

Adriana da Cruz Francisco

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE HIOPERFUSÃO A NÍVEL RENAL

Trabalho de Projeto

Mestrado em Enfermagem Veterinária de Animais de Companhia



Agosto, 2018

Adriana da Cruz Francisco

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE HIOPERFUSÃO A NÍVEL RENAL

Trabalho de Projeto

Mestrado em Enfermagem Veterinária de Animais de Companhia

Trabalho efetuado sob orientação de
Helena Maria Vala Correia

Trabalho efetuado sob a co-orientação de
Rita Marisa da Silva Cruz Paiva



Agosto, 2018

Financiado por Programa COMPETE e pela Fundação para a Ciência e Tecnologia
(COMPETE: FCOMP-01-0124-FEDER-009525)



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu de
Desenvolvimento Regional



Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR

“As doutrinas expressas neste trabalho são da exclusiva responsabilidade do autor”

“Tudo evolui; não há realidades eternas: tal como não há verdades absolutas”.

Nietzsch

AGRADECIMENTOS

Seguramente que o espaço limitado desta secção de agradecimentos, não me permitirá agradecer como deveria a todas as pessoas que, ao longo do meu Mestrado em Enfermagem Veterinária de Animais de Companhia, me ajudaram e apoiaram na realização de mais uma etapa da minha formação académica. A elas estou e estarei eternamente grata.

Aos meus pais, Teresa e Francisco, e irmãos, Simone e Leonardo, por todo o amor e apoio incondicional que me deram, e sem dúvida, pela oportunidade de realizar mais uma etapa na minha formação académica.

Ao meu namorado, Miguel, por todo o apoio e ânimo que me deu ao longo destes dois anos, sempre com o seu positivismo, sem ele este projeto não teria chegado onde chegou.

À minha amiga, Rita Martins, sempre disponível nos bons e maus momentos, sempre a apoiar-me e animar-me, uma amiga do coração para sempre.

À minha orientadora e simultaneamente coordenadora do Mestrado de Enfermagem Veterinária de Animais de Companhia, Dra. Helena Vala, por me ter proporcionado as condições necessárias para a elaboração deste projeto, pois só foi possível graças a ela. Também por toda a simpatia e sem dúvida alguma, por toda a sua disponibilidade, foi incansável. Um muito obrigado.

Ao professor David Orlando Ferreira, pela supervisão deste projeto, possibilitando-me a realização deste estudo em ciência animal, por toda a sua disponibilidade e atenção.

Ao projeto propofol, que me permitiu dar os primeiros passos na ciência animal/investigação científica e que me fez despertar bastante interesse na área.

Este projeto foi suportado por fundos da União Europeia (QREN/FEDER) no projeto Ovislab PTDC/CVT/101999/2008, o meu devido agradecimento à Ovislab.

À FCT (Fundação para a ciência e a Tecnologia) que possibilitou a realização deste projeto através do seu financiamento.

Aos meus co-orientadores, Dra. Rita Paiva e Dr. João Mesquita, por todo o apoio e disponibilidade.

Aos funcionários não docentes da ESAV, que foram incansáveis em todos os momentos.

À Eng^a. Carla Garcia, por toda a disponibilidade, ajuda e compreensão que teve comigo durante a realização deste projeto.

Para finalizar, quero agradecer a todos os meus amigos e colegas de mestrado, em especial à Rita Fortuna, companheira de projeto, que durante estes dois anos me apoiaram e me deram força para continuar.

RESUMO

A hipoperfusão subsequente a um trauma ou decorrente de procedimentos cirúrgicos com hemorragia severa, apesar de todos os avanços na Medicina Veterinária, continua a ser uma das mais frequentes causas de encaminhamento de animais de companhia aos CAMV's. Esta situação clínica pode conduzir a um estado de choque denominado choque hipovolêmico, tornando-se, deste modo, uma das causas de maior morbidade e mortalidade.

O déficit de volume intravascular desencadeia um estado hipovolêmico que conduz a uma série de eventos a nível fisiológico, sendo que, entre os mais severos e condutores de graves lesões estão a diminuição da perfusão tecidual, do débito cardíaco e conseqüentemente do aporte de oxigênio aos tecidos. Estes eventos desencadeiam o mecanismo anaeróbio, comprometendo gravemente o funcionamento celular normal.

O rim é um órgão bastante suscetível à hipoperfusão, podendo, deste modo, ser severamente afetado pela diminuição da sua perfusão. Esta diminuição poderá originar uma insuficiência renal aguda com oligúria/anúria e graves distúrbios eletrolíticos.

Para impedir a ocorrência de lesões irreversíveis ou mesmo a morte, deverá ser efetuada a reposição imediata da volêmia. Previamente, deverão ser tidas em conta uma série de considerações, incluindo a escolha do melhor soluto a infundir, a quantidade e o tempo de infusão. Estas considerações deverão estar de acordo com os objetivos terapêuticos, os parâmetros hemodinâmicos, a taxa de sangramento e riscos ou eficácia de determinadas substâncias, visto que existem alguns expansores prejudiciais ao rim.

Mesmo à presente data, ainda não existe consenso na comunidade científica de qual o melhor soluto para repor a volêmia, e, deste modo, o presente estudo tem como objetivo o aprofundamento do conhecimento das lesões histopatológicas e fenómenos apoptóticos a nível renal, avaliando qual o melhor soluto a utilizar. Para este fim, foram selecionados e comparados entre si, um coloide, o hidroxietilamido 130/0,4 e um cristalóide, o Lactato de ringer.

Para a realização do presente estudo, 28 porcos saudáveis, da raça Large White, foram submetidos a um sangramento agudo (25ml/kg) sob efeito de uma anestesia total intravenosa com propofol e remifentanil. Os animais foram distribuídos

aleatoriamente em 3 grupos, grupo 1 - LR (n=11), grupo 2 - HES (n=11) e grupo controlo (n=6). O Grupo 1 recebeu solução de lactato de ringer, o grupo 2 recebeu solução de hidroxietilamido 130/0,4 e o grupo controlo não foi submetido a qualquer tipo de procedimento, apenas à anestesia.

Os resultados deste estudo sugerem que no caso de hemorragia severa, o LR comparando com a solução de HES 130/0,4, quando utilizado para reposição de volémia, pode minimizar o grau de lesão a nível renal. Apesar de a H&E não revelar resultados significativos, os métodos imunohistoquímicos utilizados para avaliar os eventos apoptóticos (o método citocromo c, o método TUNEL e o método M30), vieram revelar diferenças significativas nos grupos.

Palavras-chave: Hipoperfusão; Reposição da volémia; Rim; Hidroxietilamido; Lactato de ringer.

ABSTRACT

The consequent hypoperfusion following a trauma or due to surgical procedures with severe hemorrhage continues to be one of the most frequent reasons that take domestic animals to the VMC's, despite all advances in veterinary medicine.

This clinical situation may lead to a state of shock called hypovolemic shock, becoming one of the causes of increased morbidity and mortality.

Intravascular volume deficit triggers a hypovolemic state that leads to a series of physiological events, with the reduction of tissue perfusion, cardiac output and consequent oxygen supply to the tissues, being the most serious and severe lesions trigger. These disorders can trigger the anaerobic mechanism, severely compromising the normal cellular functioning.

Since the kidney is an organ greatly susceptible to hypoperfusion, it can thus be severely affected by the decrease in its perfusion. As a consequence, an acute renal failure with oliguria/anuria may occur, leading to severe electrolyte disturbances.

To prevent the occurrence of irreversible injuries or even death, an immediate replacement of the volume should be performed. Beforehand, a number of considerations should be taken into account, including the choice of the best solute to infuse, the amount and time of infusion. These considerations should be in accordance with the therapeutic objectives, hemodynamic parameters, bleeding rate and risks or efficacy of certain substances, since there are some expanders that are harmful to the kidney.

To date, the scientific community has not yet reached a consensus on what the best solution is to restore the volume. Therefore, the present study aims to deepen the knowledge of histopathological lesions and apoptotic phenomena at the renal level, evaluating which is the best solution to use. To this end, a colloid, hydroxyethyl starch 130 / 0.4 and a crystalloid, ringer's lactate, were selected and compared.

For the present study, 28 healthy Large White pigs were submitted to an acute bleeding (25 ml/kg) under the effect of total intravenous anesthesia with propofol and remifentanil.

The animals were randomly assigned to 3 groups, the group 1 - RL (n = 11), the group 2 - HES (n = 11) and the control group (n = 6). The RL group received ringer's lactate solution, the HES group received 130 / 0.4 hydroxyethyl starch solution and the control group was not subjected to any type of procedure, only to anesthesia.

The results of this study suggest that in the case of severe hemorrhage, the RL comparing with the solution of HES 130 / 0.4 can minimize the degree of renal damage, when used for volume replacement.

Although H&E did not reveal significant results, the immunohistochemical methods used to evaluate apoptotic events (cytochrome c method, TUNEL method and M30 method) revealed significant differences in the groups.

Key words: Hypoperfusion; Replacement of the volume; Kidney; Hydroxyethyl starch; Lactated ringer.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. HIPOVOLÊMIA E HIPOPERFUSÃO	4
2.2. CHOQUE HIPOVOLÉMICO	7
2.2.1. FISIOPATOLOGIA DO CHOQUE HIPOVOLÉMICO	7
2.2.2. SINTOMATOLOGIA E EXAME FÍSICO.....	10
2.2.3. AVALIAÇÃO DA CIRCULAÇÃO	10
2.2.3.1. MEMBRANAS MUCOSAS.....	11
2.2.3.2. TEMPO DE REPLEÇÃO CAPILAR	12
2.2.3.3. DÉBITO CARDÍACO E QUALIDADE DO PULSO	12
2.2.3.4. TEMPERATURA	12
2.2.3.5. ALTERAÇÕES DO SISTEMA NEUROLÓGICO	13
2.3. CIRCULAÇÃO	13
2.3.1. MACROCIRCULAÇÃO	13
2.3.2. MICROCIRCULAÇÃO	14
2.4. AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO E DA VOLÊMIA	17
2.4.1. BIOMARCADORES DE AVALIAÇÃO DE HIPOPERFUSÃO.....	17
2.5. PRESSÃO ARTERIAL	18
2.6. REPERFUSÃO.....	21
2.7. FLUIDOTERAPIA	22
2.7.1. COLÓIDES.....	24
2.7.1.1. ALBUMINA	25
2.7.1.2. HIDROXIETILAMIDO	25
2.7.1.3. DEXTRANAS	27
2.7.2. CRISTALÓIDES	27
2.7.2.1. LACTATO DE RINGER.....	28
2.8. RIM.....	29
2.8.1. FISILOGIA RENAL	29
2.8.2. RIM E CONTROLO DA PRESSÃO ARTERIAL	30
2.8.3. ALTERAÇÕES RENAIS	30
2.9. INSUFECIÊNCIA RENAL AGUDA	31
2.9.1. Etiologia.....	32
2.9.2. Lesão hipoperfusão/reperfusão.....	33
2.10. APOPTOSE.....	35
2.10.1. Morfologia da apoptose.....	36
2.10.2. Caspases	38

2.10.3. Vias de ativação da apoptose	39
2.10.4. Apoptose/Regeneração Tubular	42
2.11. O PAPEL DO ENFERMEIRO VETERINÁRIO.....	43
3. PARTE PRÁTICA.....	44
3.1. OBJETIVOS.....	44
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.2.1. PROTOCOLO ANESTÉSICO.....	46
3.2.2. MONITORIZAÇÃO HEMODINÂMICA E CEREBRAL E EQUIPAMENTOS	48
3.2.3. PROTOCOLO CLÍNICO	49
3.2.4. NECRÓPSIA E FIXAÇÃO DE AMOSTRAS	49
3.2.5. MÉTODO HISTOPATOLÓGICO.....	49
3.2.5.1. HEMATOXILINA & EOSINA	51
3.2.5.2. CITOCROMO C	53
3.2.5.3. TUNEL	54
3.2.5.4. M30	55
3.2.5.5. ANÁLISE	57
4. RESULTADOS	60
4.1. HEMATOXILINA & EOSINA.....	60
4.2. CITOCROMO C.....	68
4.3. TUNEL	75
4.4. M30	84
4.5. RESUMO DE RESULTADOS	93
4.5.1. Resumo Quick – Score resultados	93
4.5.2. Resumo High-score resultados	94
5. DISCUSSÃO	95
5. CONCLUSÃO	100
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

