; ZWEERS, M.M.; STRUIJK, D.G.; KREDIET, R.T. Icodextrin degradation products in spent dialysate of CAPD patients and the rat, and its relation with dialysate osmolality. *Perit. Dial. Int.*, v.21, n.3, p.269-274, 2001.

WANG, T.; HEIMBURGER, O.; QURESHI, A.R.; WANIEWSKI, J.; BERGSTROM, J.; LINDHOLM, B. Physiological saline is not a biocompatible peritoneal dialysis solution. *Int. J. Artif. Organs*, v. 22, n.2, p.88-93, 1999.

WANG, T.; CHENG, H.; LIU, S.; WANG, Y.; WU, J.; PENG, W.; ZHONG, J.; LINDHOLM, B. Increased peritoneal membrane permeability is associated with abnormal peritoneal surface layer. *Perit. Dial. Int.*, v.21, suppl.3, p.S345-348, 2001.

WESTON, R.E.; ROBERTS, M. Clinical use of stylet-catheter for peritoneal dialysis. *Arch. Intern. Med.*, v.115, n.6, p.659-662, 1965.

WIECZOROWSKA-TOBIS, K.; BRELINSKA, R.; BREBOROWICZ, A.; OREOPOULOS, D.G. Morphologic aspects of chronic peritoneal dialysis in a rat model. *Perit. Dial. Int.*, v.21, suppl.3, p.S342-344, 2001.

WIESLANDER, A.P.; KJELLSTRAND, T.T.; RIPPEL, B. Heat sterilization of glucose containing fluids for peritoneal dialysis: biological consequences of chemical alterations. *Perit. Dial. Int.*, v.15, suppl.7, p.S52-59, 1995.

WILLIAMS, J.D. Biocompatibility in peritoneal dialysis: Definitions and mechanisms. *Perit. Dial. Int.*, v.15, suppl.7, p.S5-8, 1995.

WILLIAMS, J.D., CRAIG, K.J.; RUHLAND, C.V.; TOPLEY, N.; WILLIAMS, G.T. The natural course of peritoneal membrane biology during peritoneal dialysis. *Kidney Int.*, v.88, suppl.88, p.S43-49, 2003.

WU, G. Osmotic agents for peritoneal dialysis solutions. *Perit. Dial. Int.*, v.2, n.4, p.151-154, 1982.

ZAREIE, M.; HEKKING, L.H.P.; DRIESPRONG, B.A.J.; TER WEE, P.M.; BEELEN, R.H.J.; VAN DEN BORN, J. Accumulation of omental mast cells during peritoneal dialysis. *Perit. Dial. Int.*, v.21, suppl.3, p.S373-376, 2001.

ZAREIE, M.; HEKKING, L.H.P.; WELTEN, A.G.A.; DRIESPRONG, B.A.J.; SCHADEE-EESTERMANS, I.L.; FAICT, D.; LEYSSENS, A.; SCHALKWIJK, C.G.; BEELEN, R.H.J.; TER WEE, P.M.; VAN DEN BORN, J. Contribution of lactate buffer, glucose and glucose degradation products to peritoneal injury *in vivo*. *Nephrol. Dial. Transp.*, v.18, n.12, p.2629-2637, 2003.

ZAREIE, M.; KEUNING, E.D.; TER WEE, P.M.; BEELEN, R.H.J.; VAN DEN BORN, J. Improvement of a chronic rat model for peritoneal dialysis by using heparin-coated catheters. *Adv. Perit. Dial.*, v.20, p.150-154, 2004.

ZAREIE, M.; KEUNING, E.D.; TER WEE, P.M.; BEELEN, R.H.J.; VAN DEN BORN, J. Peritoneal dialysis fluid-induced changes of the peritoneal membrane are reversible after peritoneal rest in rats. *Nephrol. Dial. Transp.*, v.20, n.1, p.189-193, 2004b.

ZAREIE, M.; VAN LAMBALGEN, A.A.; TER WEE, P.M.; HEKKING, L.H.P.; KEUNING, E.D.; SCHADEE-EESTERMANS, I.L.; FAICT, D.; DEGRÉVE, B.; TANGELDER, G.; BEELEN, R.H.J.; VAN DEN BORN, J. Better preservation of the peritoneum in rats exposed to amino acid-based peritoneal dialysis fluid. *Perit. Dial. Int.*, v.25, n.1, p.58-67, 2005.

ZHUO, L.; LIU, F.Y.; PENG, Y.M.; LIU, Y.H.; LIU, H.; ZHUO, L.H.; XU, X.Q.; JIANG, J.H. Comparison of several different peritoneal fibrosis rat models. *Zhon Nan Da Xue Bao Yi Xue Ban*, v.30, n.2, p.162-166, 2005.

9. *ANEXOS*



Anexo 1. Peso inicial e final dos animais em todos os grupos

Peso Inicial	GRUPOS				
Animal	GSC	GSCA	GSF	GSFA	GC
1	296	278	266	242	189
2	259	275	259	264	230
3	260	255	234	265	217
4	254	255	278	264	170
5	299	251	262	234	217
6	290	245	291	254	176
7	253	226	234	305	250
8	269	295	282	232	303
9	280	272	237	243	232
10	273	281	252	296	-
11	272	237	245	231	-
12	264	270	279	276	-
Média	272,4	261,6	259,9	258,8	220,4

Peso Final	GRUPOS				
Animal	GSC	GSCA	GSF	GSFA	GC
1	452	407	473	367	300
2	391	430	383	403	368
3	407	383	354	393	292
4	391	358	423	379	268
5	420	337	413	417	343
6	416	350	465	384	297
7	341	342	394	452	395
8	432	445	429	344	448
9	407	404	348	398	383
10	399	405	354	409	-
11	346	386	364	356	-
12	397	432	386	418	-
Média	399,9	389,9	398,8	393,3	343,7

Anexo 2. Contagem de mastócitos em 10 campos aleatórios de cada animal e a média

	GRUPOS				
Animal	GSC	GSCA	GSF	GSFA	GC
1	1462	1101	1424	3009	497
2	1655	1197	933	1045	836
3	909	738	1149	1159	586
4	1403	1502	1096	880	905
5	1531	900	892	1119	677
6	1325	997	821	1232	872
7	881	793	1597	1153	956
8	1309	1036	901	1006	1467
9	1223	723	726	1934	871
10	1080	1462	2414	885	-
11	1312	915	1638	846	-
12	900	1447	682	1106	-
Média	1249,2	1067,6	1189,4	1281,2	851,9

Anexo 3. Análise do peritônio visceral do baço e peritônio parietal no GC

Animal	Reação das células mesoteliais do baço		Peritônio Parietal - camada submesotelial	
	Pavimentoso	Cúbico	Normal	Espessada
GC1	Sim	Não	Sim	Não
GC2	Sim	Não	Sim	Não
GC4	Sim	Não	Sim	Não
GC5	Sim	Não	Sim	Não
GC6	Sim	Não	Sim	Não
GC7	Sim	Não	Sim	Não
GC8	Sim	Não	Sim	Não
GC9	Sim	Não	Sim	Não

Legenda: Cúbico: + (leve), ++ (moderado) e +++ (grave)

Espessamento: + (leve), ++ (moderado) e +++ (grave)

Anexo 4. Análise do peritônio visceral do baço e peritônio parietal no GSC

Animal	Reação das células mesoteliais do baço		Peritônio Parietal - camada submesotelial	
	Pavimentoso	Cúbico	Normal	Espessada
GSC 1	Não	+++	Não	+++
GSC 2	Não	++	Não	+++
GSC 3	Não	++	Não	+++
GSC 4	Não	+	Não	++
GSC 5	Sim	Não	Sim	Não
GSC 6	Não	+	Não	+
GSC 7	Não	+	Não	+
GSC 8	Sim	Não	Não	++
GSC 9	Sim	Não	Não	+
GSC 10	Não	+	Não	+
GSC 11	Sim	Não	Sim	Não
GSC 12	Sim	Não	Não	++

Legenda: Cúbico: + (leve), ++ (moderado) e +++ (grave)

Espessamento: + (leve), ++ (moderado) e +++ (grave)

Anexo 5. Análise do peritônio visceral do baço e peritônio parietal no GSCA

Animal	Reação das células mesoteliais do baço		Peritônio Parietal - camada submesotelial	
	Pavimentoso	Cúbico	Normal	Espessada
GSCA 1	Sim	Não	Sim	-
GSCA 2	Sim	Não	Não	+
GSCA 3	Sim	Não	Não	++
GSCA 4	Sim	Não	Não	++
GSCA 5	Sim	Não	Não	++
GSCA 6	Sim	Não	Não	+
GSCA 7	Sim	Não	Não	++
GSCA 8	Sim	Não	Não	+
GSCA 9	Não	+	Não	+
GSCA 10	Não	++	Não	+++
GSCA 11	Sim	Não	Não	++
GSCA 12	Sim	Não	Não	+