GLOSSÁRIO DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – Micrograma

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ATP – Compostos de alta energia

Bcl₂ – B-cell Lymphome 2

Bpm – Batimentos por minuto

CAMV – Centro de atendimento médico veterinário

CO₂ – Dióxido de carbono

DB – Deficit de bases

DC – Débito cardíaco

DD – Death domain

DO₂ – Débito de oxigênio

ERO₂ – Rácio de extração de oxigênio

ECG – Eletrocardiograma

EtCO₂ - concentração de dióxido de carbono da expiração

FADD – Fas associated death domain

FSR – Fluxo Sanguíneo Renal

G – Gauge

HES – Hidroxietilamido

H&E – Hematoxilina & Eosina

IRA – Insuficiência renal aguda

IV – Intravenosa

Kg - quilograma

LR – Lactato de ringer

ml - mililitro

MM – Membranas mucosas

mmHg - milímetros de mercúrio

mol - unidade de quantidade de substância

NAD⁺ - Nicotina adeninadinucliótido

NTA – Necrose Tubular Aguda

O₂ – Oxigênio

PA – Pressão arterial

PaCO₂ – Pressão parcial de dióxido de carbono

PAD – Pressão diastólica
PAS – Pressão sistólica
PAM – Pressão arterial média
Ph – Potencial hidrogénico
PO₂ - Pressão parcial de O₂
PVC – Pressão venosa central
P53 – Proteína supressora tumoral
RFG – Filtração Glomerular Renal
Rpm – Respirações por minuto
SPO₂ – Saturação periférica de oxigénio
SVjO₂ – Saturação de oxigénio no sangue venoso
SV₂O₂ – Saturação de oxigénio no sangue venoso
TRC – Tempo de repleção capilar
TC – Tubos coletores
TCP – Túbulos contornados proximais
TCD - Túbulos contornados distais
TDT - Deoxinucleotidil transferase terminal
TIVA - Anestesia total intravenosa
TNF – Fator de Necrose Tumoral
VO₂ – Consumo de oxigénio pelos tecidos

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sinais e sintomas de inadequação da hipoperfusão associados á hipotensão arterial (Adaptado de Ferreira, 2015).....	3
Figura 2. Esquema representativo das potenciais causas de hipóxia tecidual. (Adaptado de Kunzler, 2014)	5
Figura 3. Representação esquemática das perdas de fluido intravascular (Adaptados de Fernandes, 2014).....	6
Figura 4. Representação esquemática da evolução do choque circulatório. (Adaptado de Vicent et al., 2008)	6
Figura 5. Esquema Representativo dos processos ocorridos durante o choque hipovolémico (Adaptado de Costa, 2014). DO ₂ – Débito de oxigénio; ERO ₂ – Rácio de extração de oxigénio; O ₂ – oxigénio.....	8
Figura 6. Esquema representativo das diferentes fases do choque (Adaptado de Dourado, 2010)	9
Figura 7. Efeitos fisiopatológicos básicos dos vários tipos de choque. (Adaptado de Vicent et al., 2008). Pd2f – pressão diastólica final; VE – Ventrículo esquerdo; VD – Ventrículo direito; PVC – pressão venosa central; PAE - Pressão atrial esquerda; PCP – Pressão capilar pulmonar.....	10
Figura 8. Avaliação das membranas mucosas (Adaptado de Jamie et al., 2012;	11
Figura 9. Pressão sanguínea nas diferentes porções do sistema circulatório (Adaptado de	17
Figura 10. Esquema representativo das evidências da PA.....	20
Figura 11. Esquema representativo da fluidoterapia em cães e gatos com hemorragia e hipotensão (Adaptado de Costa, 2014)	23
Figura 12. Principais soluções coloides e composição (Adaptado de Corrêa et al., 2015)....	24
Figura 13. Diagrama esquemático da molécula de hidroxietilamido (Adaptado de Barros JMP, 2009)	26
Figura 14. Principais soluções cristaloides e composição (Adaptado de Corrêa et al., 2015)	28
Figura 15. Fases do choque a nível renal. (Adaptado de Dourado, 2010)	31
Figura 16. Célula em apoptose (Adaptado de Anónimo, 2013)	36
Figura 17. Figura representativa do processo de morte celular programada (Adaptado de https://www.biooncology.com/pathways/cancer-tumor-targets/bcl-2/bcl-2-dysregulation.html)	38
Figura 18. Via de ativação intrínseca do processo de apoptose. (Adaptado de Grivicich <i>et al.</i> , 2007)	40

Figura 19. Vias de ativação do processo de morte celular programada.....	42
Figura 20. Porco de raça Large White. Adaptado de http://www.dino.com.br/releases/inovacao-em-genetica-suina-combina-o-melhor-do-large-white-com-o-lado-bom-do-landrace-dino890120577131	45
Figura 21. Cronograma do procedimento realizado em cada grupo de animais.....	46
Figura 22. Stresnil. Adaptado de http://www.yorkvetsupplies.co.uk/product/stresnil-40mg-ml-solution-for-injection-for-pigs-100ml	47
Figura 23. Protocolo anestésico.	48
Figura 24. Processamento de tecidos.....	50
Figura 25. Esquema representativo do processo desparafinação e hidratação	51
Figura 26. Processo de coloração H&E	52
Figura 27. Esquema representativo da técnica TUNEL.....	55
Figura 28. High-Score	59
Figura 29. Hipercelularidade Glomerular Grau 1 no grupo 2	67
Figura 30. Hipercelularidade Glomerular Grau 2 no grupo 1	67
Figura 31. Congestão Grau 1 no Grupo 2.....	67
Figura 32. Hiperémia Grau 2 no Grupo 2.....	67
Figura 33. Hialinose Venular no grupo 2.....	67
Figura 34. Cilindros Hialinos TCD do grupo 2	67
Figura 35. Córtex: Glomérulo negativo; TCP grau 1; TCD grau 2. Grupo Controlo.....	69
Figura 36. Córtex: TCP grau 2; TCD grau 3 Grupo Controlo	69
Figura 37. Córtex: Glomérulo negativo; TCP grau 3; TCD com grau 4. Grupo Controlo	69
Figura 38. Medula: Segmento grosso da AH grau 4; segmento fino da AH negativo; TC grau 2. Grupo Controlo.....	69
Figura 39. Medula: Segmento grosso da AH grau 4; segmento fino da AH negativo; TC grau 2. Grupo Controlo.....	69
Figura 40. Medula: Segmento grosso da AH grau 4; segmento fino da AH negativo; TC grau 2. Grupo Controlo.....	69
Figura 41. Córtex: Glomérulo negativo; TCP grau 2; TCD grau 3. Grupo 1	71
Figura 42. Córtex: Glomérulo negative; TCP com grau 2; TCD com grau 3. Grupo 1	71
Figura 43. Córtex: Glomérulo negative; TCP grau 2; TCD grau 4. Grupo	71
Figura 44. Medula: Segmento grosso da AH grau 4; segmento fino da AH negativo; TC grau 2. Grupo 1	71
Figura 45. Medula: Segmento grosso da AH grau 4; segmento fino da AH grau 1, TC grau 2. Grupo 1	71

Figura 46. Medula: Segmento grosso da AH grau 4; segmento fino da AH grau 2, TC grau 1. Grupo 1	71
Figura 47. Medula: Segmento grosso da AH com grau 4; segmento fino da AH grau 2; TC grau 2. Grupo 1	72
Figura 48 Medula: Segmento grosso da AH com grau 4; segmento fino da AH grau 2. Grupo 1	72
Figura 49. Córtex: Glomérulos negativos; TCP grau 3; TCD grau 4. Grupo 2	73
Figura 50. Córtex: TCP grau 3; TCD grau 4.	73
Figura 51. Córtex: Glomérulo negative; TCP grau 3; TCD grau 4. Grupo 2.....	73
Figura 52. Córtex: Glomérulo negative; TCP grau 3; TCD grau 4. Grupo 2	73
Figura 53. Córtex: TCP grau 3; TCD grau 4. Grupo 2	74
Figura 54. Medula: Segmento grosso da AH grau 4; segmento fino da AH grau 1. Grupo 2	74
Figura 55. Medula: Segmento grosso da AH grau 4; segmento fino da AH grau 1, TC grau 2. Grupo 1	74
Figura 56. Medula: Segmento grosso da AH grau 4; segmento fino da AH grau 2, TC grau 1. Grupo 1	74
Figura 57. Medula: Segmento grosso da AH grau 4; segmento fino da AH grau 2; TC grau 2. Grupo 2	74
Figura 58. Medula: Segmento grosso da AH grau 4; segmento fino da AH grau 2. Grupo 2	74
Figura 59. Córtex: Glomérulo grau 1. Grupo Controlo.....	76
Figura 60. Córtex: Glomérulo grau 1. Grupo Controlo.....	76
Figura 61. Córtex: TCP e TCD negativos. Grupo Controlo	76
Figura 62. Córtex: TCP e TCD com algumas células com grau 2. Grupo Controlo.....	76
Figura 63. Medula: Segmento grosso da AH negativo, Segmento fino da AH negativo; TC grau 3. Grupo Controlo	76
Figura 64. Medula: Segmento grosso da AH grau 3; Segmento fino da AH grau 3; TC grau 4. Grupo Controlo.....	76
Figura 65. Medula: Segmento grosso da AH grau 3; Segmento fino da AH com grau 3; TC com grau 4. Grupo Controlo.....	77
Figura 66. Medula: Segmento grosso da AH e Segmento fino da AH negativos; TC com grau 3. Grupo Controlo.....	77
Figura 67. Medula: Um Segmento fino da AH com grau 3; TC com grau 3. Grupo Controlo	77
Figura 68. Medula: TC com grau 4. Grupo Controlo.....	77
Figura 69. Córtex: Glomérulo, TCP e TCD negativos. Grupo 1	78

Figura 70. Córtex: Glomérulo, TCP e TCD grau 2. Grupo 1	78
Figura 71. Córtex: Glomérulo, TCP e TCD grau 2. Grupo 1	78
Figura 72. Medula: TC negativos. Grupo 1	78
Figura 73. Medula: Segmento grosso da AH, segmento fino da AH e TC negativos. Grupo 1	79
Figura 74. Medula: TC grau 3. Grupo 1	79
Figura 75. Medula: Segmento grosso da AH grau 2; Segmento fino da AH grau 2; TC grau 3. Grupo 1	79
Figura 76. Medula: TC grau 2. Grupo 1	79
Figura 77. Medula: Um segmento fino da AH grau 2; TC negativos. Grupo 1	79
Figura 78. Medula: TC grau 4. Grupo 1	79
Figura 79. Córtex: Glomérulo, TCP e TCD negativos. Grupo 2.....	80
Figura 80. Córtex: Glomérulo negativo; TCP e TCD grau 1. Grupo 2.....	80
Figura 81. Córtex: Glomérulo grau 1. Grupo 2.....	81
Figura 82. Córtex: Glomérulo, TCP e TCD grau 1. Grupo 2.....	81
Figura 83. Medula: TC grau 3. Grupo 2	81
Figura 84. Medula: Segmento grosso da AH negativo; Segmento fino da AH grau 3; TC grau 3. Grupo 2.....	81
Figura 85. Medula: TC grau 3. Grupo 2	81
Figura 86. Medula: TC grau 4. Grupo 2	81
Figura 87. Gráfico High - score da percentagem de células positivas por grupo experimental	83
Figura 88. Gráfico High - score do nr de porcos existente em cada intervalo avaliado por grupo experimental	83
Figura 89. Gráfico High - score do total de células apoptóticas por grupo experimental	84
Figura 90. Córtex: Glomérulo negativo; TCP grau 1. Grupo Controlo.....	85
Figura 91. Córtex: Glomérulo negativo TCP grau 1. Grupo Controlo.....	85
Figura 92. Medular negativa. Grupo Controlo	85
Figura 93. Medular negativa. Grupo Controlo	85
Figura 94. Medular negativa. Grupo Controlo	85
Figura 95. Medular negativa. Grupo Controlo	85
Figura 96. Córtex: Glomérulo negativo; TCP grau 1. Grupo 1	86
Figura 97. Córtex: TCP grau 1. Grupo 1	86
Figura 98. Córtex: Glomérulo negativo; TCP grau 2. Grupo 1	87
Figura 99. Córtex: TCP grau 3. Grupo 1	87

Figura 100. Córtex: Glomérulo negativo; TCP grau 3. Grupo 1	87
Figura 101. Córtex: Glomérulo negativo; TCP grau 3. Grupo 1	87
Figura 102. Medular negativa. Grupo 1	87
Figura 103. Medular negativa. Grupo 1	87
Figura 104. Córtex: Glomérulo negativo; TCP grau 4. Grupo 2	88
Figura 105. Córtex: Glomérulo negativo; TCP grau 4. Grupo 2	88
Figura 106. Córtex: TCP grau 4. Grupo 2	89
Figura 107. Medula: Segmento grosso da AH grau 2; TC grau 2. Grupo 2	89
Figura 108. Medula: AH negativa. Grupo 2	89
Figura 109. Medula: Segmento grosso da AH grau 2; TC grau 2. Grupo 2	89
Figura 110. Medula: TC grau 3. Grupo 2	89
Figura 111. Medula: TC grau 3. Grupo 2	89
Figura 112. Gráfico High - score da percentagem de células positivas por grupo experimental	91
Figura 113. Gráfico High - score do nr de porcos existente em cada intervalo avaliado por grupo experimental	91
Figura 114. Gráfico High - score do total de células apoptóticas por grupo experimental	92

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Esquema da composição dos vasos sanguíneos (Adaptado de Engelhardt & Breves 2005) * O símbolo + representa a proporção correspondente ao tecido da parede vascular.....	14
Quadro 2. Pressão sanguínea média em repouso de animais domésticos (Adaptado de Engelhardt & Breves, 2005).....	21
Quadro 3. Vantagens e desvantagens das soluções (Adaptado de Barros, 2009)	29
Quadro 4. Quadro representativo das lesões avaliadas com a Hematoxilina & Eosina.....	52
Quadro 5. Técnica Citocromo c.	54
Quadro 6. Técnica TUNEL	55
Quadro 7. Quick – Score Cálculos	58
Quadro 8. Resultados das análises efetuadas antes e depois do protocolo experimental. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p>0,05$).	60
Quadro 9. Resultados H&E a nível glomerular	61
Quadro 10. Resultados H&E a nível tubular	62
Quadro 11. Resultados H&E a nível Intersticial	63
Quadro 12. Resultados H&E a nível vascular	64
Quadro 13. Resultados H&E a nível da papila renal.....	65
Quadro 14. Quadro resumo dos resultados das lesões avaliadas na H&E	66
Quadro 15. Resultados citocromo c – Grupo Controlo	68
Quadro 16. Resultados citocromo c - Grupo 1 (RL).....	70
Quadro 17. Resultados citocromo c – Grupo 2 (HES).....	72
Quadro 18. Resultado estatisticamente significativo do	73
Quadro 19. Resultados Q-score TUNEL - Grupo Controlo	75
Quadro 20. Resultados Q-score TUNEL - Grupo 1 (RL).....	78
Quadro 21. Resultados Q-score TUNEL – Grupo 2 (HES)	80
Quadro 22. Resultados High-Score da técnica TUNNEL	82
Quadro 23. Média dos resultados obtidos no Córtex e na Medula renal no High-Score da técnica TUNNEL.....	83
Quadro 24. Resultados Q-score M30 - Grupo Controlo	84
Quadro 25. Resultados Q-score M30 - Grupo 1 (RL)	86
Quadro 26. Resultados Q-score M30 – Grupo 2 (HES)	88
Quadro 27. Resultados High-Score da técnica M30.....	90

Quadro 28. Média dos resultados obtidos no Córtex e na Medula renal no High-Score da técnica M30	91
Quadro 29. Resultados da análise Kruskal-Wallis, seguida da análise Dunn para a técnica M30.....	92
Quadro 30. Quadro resumo dos resultados obtidos com a técnica do Citocromo-c.....	93
Quadro 31. Quadro resumo dos resultados obtidos com a técnica TUNEL	93
Quadro 32. Quadro resumo dos resultados obtidos com a técnica M30	93
Quadro 33. Quadro resumo dos resultados obtidos com o high-score nas técnicas TUNEL e M30.....	94

1. INTRODUÇÃO

A hipovolémia é uma condição que aparece frequentemente na prática clínica veterinária, apresentando-se como um dos principais sinais clínicos do choque. Nos pacientes veterinários, o choque pode ser decorrente de uma ampla variedade de doenças associadas a trauma, infecção ou disfunção cardiovascular (Soares, 2008; Zancan, 2014).

As emergências por traumatismos são consideradas uma importante causa de encaminhamento de cães para Centros de Atendimento Médico Veterinários (CAMV's) em todo o mundo (Oliveira *et al.*, 2015).

Em situações de hemorragia por traumatismo, as perturbações primárias incluem diminuição do volume sanguíneo circulante, redução do retorno venoso, diminuição da pressão venosa central (PVC), diminuição do débito cardíaco (DC) e da pressão arterial (PA) (Soares, 2008; Hirano, 2003). Com a redução absoluta ou relativa da oferta de oxigénio (O₂) desencadeada pela diminuição de perfusão, é desencadeado o mecanismo anaeróbio (Silva *et al.*, 2001).

A hemorragia é descrita como a perda aguda do volume sanguíneo, que pode provocar desde perturbações fisiopatológicas insignificantes a situações clínicas extremamente graves, podendo culminar na irreversibilidade do choque e conduzindo o animal à morte (Abreu, 2012).

No trauma, conforme referido, é frequente ocorrerem perdas significativas de sangue, o que pode conduzir ao choque hipovolémico do tipo hemorrágico. Esta situação clínica, classificada como choque, advém da insuficiência circulatória aguda com má distribuição generalizada do fluxo sanguíneo e consequente falência da oferta e/ou utilização do O₂ pelos tecidos (Ferreira, 2015).

O choque hipovolémico é considerado uma emergência frequente, constituindo mais de 60% de todos os tipos de choque, sendo esta condição habitual em animais politraumatizados ou em situações decorrentes de procedimentos cirúrgicos (Oliveira TC *et al.*, 2015).

Pacientes em estado hemorrágico e trauma, apresentam perfusão tecidual inadequada, má oferta e distribuição de O₂, com consequente instalação de acidose metabólica. Desta forma, necessitam de reposição de volémia para restabelecimento da PA e do volume intravascular, para minimizar o número de células afetadas pela má perfusão (Ferreira, 2015).

O rim é um órgão bastante suscetível à hipoperfusão, podendo ser severamente afetado pelo déficit de perfusão, que origina insuficiência renal aguda (IRA) com oligúria/anúria e distúrbios eletrolíticos (Gaija, 2004).

Para impedir consequências irreversíveis nos órgãos em situações de hipoperfusão, em casos de choque hipovolêmico, deve ser feita a imediata reposição da volêmia. Para isso, devem ser tidas em conta uma série de considerações, incluindo qual o melhor soluto a infundir, a quantidade e o tempo de infusão, de acordo com os objetivos terapêuticos, parâmetros hemodinâmicos, taxa de sangramento do paciente e os riscos ou eficácia de determinadas substâncias, pois existem expansores que podem trazer complicações renais (Ferreira, 2015).

Na generalidade dos casos é necessário recorrer a intervenção cirúrgica pós-traumática e à indução anestésica para controlar o sangramento, com o intuito de minimizar a instabilidade hemodinâmica consequente da vasodilatação e da depressão do miocárdio (Oliveira *et al.*, 2015).

O diagnóstico do choque circulatório baseia-se numa boa anamnese e no exame físico completo. Torna-se também necessário identificar a presença de hipotensão arterial associada a sinais e sintomas de inadequação da perfusão tecidual que incluem a ansiedade, a hipotensão, a taquicardia, a pele fria, pálida ou cianótica, a sudorese, a taquipneia, a sede, as náuseas, os vômitos, a confusão, a oligúria, a anúria, a alteração do estado mental e a acidose metabólica (Ferreira, 2015).

O tratamento tradicionalmente utilizado em pacientes com choque hemorrágico, visa melhorar a perfusão e com ela a oxigenação dos órgãos. Isto verifica-se efetuando uma rápida infusão de fluidos até se conseguir normalizar os valores de PA (Wong *et al.*, 2006).

Mesmo à presente data, ainda não existe um consenso sobre quais os fluidos a utilizar na ressuscitação de pacientes traumatizados. Vários autores aconselham o uso balanceado entre coloides e cristaloides. Deste modo, o presente estudo tem como objetivo aprofundar o conhecimento das lesões histopatológicas e dos fenómenos apoptóticos a nível renal, comparando a reperfusão com a utilização de

um coloide e um cristalóide, o hidroxietilamido 130/0,4 (HES) e o lactato de ringer (LR), respectivamente.