Legenda: Cúbico: + (leve), ++ (moderado) e +++ (grave)

Espessamento: + (leve), ++ (moderado) e +++ (grave)

Anexo 6. Análise do peritônio visceral do baço e peritônio parietal no GSF

Animal	Reação das células mesoteliais do baço		Peritônio Parietal - camada submesotelial	
	Pavimentoso	Cúbico	Normal	Espessada
GSF 1	Não	+	Não	+
GSF 2	Não	+	Não	++
GSF 3	Sim	Não	Não	+
GSF 4	Sim	Não	Sim	Não
GSF 5	Sim	Não	Não	+
GSF 6	Não	+	Não	+
GSF 7	Sim	Não	Não	+
GSF 8	Sim	Não	Não	++
GSF 9	Sim	Não	Não	+
GSF 10	Sim	Não	Não	+
GSF 11	Sim	Não	Não	++
GSF 12	Sim	Não	Não	+++

Legenda: Cúbico: + (leve), ++ (moderado) e +++ (grave)

Espessamento: + (leve), ++ (moderado) e +++ (grave)

Anexo 7. Análise do peritônio visceral do baço e peritônio parietal no GSFA

Animal	Reação das células mesoteliais do baço		Peritônio Parietal - camada submesotelial	
	Pavimentoso	Cúbico	Normal	Espessada
GSFA 1	Não	++	Não	+++
GSFA 2	Não	++	Não	+
GSFA 3	Sim	Não	Não	+++
GSFA 4	Sim	Não	Não	+
GSFA 5	Sim	Não	Não	+++
GSFA 6	Sim	Não	Não	++
GSFA 7	Sim	Não	Não	+
GSFA 8	Sim	Não	Não	+++
GSFA 9	Sim	Não	Não	+
GSFA 10	Sim	Não	Não	+
GSFA 11	Não	+	Não	+
GSFA 12	Sim	Não	Não	++

Legenda: Cúbico: + (leve), ++ (moderado) e +++ (grave)

Espessamento: + (leve), ++ (moderado) e +++ (grave)

Anexo 8. Análise da reação inflamatória e fibrose no GC

Animal	Avaliação da reação inflamatória				Localização da reação inflamatória		Presença de fibrose
	Negativa	Presente	Local	Difusa	P.V. Baço	Omento e Intestino	
GC1	Não	Sim	+	Não	Sim	Não	Não
GC2	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não
GC4	Não	Sim	+	Não	Sim	Não	Não
GC5	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não
GC6	Não	Sim	+	Não	Sim	Não	Não
GC7	Não	Sim	+	Não	Sim	Não	Não
GC8	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não
GC9	Não	Sim	Não	+	Sim	Não	Não

Legenda: Local: + ou ++, Difusa: + ou ++ e Fibrose: Focal ou Difusa

Anexo 9. Análise da reação inflamatória e fibrose no GSC

Animal	Avaliação da reação inflamatória				Localização da reação inflamatória		Presença de fibrose
	Negativa	Presente	Local	Difusa	P.V. Baço	Omento e Intestino	
GSC 1	Não	Sim	Não	++	Sim	Não	Difusa
GSC 2	Não	Sim	+	Não	Sim	Não	Não
GSC 3	Não	Sim	++	Não	Sim	Não	Não
GSC 4	Não	Sim	+	Não	Sim	Não	Não
GSC 5	Não	Sim	Não	+	Sim	Não	Não
GSC 6	Não	Sim	+	Não	Sim	Não	Focal
GSC 7	Não	Sim	Não	+	Sim	Não	Focal
GSC 8	Não	Sim	+	Não	Sim	Não	Não
GSC 9	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não
GSC 10	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não
GSC 11	Não	Sim	+	Não	Sim	Não	Não
GSC 12	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não