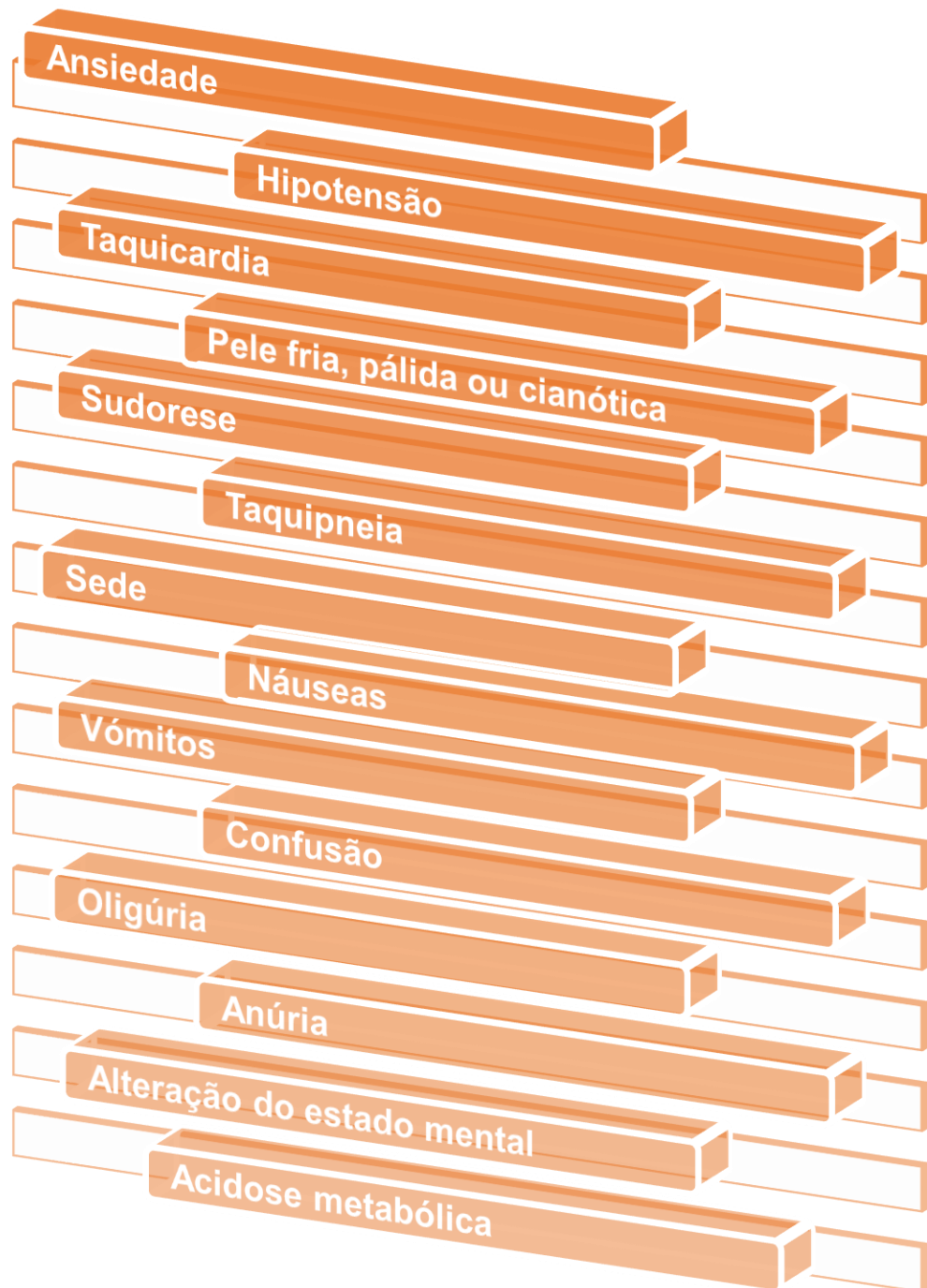


Figura 1. Sinais e sintomas de inadequação da hipoperfusão associados à hipotensão arterial (Adaptado de Ferreira, 2015)

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. HIPOVOLÊMIA E HIPOPERFUSÃO

A hipovolémia é uma condição caracterizada por perda de fluido corporal, conduzindo a um inadequado fluxo circulatório, reduzindo o fluxo de sangue para os órgãos (Regalin, 2009).

A perfusão tecidual pode ser considerada como o produto do fluxo capilar, conteúdo de nutrientes e O₂ oferecidos aos tecidos. Deste modo, as duas componentes mais importantes são o fluxo e o conteúdo de O₂. O fluxo pode ser caracterizado pelo DC e pela sua distribuição, sendo que a análise do conteúdo deve ter em consideração a concentração sérica de hemoglobina, a saturação e a pressão parcial de oxigênio arterial (Silva *et al.*, 2001).

Uma boa perfusão tecidual com apropriada oferta de O₂ depende do DC, da relação ventilação/perfusão pulmonar e da presença de uma taxa de hemoglobina normal (Abreu, 2012).

Em caso de hipovolémia, para preservar a função orgânica vital, o organismo desencadeia mecanismos compensatórios que incluem taquicardia, taquipneia e vasoconstrição periférica (Correia, 2015).

Os efeitos de privação de O₂ são inicialmente reversíveis, contudo, rapidamente se tornam irreversíveis, resultando em morte celular sequencial, danos em órgãos alvo, falência múltipla de órgãos e morte consequente (Felice, 2011).

As causas potenciais de hipóxia tecidual compreendem a falência macrocirculatória (falha na entrega de O₂), falência microcirculatória (falha na distribuição de O₂) e falência mitocondrial (falha no processamento de O₂) (Kunzler, 2014).

O fluxo de sangue para qualquer região do corpo está dependente da pressão de perfusão que se traduz essencialmente através da PA. A regulação e o controle da PA é uma das funções fisiológicas de maior complexidade, que está dependente das ações integradas dos sistemas cardiovascular, renal, neural e endócrino (Martelli, 2012).

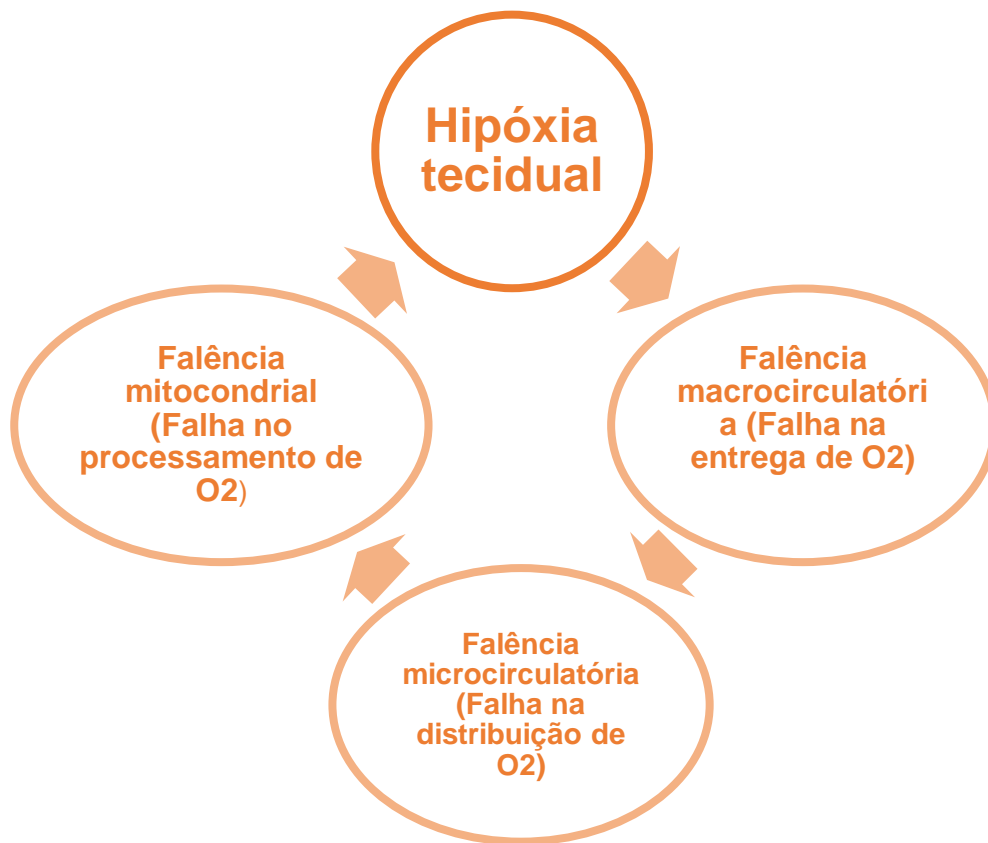


Figura 2. Esquema representativo das potenciais causas de hipóxia tecidual. (Adaptado de Kunzler, 2014)

É crucial realizar uma avaliação rápida da hemorragia quando existe instabilidade hemodinâmica, pois uma lesão no coração, pulmão ou vasos poderá envolver uma grande perda de sangue, sem evidências externas (Correia, 2015).

As alterações circulatórias levam a um desequilíbrio entre a oferta e necessidade de O₂ resultando numa hipóxia tecidual ou choque (Kunzler, 2014).

O organismo consegue compensar perdas de fluido intravascular inferiores a 20%. Perdas entre os 20 e os 40% resultam num choque moderado e perdas superiores a 40% conduzem a choque severo. Cães adultos e saudáveis podem tolerar perdas superiores a 40% ou aproximadamente 35 a 40 ml/kg (Fernandes, 2014).



Choque compensado Choque moderado Choque Severo

Figura 3. Representação esquemática das perdas de fluido intravascular (Adaptados de Fernandes, 2014)

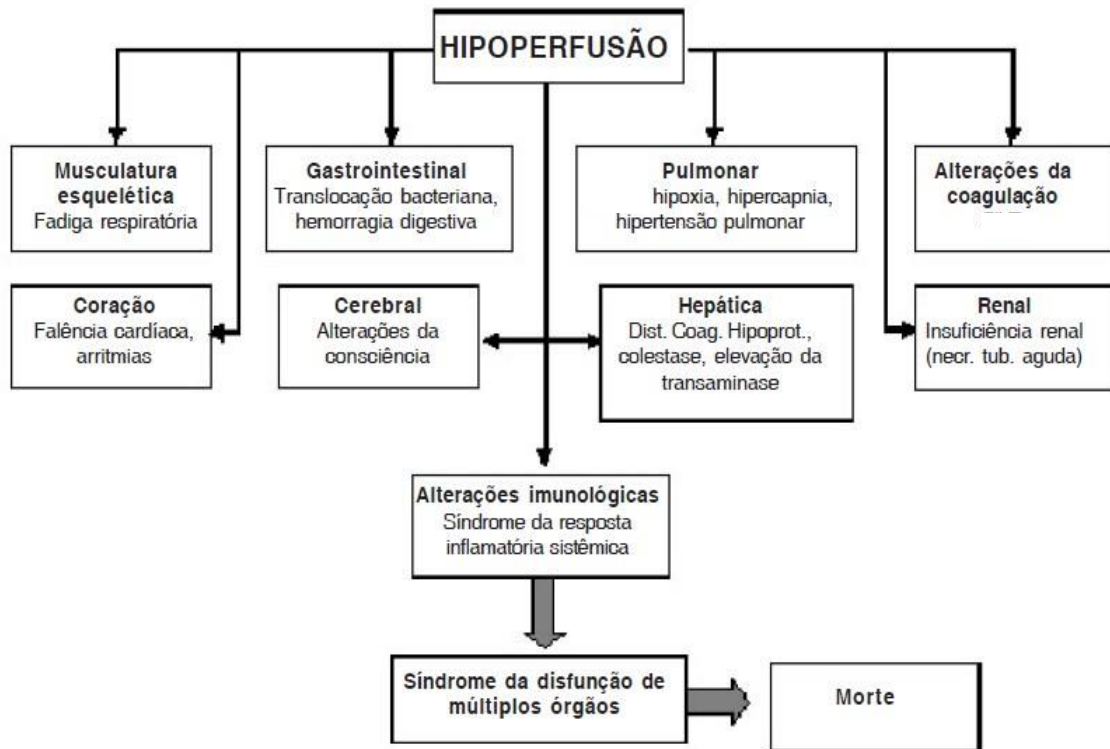


Figura 4. Representação esquemática da evolução do choque circulatório. (Adaptado de Vicent *et al.*, 2008)

2.2. CHOQUE HIPOVOLÉMICO

O rácio entre o fornecimento de oxigénio (DO_2) e o consumo de oxigénio pelos tecidos (VO_2) corresponde ao rácio de extração de O_2 (ERO_2) e normalmente o DO_2 excede largamente o VO_2 sendo o valor de rácio entre 25 a 30% (Costa, 2014).

O choque é um estado clínico resultante do inadequado suprimento de O_2 aos tecidos, conduzindo a um metabolismo celular alterado, morte celular e falência de órgãos (Regalin, 2009).

O choque hipovolémico consequente à hipovolémia é o tipo de choque mais frequente em clínica de pequenos animais. Pode resultar da perda sanguínea (hemorragia interna ou externa) ou da perda de alguns elementos plasmáticos (água, eletrólitos, proteínas, etc.) ou seja, de fluidos para o terceiro espaço (decorrentes do edema tecidual e do movimento do fluido para o espaço transcelular, resultando numa perda de fluido intravascular funcional), secundários à formação de exsudado e transudado, perdas renais ou perdas gastrointestinais (vómito e diarreia – desidratação) (Fernandes, 2014; Fernandes, 2012).

Conforme referido anteriormente, nas hemorragias pode haver tanto perda de eritrócitos como de plasma ou apenas perda de plasma, que ocorre em casos mais específicos dos quais são exemplos as coagulopatias hereditárias e adquiridas, as septicémias, as hipoproteinémias e as hipoglubulinémias. Em ambas as formas, o que se sucede é uma queda na pressão de enchimento capilar ou pressão hidrostática (Júnior *et al.*, 2014).

Este tipo de choque pode ser facilmente diagnosticado caso a sintomatologia de instabilidade hemodinâmica ou a perda de volume sanguíneo sejam claros. Em contrapartida, este choque poderá ser facilmente confundido com outro tipo de choque ou mesmo não chegar a ser diagnosticado como tal (Júnior *et al.*, 2014).

2.2.1. FISIOPATOLOGIA DO CHOQUE HIPOVOLÉMICO

O choque hipovolémico é um desequilíbrio entre o volume circulante e a capacidade do sistema vascular (Ferreira, 2015).

A progressão da hipovolémia provoca acidose metabólica (acidose láctica), que se reflete na diminuição do metabolismo de lactato. Esta diminuição repercute-se através dos níveis séricos do lactato devido ao aumento do metabolismo anaeróbio

para a produção de energia. Os níveis séricos de lactato constituem um marcador de agressão tecidual secundária à hipóxia (Ferreira, 2015).

No choque hipovolémico a hemoglobina que faz o transporte de O_2 encontra-se diminuída, isto é, a sua disponibilidade está reduzida ao ponto de provocar uma consequente redução do DO_2 que, por sua vez, é compensado pelo aumento do ERO_2 do sangue pelas células, de forma a manter em condições normais o VO_2 . Contudo, a partir do momento em que o DO_2 baixa ao ponto de já não se conseguir compensar com o aumento do ERO_2 é chegado o ponto crítico de DO_2 . A partir daqui as reduções de DO_2 são acompanhadas por reduções de consumo de O_2 , passando a desenvolver-se um metabolismo anaeróbio com acumulação de ácido láctico, isto é acidose e hipóxia tecidual (Costa, 2014).

Inicialmente em condições normais o VO_2 é “independente do fluxo” sanguíneo passando a dependente quando as reduções do DO_2 são acompanhadas por reduções do consumo de O_2 (Costa, 2014).

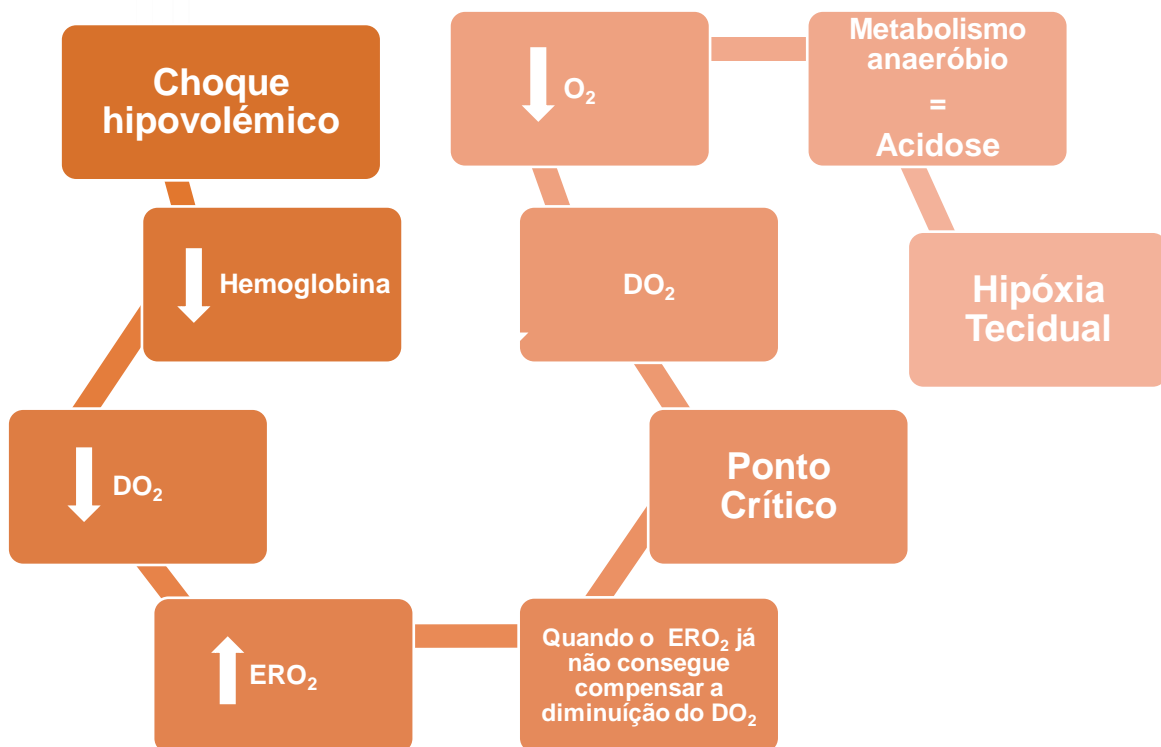


Figura 5. Esquema Representativo dos processos ocorridos durante o choque hipovolémico (Adaptado de Costa, 2014). DO_2 – Débito de oxigénio; ERO_2 – Rácio de extração de oxigénio; O_2 – oxigénio.

A diminuição do espaço extracelular produz uma diminuição do volume plasmático e da perfusão hidrostática capilar, com diminuição do filtrado glomerular e da diurese, acionando os mecanismos renais compensadores de retenção de água e sódio. Por outro lado, a diminuição do DC produz uma diminuição da tensão arterial, gerando a estimulação dos barorreceptores, com consequente resposta adrenérgica. Isto provoca a distribuição do fluxo sanguíneo, estimulação da renina – angiotensina - aldosterona e da hormona antidiurética culminando também no acionar dos mecanismos compensadores renais (Miranda *et al.*, 2013).

Durante o choque hipovolémico um dos sintomas mais precoces de inadequação de perfusão tecidual é a oligúria. Este sintoma pode ocorrer devido ao desvio de fluxo sanguíneo para os órgãos com maior necessidade, isto é, para os órgãos vitais, ou devido à depleção do volume intravascular. A melhoria deste sintoma ajuda a guiar a terapêutica (Ferreira, 2015).

Face à hipovolémia existente, o organismo tenta compensar a perda através da vasoconstrição, que, por sua vez, leva à diminuição da perfusão tecidual de forma a redirecionar o sangue da periferia para os órgãos vitais. Um sintoma que ocorre devido a este redireccionamento é a pele fria. A taquicardia é uma resposta fisiológica à diminuição do volume sistólico e a oximetria de pulso revela a hipoxémia (Ferreira, 2015). O progresso do choque é normalmente dividido em três fases, choque compensado, choque descompensado e choque irreversível, respetivamente (Dourado, 2010)

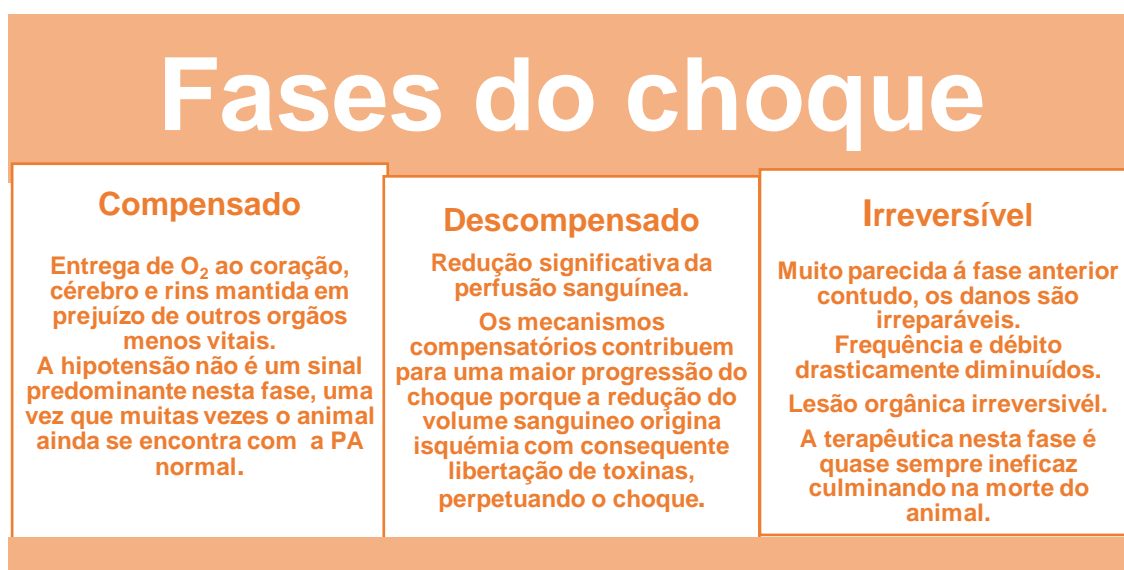


Figura 6. Esquema representativo das diferentes fases do choque (Adaptado de Dourado, 2010)

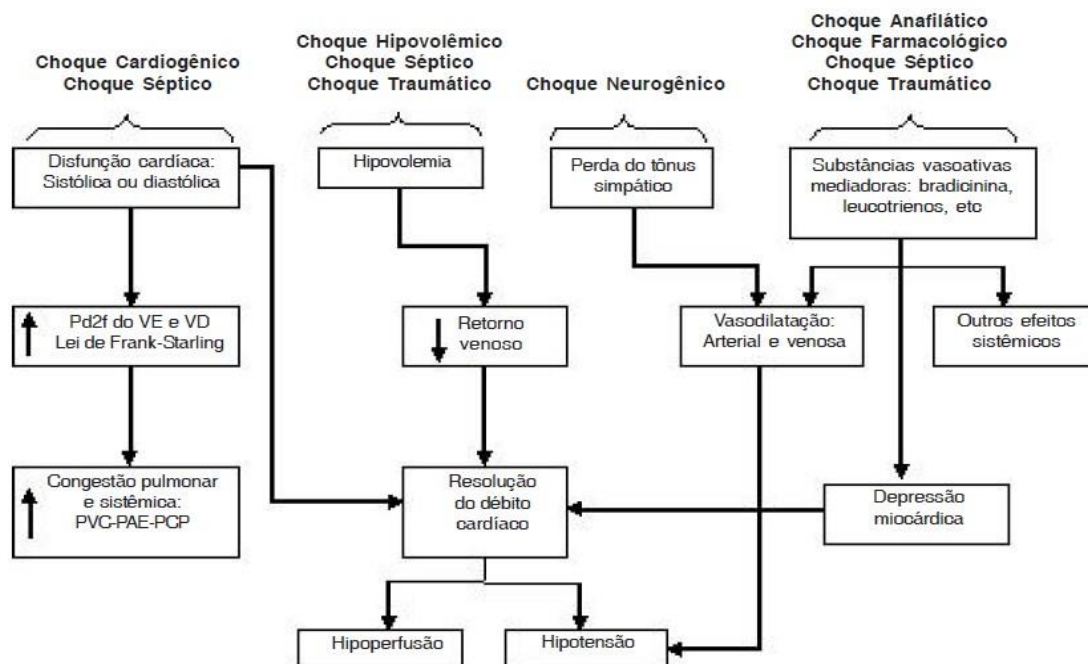


Figura 7. Efeitos fisiopatológicos básicos dos vários tipos de choque. (Adaptado de Vicent *et al.*, 2008). Pd2f – pressão diastólica final; VE – Ventrículo esquerdo; VD – Ventrículo direito; PVC – pressão venosa central; PAE - Pressão atrial esquerda; PCP – Pressão capilar pulmonar.

2.2.2. SINTOMATOLOGIA E EXAME FÍSICO

A sintomatologia do choque hipovolêmico conforme referido na fisiopatogenia, inclui fraqueza, depressão e extremidades frias. Durante o exame físico, os pacientes apresentam comumente as mucosas pálidas, o tempo de repleção capilar (TRC) aumentado, pulso periférico fraco e taquicardia (Fernandes, 2014).