Legenda: Local: + ou ++, Difusa: + ou ++ e Fibrose: Focal ou Difusa

Anexo 10. Análise da reação inflamatória e fibrose no GSCA

Animal	Avaliação da reação inflamatória				Localização da reação inflamatória		Presença de fibrose
	Negativa	Presente	Local	Difusa	P.V. Baço	Omento e Intestino	
GSCA 1	Não	Sim	Não	++	Sim	Sim	Difusa
GSCA 2	Não	Sim	+	Não	Sim	Não	Focal
GSCA 3	Não	Sim	+	Não	Sim	Não	Focal
GSCA 4	Não	Sim	+	Não	Não	Não	Focal
GSCA 5	Não	Sim	+	Não	Não	Não	Não
GSCA 6	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não
GSCA 7	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	Focal
GSCA 8	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não
GSCA 9	Não	Sim	+	Não	Não	Não	Não
GSCA 10	Não	Sim	Não	+	Sim	Não	Focal
GSCA 11	Não	Sim	++	Não	Sim	Não	Não
GSCA 12	Não	Sim	++	Não	Sim	Sim	Focal

Legenda: Local: + ou ++, Difusa: + ou ++ e Fibrose: Focal ou Difusa

Anexo 11. Análise da reação inflamatória e fibrose no GSF

Animal	Avaliação da reação inflamatória				Localização da reação inflamatória		Presença de fibrose
	Negativa	Presente	Local	Difusa	P.V. Baço	Omento e Intestino	
GSF 1	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não
GSF 2	Não	Sim	++	Não	Sim	Sim	Focal
GSF 3	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não
GSF 4	Não	Sim	+	Não	Sim	Sim	Focal
GSF 5	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não
GSF 6	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não
GSF 7	Não	Sim	+	Não	Sim	Sim	Não
GSF 8	Não	Sim	++	Não	Sim	Não	Focal
GSF 9	Não	Sim	++	Não	Sim	Não	Focal
GSF 10	Não	Sim	+	Não	Sim	Não	Focal
GSF 11	Não	Sim	+	Não	Sim	Não	Não
GSF 12	Não	Sim	++	Não	Sim	Não	Não

Legenda: Local: + ou ++, Difusa: + ou ++ e Fibrose: Focal ou Difusa

Anexo 12. Análise da reação inflamatória e fibrose no GSFA

Animal	Avaliação da reação inflamatória				Localização da reação inflamatória		Presença de fibrose
	Negativa	Presente	Focal	Difusa	P.V. Baço	Omento e Intestino	
GSFA 1	Não	Sim	Não	++	Sim	Sim	Difusa
GSFA 2	Não	Sim	+	Não	Sim	Sim	Não
GSFA 3	Não	Sim	+	Não	Não	Não	Focal
GSFA 4	Não	Sim	+	Não	Sim	Não	Focal
GSFA 5	Não	Sim	Não	++	Sim	Não	Focal
GSFA 6	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não
GSFA 7	Não	Sim	+	Não	Não	Não	Não
GSFA 8	Não	Sim	Não	++	Sim	Não	Focal
GSFA 9	Não	Sim	+	Não	Não	Não	Não
GSFA 10	Não	Sim	+	Não	Sim	Sim	Focal
GSFA 11	Não	Sim	+	Não	Sim	Não	Focal
GSFA 12	Não	Sim	+	Não	Sim	Sim	Difusa

Legenda: Local: + ou ++, Difusa: + ou ++ e Fibrose: Focal ou Difusa

Anexo 13. Total dos pontos da análise histomorfológica em todos os animais estudados

ANIMAL	GSC	GSCA	GSF	GSFA	GC
1	14	8	2	13	1
2	6	5	8	4	0
3	7	6	1	7	*
4	4	6	4	5	1
5	2	3	1	10	0
6	6	1	2	2	1
7	7	5	2	2	1
8	3	1	7	8	0
9	1	3	6	2	2
10	2	10	5	5	-
11	1	4	3	6	-
12	2	7	5	7	-

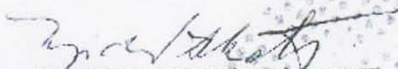
* Animal descartado.

Anexo 14. Documento do Comitê de Ética e Pesquisa Animal

ATESTADO

Atestamos para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa "Efeito da concentração de glicose e da temperatura na morfologia do peritônio de ratos não urêmicos em diálise peritoneal crônica" Protocolo nº 62/2006-CEEA do(a) Pós-Graduando(a) **Priscila Cadima Vicente**, nível Mestrado desta Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 21 de setembro de 2006.


PROFº ASS. DRº. MICHIKO SAKATE
Presidente da CEEA da FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu

FMVZ/UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Jr., s/n – Botucatu/SP – 13618-000
☎/fax: 14-3811-6105 – ✉ sta@fmvz.unesp.br – 🌐 www.fmvz.unesp.br