O exame físico é realizado para identificar outros sinais clínicos que não se tenham evidenciado. Deverá, por isso, incluir a palpação de diferentes regiões corporais como o crânio, a coluna vertebral, os membros, procurando possíveis lacerações e hemorragias. Devem ainda ser cuidadosamente palpadas a traqueia e o pescoço para a avaliação de possíveis crepitações (Fernandes, 2014).

2.2.3. AVALIAÇÃO DA CIRCULAÇÃO

A avaliação da hemodinâmica precoce com base em achados físicos, sinais vitais, PVC e débito urinário visa detetar a hipóxia persistente de todos os tecidos (Kunzler, 2014).

Embora alguns parâmetros possam estar alterados devido ao stress, o sistema cardiovascular é avaliado através de:

- Membranas Mucosas (MM);

- TRC;
- DC;
- Pulso sanguíneo;
- Temperatura rectal e das extremidades;
- Estado mental;
- Exploração de possíveis hemorragias (Fernandes, 2014).

2.2.3.1. Membranas mucosas

A avaliação das MM inclui a avaliação da cor das gengivas, contudo, quando estas são de difícil avaliação, pode procurar-se como alternativa avaliar a conjuntiva ocular, vulvar ou peniana. Em condições fisiológicas as membranas apresentam-se pálidas ou brancas em casos de hemorragia (anemia) ou de vasoconstrição, vermelho tijolo com muco, em caso de vasodilatação, hipertermia ou septicemia, cianóticas ou azuladas em caso de hipóxia severa (a ausência de MM azuladas não exclui a existência de hipóxia), e por fim, podem apresentar-se ictéricas ou amarelas em caso de hemólise ou hepatopatia (Jamie *et al.*, 2012; Fernandes, 2014).



Figura 8. Avaliação das membranas mucosas (Adaptado de Jamie *et al.*, 2012; Fernandes, 2014; Anónimo, s/d; Anónimo, 2014; Garcia M, s/d; França M, s/d)

2.2.3.2. Tempo de repleção capilar

A avaliação do tempo de repleção capilar permite fazer uma estimativa da volêmia e do DC. Este é avaliado através da pressão digital sobre a mucosa forçando o leito capilar, observando-se posteriormente o retorno venoso. Este retorno não deverá demorar mais que 1-2 segundos. Em pacientes hipotensos ou com hipovolêmia o TRC está aumentado, sendo que, quando diminuído, sugere uma possível vasodilatação (Jamie *et al.*, 2012; Fernandes, 2014).

2.2.3.3. Débito cardíaco e qualidade do pulso

Estes dois parâmetros deverão, por uma questão de detecção de déficits, ser avaliados em simultâneo. O DC é geralmente medido através da auscultação e a qualidade do pulso através da artéria femoral (normalmente a de eleição). O DC pode fornecer dados acerca do ritmo cardíaco ou da presença de sopro cardíaco. A qualidade do pulso proporciona informação sobre o ritmo, DC, força, simetria e sincronização, informando, deste modo, a quantidade de sangue bombeada para fora do coração por minuto. Idealmente, o pulso cardíaco deverá ser forte e regular. A taquicardia é definida por > 160 batimentos por minuto (bpm) no cão e > 200 bpm no gato (Jamie *et al.*, 2012; Fernandes, 2014).

2.2.3.4. Temperatura

No choque é necessário avaliar a temperatura, visto ser frequente os pacientes apresentarem incapacidade de termorregulação, traduzível pela diminuição da temperatura, designada hipotermia. Os melhores lugares para avaliar a temperatura são as orelhas, patas e membros que por norma, estão quentes, apresentando-se frias quando resultado de vasoconstrição (Jamie *et al.*, 2012; Fernandes, 2014).

Outras causas de hipotermia incluem doenças metabólicas, doenças cardíacas, doenças inflamatórias, doenças infecciosas, golpes de calor, entre outros (Jamie *et al.*, 2012; Fernandes, 2014).

2.2.3.5. Alterações do sistema neurológico

Inicialmente as alterações do sistema neurológico devem ser avaliadas à distância. Se o paciente apresentar alterações neurológicas, são avaliadas as suas respostas a estímulos dolorosos como toque e som (Fernandes, 2014).

Durante a avaliação deste parâmetro devera ser avaliado o estado de consciência do paciente, postura, atividade motora, tamanho pupilar, responsividade da mesma à luz, posição e movimento ocular e resposta à dor superficial e profunda (Jamie *et al.*, 2012; Fernandes, 2014).

No geral, os pacientes podem apresentar estados variados a nível neurológico, podendo ir desde alerta quando se encontra responsivo a estímulos ambientais, depressão quando se encontra prostrado (contudo responde a estímulos ambientais), estupor quando a resposta a estímulos ambientais se encontra diminuída (contudo responde a estímulos dolorosos), comatoso quando há ausência de estímulos ambientais, dolorosos e convulsivos. Estes estados variam consoante o grau de lesão, logo, animais que apresentem lesões cerebrais devem ser monitorizados a cada 30 – 60 minutos (Jamie *et al.*, 2012; Fernandes, 2014).

2.3. CIRCULAÇÃO

2.3.1. MACROCIRCULAÇÃO

A circulação sistémica distribui o fluxo sanguíneo para todos os tecidos, com exceção dos pulmões. É também designada como macrocirculação ou circulação periférica. As funções de maior importância da circulação são o transporte através do sangue de nutrientes, gases, eletrólitos, imunoglobulinas, hormonas e produtos do metabolismo celular (Guyton & Hall, 1996; Engelhardt & Breves, 2005).

A circulação sanguínea é composta por um sistema fechado de vasos sanguíneos ligados entre si. As diferenças morfológicas entre os vasos sanguíneos permitem a sua classificação (Engelhardt & Breves, 2005).

A função das artérias é efetuar o transporte de sangue sob alta pressão aos tecidos e, por esta razão, apresentam uma forte parede vascular promovendo a rápida fluidez do sangue. As arteríolas são pequenos ramos do sistema arterial, e são também os últimos vasos deste sistema que atuam como válvulas de controlo através das quais o sangue é liberado para os capilares. Apresentam paredes musculares

fortes capazes de fechar por completo ou apenas permitir que a arteríola seja dilatada várias vezes de forma a obter capacidade de resposta às necessidades dos tecidos. A função dos capilares é efetuar as trocas de fluidos, nutrientes eletrólitos, hormonas e outras substâncias entre o sangue e o fluido intersticial, apresentando deste modo, paredes finas e permeáveis (Guyton & Hall, 1996).

As vénulas recolhem o sangue dos capilares e vão-se unindo gradualmente em veias progressivamente maiores. Têm como principais funções o transporte do sangue de volta ao coração e o armazenamento de um grande volume de sangue. Pelo facto da pressão venosa ser baixa nas veias, próxima de 0, as suas paredes são finas (Guyton & Hall, 1996; Engelhardt & Breves, 2005).

Quadro 1. Esquema da composição dos vasos sanguíneos (Adaptado de Engelhardt & Breves 2005) * O símbolo + representa a proporção correspondente ao tecido da parede vascular

		Aorta	Artérias	Arteríolas	Capilares	Vénulas e pequenas Veias	Grandes Veias	Veia Cava
Túnica Intima	Endotélio	+	+	+	+	+	+	+
	Fibras Elásticas	++++	+++	+	-	±	+	++
Túnica Muscular	Fibras musculares Lisas	+	+++	++++	-	+	++	++
	Fibras de colagénio	+++	++	+	-	+	++	+++

2.3.2. MICROCIRCULAÇÃO

Define-se microcirculação como uma rede formada por pequenos vasos, ou seja, capilares, arteríolas e vénulas, com diâmetro inferior a 100 µm (Miranda *et al.*, 2013).

A microcirculação é a maior superfície endotelial e de O₂ no corpo, onde são efetuadas as trocas gasosas, deixados os resíduos e feita a troca por nutrientes. Esta é controlada por mediadores locais como o óxido nítrico (NO) e pela pressão parcial de O₂ tissular (pO₂). Deste modo, é o gradiente de pressão e o padrão de resistência que compõem a microcirculação (Kunzler, 2014).

A microcirculação de cada órgão é especificamente organizada face às necessidades especiais do mesmo (Guyton & Hall, 1996). A microcirculação tem como função principal e vital, o fornecimento de O₂ e outros substratos essenciais às células, e, posteriormente, a remoção dos produtos resultantes do seu metabolismo. A nível morfológico, a microcirculação encontra-se organizada de forma a atender às necessidades de cada sistema/órgão em particular. Assim, as arteríolas possuem um diâmetro que pode aumentar várias vezes, já as vénulas possuem um calibre maior e uma camada muscular mais frágil.

Para além da sua função vital, tem também outras funções fisiológicas, tais como, o controlo da resistência vascular, da coagulação sanguínea e dos processos inflamatórios e imunológicos, podendo deste modo associar-se uma falência orgânica (má distribuição do fluxo sanguíneo e hipoxia celular) à falha da função microcirculatória (Dias, 2002; Salgado *et al.*, 2010).

A interrupção desta função dá-se quando ocorrem anomalias microvasculares que se desenvolvem em resposta à hipertensão (Boudier, 2007). Nestes casos, ocorre hipertensão porque, como a PA é o produto entre o DC e a resistência vascular periférica, se a resistência vascular sistémica aumentar, o resultado é o aumento da PA (Fernandes, 2014; Dourado, 2010).

No coração, os danos microvasculares coronários causam isquémia coronária, e no rim, órgão que regula os fluidos corporais, os danos provocados nos glomérulos causam disfunção renal (Boudier, 2007).

São as células endoteliais da túnica íntima dos vasos que desempenham um papel central no sistema de controlo do funcionamento da microcirculação (Miranda *et al.*, 2013).

O estado de homeostasia é mantido pelas células endoteliais e vigiado através do minucioso controlo da agregação plaquetária, da coagulação e da fibrinólise, regulando deste modo a trombose, a fibrinólise microvascular, a adesão e migração leucocitária, o tónus arteriolar, a permeabilidade e o recrutamento capilar, todos estes determinantes do fluxo sanguíneo capilar e por conseguinte, da oferta de O₂ aos tecidos/órgãos (Miranda *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2008).

As células endoteliais são providas da capacidade de perceção das forças mecânicas, isto é, forças de cisalhamento, produzidas pelo fluxo sanguíneo e estímulos locais, tais como, potencial hidrogénico (ph), lactato, concentração tecidual de O₂ e CO₂ e substâncias neuro-humorais. Como resultado desta capacidade de

percepção, o endotélio consegue modular o número de capilares bem perfundidos, ou seja, a densidade capilar funcional por meio de transmissão ascendente e descendente às arteríolas e vénulas, de modo a suprirem as exigências metabólicas (Salgado *et al.*, 2010).

A interação entre os capilares e o meio externo dá-se através de poros capilares que se encontram adaptadas às características de cada tecido, ou seja, no cérebro, por exemplo, as junções entre os capilares são apertadas, de modo a permitir apenas a passagem de água, O₂ e gás carbónico, já no fígado as junções são de maior calibre permitindo assim a passagem de todas as substâncias dissolvidas no plasma, incluindo as proteínas (Dias, 2002).

A regulação do fluxo sanguíneo e conseqüentemente da perfusão tecidual é um processo bastante complexo que abrange a pressão de perfusão capilar, o tónus arteriolar, a hemorreologia e a permeabilidade capilar (Salgado *et al.*, 2010). Este fluxo é efetuado através dos capilares e é realizado de forma intermitente (vasomotricidade), isto é, é feito em função da abertura e fecho dos mesmos, decorrente das contrações intermitentes das meta-arteríolas e dos esfíncteres pré-capilares onde o O₂ nos tecidos se torna o fator determinante (Dias, 2002).

Em condições normais, isto é, aeróbicas a energia celular é formada sob compostos de alta energia (ATP) através de processos como a glicólise, ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa. Já sob condições anaeróbicas apenas a glicólise pode funcionar permitindo que a produção de energia possa continuar em caso de hipóxia celular gerando contudo, um menor número de ATP's por base molar. Sob condições aeróbicas, o metabolismo de 1 mol (unidade de quantidade de substância) de glicose gera 38 mol de ATP, enquanto sob condições anaeróbicas apenas são gerados 2 mols de ATP (Kunzler, 2014).

A glicólise em condições aeróbicas produz o piruvato e consome a nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺), mas, para permitir que o metabolismo continue sob condições anaeróbicas, a célula deverá dispor do piruvato e regenerar o NAD⁺, através da conversão do piruvato em lactato. Esta conversão tem efeitos negativos, visto que a produção de lactato é concomitante com a produção de iões de hidrogénio com conseqüente acidose metabólica (Kunzler, 2014).

2.4. AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO E DA VOLÊMIA

A manutenção da oferta de O_2 às células, atendendo às necessidades metabólicas, isto é, ao requerimento energético, é a função principal do sistema cardiorrespiratório (Silva *et al.*, 2001).

Fisiologicamente, tanto a perfusão como a oferta de O_2 são controladas pela taxa metabólica. Em várias condições patológicas, o sistema cardiorrespiratório poderá ser incapaz de satisfazer as necessidades metabólicas dos tecidos, sendo necessária a manipulação das variáveis que interferem no transporte sistêmico de O_2 (Silva *et al.*, 2001; Neto *et al.*, 2006).

Os pacientes em estado crítico encontram-se em alto risco de hipoperfusão tecidual, estando esta diretamente relacionada com a lesão orgânica e a disfunção de múltiplos órgãos. A monitorização da perfusão sistêmica torna-se indissociável da avaliação hemodinâmica de qualquer animal em estado crítico. Sendo parte integrante e indissociável da avaliação hemodinâmica de todos os pacientes em estado crítico, estando indicada em todos os casos (Neto *et al.*, 2006).

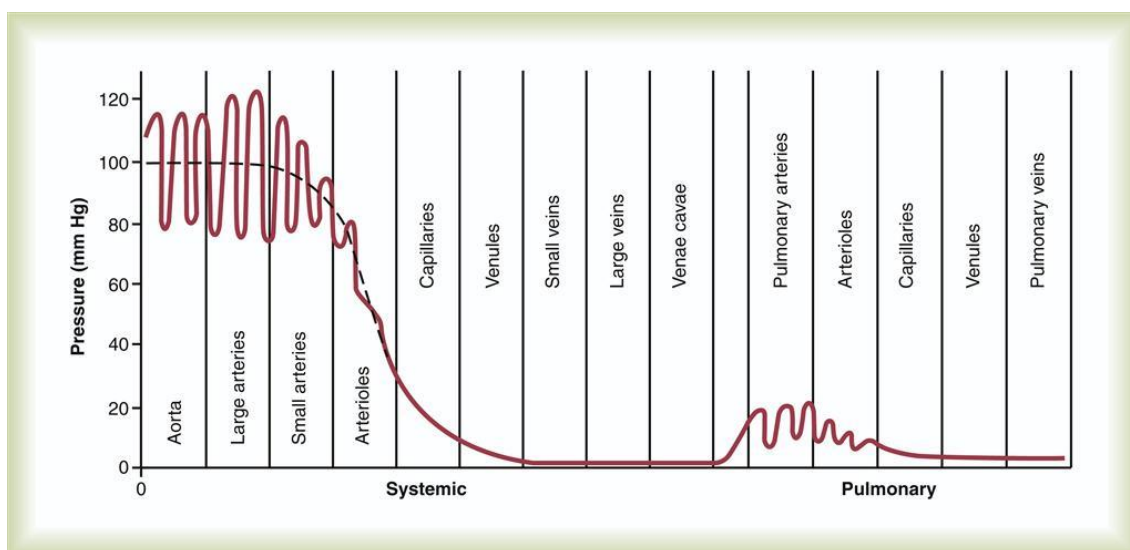


Figura 9. Pressão sanguínea nas diferentes porções do sistema circulatório (Adaptado de Guyton & Hall, 1996)

2.4.1. BIOMARCADORES DE AVALIAÇÃO DE HIOPERFUSÃO

Os marcadores de metabolismo anaeróbio, déficit de bases (DB), níveis de lactato e aumento da extração de O_2 (saturação de O_2 venoso) através da gasometria sanguínea são os melhores indicadores de perfusão sanguínea (Pinheiro, 2013).

Segundo Botteon 2012, a concentração de lactato tem vindo a ser empregada, na Medicina Veterinária (MV), como um indicador da gravidade de doenças. Estudos realizados em cães efetuados através da concentração sanguínea de lactato permitiram identificar uma possível hipoperfusão subjacente, e por conseguinte, avaliar a resposta ao tratamento. Deste modo, a lactatémia elevada está por norma associada a cães em estado crítico ou feridos, e pode ser empregada como um indicador da gravidade da doença e dos resultados do tratamento.

A mensuração da concentração plasmática de lactato permite juntamente com o exame físico, detetar e monitorizar a hipoperfusão, sendo que esta é a causa patológica mais frequente de hiperlactémia em cães e gatos (Fernandes, 2014).

A concentração sanguínea de lactato está dependente da taxa de produção e da taxa de metabolismo do fígado e dos rins. Assim, os níveis de lactato aumentam quando a sua produção por tecidos em hipóxia se sobrepõem à capacidade deste ser eliminado pelo fígado e pelo rim. Deste modo, deverão ser realizadas várias medições, de forma a definir o ritmo de eliminação do mesmo, sendo um bom marcador de reversão do choque (Zavariz *et al.*, 2006; Costa, 2014).

Os níveis do lactato não aumentam nos estádios iniciais de choque, ocorrendo apenas quando há descompensação, pelo que este não é indicador de hipoperfusão ligeira, mas sim de severa (Fernandes, 2014).

O DB é um indicador sensível de choque compensado visto que, mesmo que os sinais clínicos aparentem estar normais, existe acidose metabólica que provoca uma diminuição deste indicador (Costa, 2014).

O aumento da ERO_2 faz com que ocorra uma diminuição de O_2 no sangue venoso, refletindo um estado de hipoperfusão e de hipóxia. Este é um marcador de alta morbidade e mortalidade (Costa, 2014).

2.5. PRESSÃO ARTERIAL

Num paciente em estado crítico, a avaliação deve ser iniciada através do exame minucioso do sistema cardiovascular (Pinheiro, 2013).

A monitorização deste parâmetro num paciente em estado crítico é uma ferramenta de controlo importante no diagnóstico de hipotensão ou hipertensão. A hipotensão arterial é comumente vista em casos de emergência após episódios de

hipovolémia e hemorragia, devendo ser tratada com rapidez, de modo a garantir uma adequada perfusão tecidual (Kunzler, 2014).

O valor ideal de PA é determinado pela necessidade de garantir uma pressão de perfusão adequada, pois uma vez aumentada, irá aumentar o DC e os riscos de danos estruturais no coração e vasos sanguíneos (Martelli, 2012).

A PA é a pressão exercida nas paredes vasculares derivada da ejeção de sangue do ventrículo esquerdo (Kunzler, 2014).

Devido ao contínuo bombeamento de sangue efetuado pelo coração para a aorta, a PA nesta veia é efetivamente alta. Devido ainda a este débito sanguíneo contínuo e pulsátil, é verificada uma flutuação dos valores da pressão sanguínea entre um nível sistólico de 120 mililitros de mercúrio (mmHg) e 80 mmHg, a nível diastólico. A alta pressão verificada inicialmente, ao nível da aorta, vai diminuindo progressivamente à medida que o sangue flui através da circulação sistémica, caindo deste modo para valores próximos do 0 mmHg no final da veia cava, mais precisamente no átrio direito do coração (Guyton & Hall, 1996). Assim, os valores normais de PA são 112 – 192 mmHg de pressão sistólica (PAS) e 56 – 110 mmHg de pressão diastólica (PAD) no cão, e 120-170 de PAS e 70-120 mmHg de PAD no gato (Pinheiro, 2013)

Valores de PA inferiores a 80 mmHg de sistólica e média menor que 60 mmHg implicam uma severa hipoperfusão requerendo rápido tratamento (Pinheiro, 2013).

A PA associada ao DC é o ponto crucial na determinação da pressão sistémica. Assim, a manutenção de um nível adequado de pressão arterial média (PAM) propicia no geral uma adequada perfusão orgânica (Silva *et al.*, 2001).

A PA tem um pico imediatamente a seguir à sístole cardíaca, caindo em seguida para um valor mínimo após a diástole. Assim a diferença entre a pressão sanguínea sistólica e a diastólica é a pressão do pulso que determina a amplitude do pulso palpável (Pinheiro, 2013).

A PAM, não representa a média da PAS e da PAD mas sim a relação proporcional do tempo gasto em cada fase do ciclo cardíaco (Kunzler, 2014).

Este parâmetro pode ser controlado através de dois mecanismos. A regulação neural realizada primariamente pelo sistema nervoso autónomo, associada a barorreceptores e quimiorreceptores, e a regulação humoral que é efetuada pela variedade de substâncias libertadas por diferentes tipos celulares, tais como, as células endoteliais e às células justaglomerulares (Martelli, 2012). No entanto, ao

avaliar este parâmetro é importante ter em atenção o facto de não estar diretamente relacionado com a perfusão, sendo assim uma avaliação da perfusão global, isto é, se um paciente é hipotenso pressupõe-se que o fluxo sanguíneo nos tecidos seja inadequado, levando a uma inadequada perfusão tecidual (Kunzler, 2014).

Segundo Silva *et al.*, (2001), do ponto de vista prático recorre-se às seguintes evidências:

- Quanto maior o tempo de hipotensão arterial maior a possibilidade de desenvolvimento de disfunção orgânica;
- O nível de hipotensão arterial é variável relativamente ao início da hipoperfusão tecidual, sendo que, o estado cardiovascular prévio é um fator determinante do início de hipoperfusão;
- Devem-se ter em conta outros fatores que interferem na PAM, ou seja, a contratilidade miocárdica e a resistência vascular sistêmica;
- A análise da curva de pressão arterial pode fornecer importantes informações acerca do estado hemodinâmico do paciente, como por exemplo, o estreitamento da base da curva que nos dá a indicação de que o paciente se encontra num estado hipovolémico.

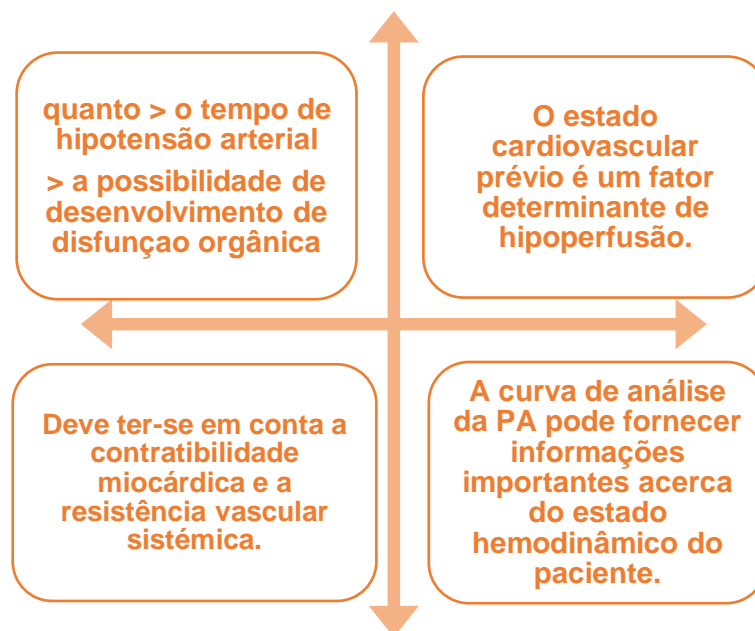


Figura 10. Esquema representativo das evidências da PA na prática (Silva *et al.*, 2001)

A pressão sanguínea é quase sempre medida em milímetros de mercúrio porque o manômetro de mercúrio já é utilizado desde a antiguidade como referência padrão para medir a pressão arterial (Guyton & Hall, 1996).

Quadro 2. Pressão sanguínea média em repouso de animais domésticos (Adaptado de Engelhardt & Breves, 2005)

	Pressão sanguínea sistólica (mmHG)	Pressão sanguínea diastólica (mmHG)	Pressão sanguínea Média (mmHG)
Mamíferos domésticos	120-140	80-95	95-107

A monitorização dos parâmetros que refletem a perfusão sanguínea são essenciais para a corrigir situações de hipoperfusão tissular e prevenção de possível disfunção orgânica. A PA deverá ser medida diariamente principalmente em doentes com instabilidade hemodinâmica (Pinheiro, 2013).

2.6. REPERFUSÃO

A estratégia de ressuscitação mais eficaz envolve a manipulação orientada da pré-carga cardíaca, pós-carga e da contrariabilidade, de forma a alcançar um equilíbrio entre a oferta e as necessidades de O₂ (Kunzler, 2014)

O fluxo de sangue para qualquer região do corpo está dependente da pressão de perfusão (Martelli, 2012).

A regulação e controlo da PA é uma das funções fisiológicas mais complexas e depende de ações integradas dos sistemas cardiovascular, renal, neural e endócrino (Martelli, 2012).

Como referenciado anteriormente, situações de hipovolémia com grande perda de volume podem provocar uma grave acidose metabólica, e deste modo, uma adequada reposição do volume intravascular é crucial para restaurar a perfusão dos órgãos vitais (Zancan, 2014; Sakabe *et al.*, 2004).

Para tomar a decisão do volume a infundir deverão ser avaliados todos os parâmetros hemodinâmicos monitorizados do paciente, reduzindo assim a possibilidade de erro (Ferreira, 2015).

O objetivo desta terapia envolve a monitorização intensiva e manejo da hemodinâmica de pacientes em estado crítico, com alto risco de morbidade e mortalidade, para que se possa manter uma correta homeostasia, de modo a que ocorra uma adequada oxigenação dos tecidos e órgãos para então ser possível

diminuir o risco de hipóxia tecidual que poderia conduzir à morte celular, à disfunção orgânica, à falência do órgão e por fim conseqüentemente, à morte do paciente (Kunzler, 2014).

Para o tratamento do déficit vascular com vista à manutenção de uma adequada perfusão estão disponíveis dois tipos de fluidos, os coloides e os cristaloides (Portela, 2014).

2.7. FLUIDOTERAPIA

Existe ainda uma grande controvérsia no tipo, quantidade e tempo de ressuscitação com fluidos, contudo, a terapia de fluidos é imperativa na estabilização da maioria das formas de choque. Tem como objetivo normalizar o fluxo sanguíneo, devolver o normal aporte de O₂ aos tecidos e trazer a PAM para valores entre os 70 – 90 mmHg ou a PAS para os 90 – 110. No entanto, a superação destes valores de PAM e PAS poderá ter efeitos colaterais (Norcus, 2012; Costa, 2014).

Sendo o restauro do volume circulatório o primeiro passo a dar em caso de choque hipovolémico, os cateteres IV deverão ser colocados numa veia central ou periférica para se dar início à fluidoterapia de ressuscitação. Em gatos e cães pequenos, o tamanho ideal deverá ser de 18 ou 20 Gauge (G). Em cães de grande porte deverão ser colocados múltiplos cateteres de 14 a 18 G. A colocação de um cateter ventral venoso, na jugular, permite uma fluidoterapia a uma taxa de infusão mais elevada, sendo que terá uma entrada mais direta no coração (Fernandes, 2014).

Segundo Myburgh & Mythen (2013), o fluido de ressuscitação ideal deve ser aquele que produz um aumento previsível e sustentado do volume intravascular, que possui uma composição química tão próxima quanto possível do fluido extracelular, que é metabolizado e completamente excretado sem acumulação nos tecidos, que não produz efeitos adversos (metabólicos ou sistémicos) e que seja rentável, em termos de melhorar os resultados do paciente. A seleção do fluido para repor a volémia deverá ser baseada em indicações, contraindicações e possíveis efeitos tóxicos, de modo a maximizar eficácia e minimizar a toxicidade.

O grande objetivo da fluidoterapia é atingir e manter uma perfusão e oxigenação adequada dos órgãos vitais sem aumentar a PAM de forma a não agravar as perdas de sangue, permitindo a formação e estabilização de trombos (Costa, 2014).

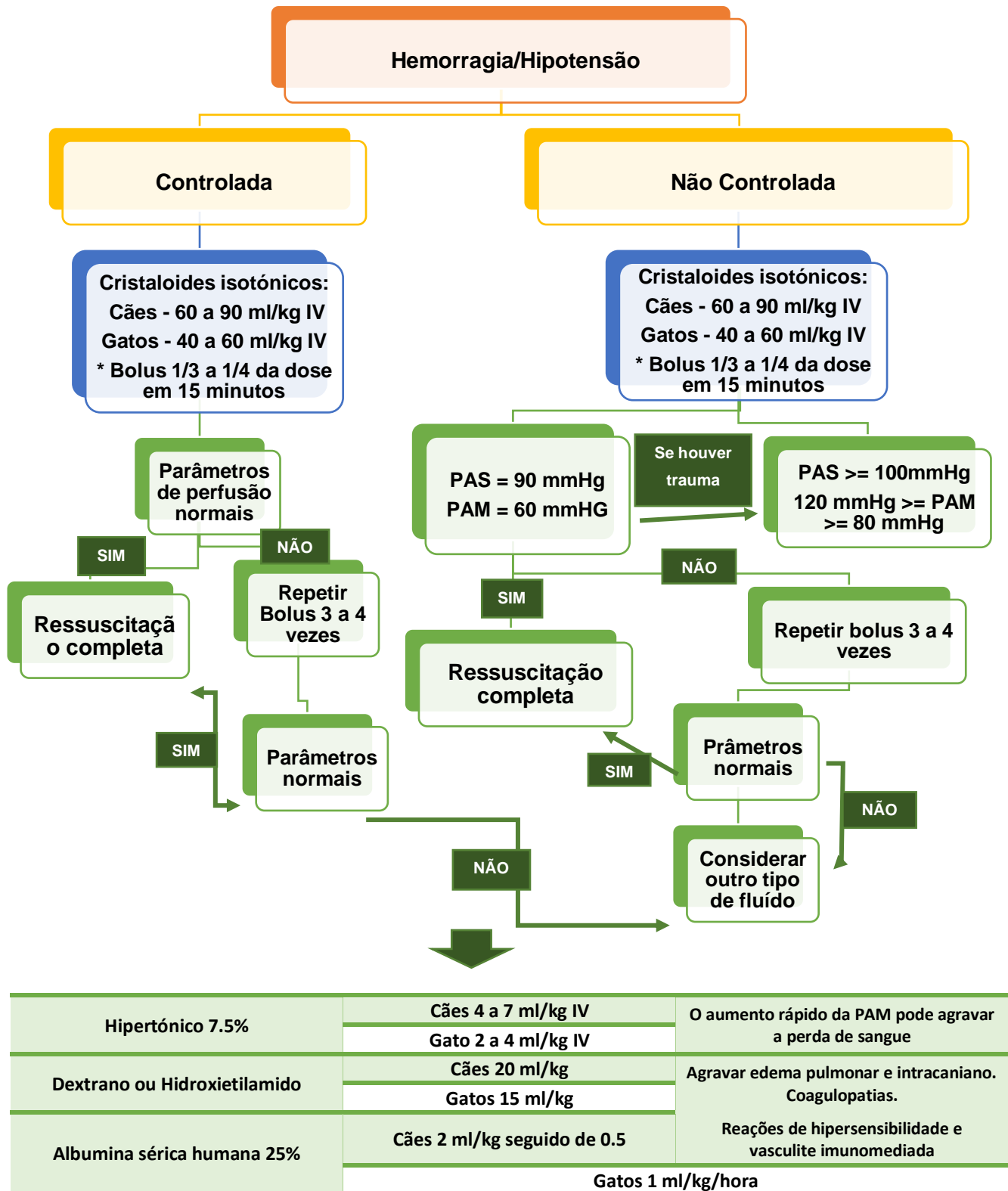


Figura 11. Esquema representativo da fluidoterapia em cães e gatos com hemorragia e hipotensão (Adaptado de Costa, 2014)

2.7.1. COLÓIDES

Os solutos classificados como coloides naturais ou coloides semissintéticos são substâncias constituídas por grandes moléculas ou partículas ultramicroscópicas, não cristalinas. Estas soluções possuem macromoléculas que não têm a capacidade de atravessar o endotélio capilar, permanecendo no espaço intravascular onde exercem o seu efeito expansor (Ferreira, 2015; Zancan, 2014).

Soluções/Características	Albumina		Hidroxietilamido		Dextran		Gelatinas
Concentração	4%, 5%	20%, 25%	6 %, 10% pentatarch	5% hetastarch	10 % Dextran 40	3% Dextran 60 6% Dextran 70	
Peso molecular	69		100-450		40-70		30-35
Osmolaridade (mOsm/L)	300	1.500	300-326		280-324		300-350
Pressão oncótica (mmHg)	19-30	74-120	23-82		20-60		24-42
Expansão plasmática (%)	70-100	200-300	100-160		100-200	80-140	70-100
Duração da expansão plasmática (h)	≤24		≤12	≤4-36	≤4-6	≤8-24	≤4-6

Figura 12. Principais soluções coloides e composição (Adaptado de Corrêa *et al.*, 2015)

Os coloides mais utilizados são a albumina, dextrose e os hidroxietilamidos. A albumina é uma solução coloidal natural que, por sua vez, apresenta um tamanho e peso molecular uniforme. Apesar de se mostrar eficaz na recuperação da perfusão microvascular está associada a um aumento da incidência de lesões a nível renal e pulmonar. No caso dos coloides semissintéticos, as gelatinas, a dextrose e os hidroxietilamidos, o tamanho e o peso molecular não são uniformes (Ferreira, 2015).

A reposição da volémia com soluções coloidais é mais duradoura e requer volumes inferiores, comparando com soluções salinas isotónicas. Esta reposição poderá ser de 1 mililitro (ml) de perda para 1 ml de coloide, proporção que já não se verifica em soluções cristaloides, onde deverá ser de 1:3 até 1:4 (Zancan, 2014). Assim, as principais vantagens da sua utilização prendem-se com a pressão oncótica exercida e, com o fato de não se difundirem para o espaço extravascular, conseguindo deste modo restabelecer o volume intravascular com maior rapidez, de forma mais sustentada e com menores volumes administrados (Portela, 2014).

Esta solução com peso molecular de 130,000 Daltons e grau de substituição de 0,4 é considerada em alguns países europeus como solução padrão ouro para os hidroxietilamidos, por apresentar menores efeitos sobre a coagulação (Barros, 2009).

Globalmente, as soluções de HES são os coloides semissintéticos mais comumente utilizados, particularmente na Europa (Myburgh & Mythen 2013).

2.7.1.1. Albumina

A albumina, coloide natural, é a proteína mais abundante do plasma e é constituída por uma cadeia polipeptídica de 585 aminoácidos com peso molecular de 66,500 Daltons. É produzida a nível hepático e contempla 80% da pressão oncótica do plasma (Miranda *et al.*, 2013). É produzida pelo fracionamento do sangue e é tratada termicamente, visando prevenir a transmissão de vírus patogénicos. É uma solução cara para ser produzida e distribuída, e a sua disponibilidade é limitada em países pouco desenvolvidos (Myburgh & Mythen, 2013).

Esta solução é utilizada em todo o mundo para o tratamento de pacientes graves. A sua utilização pode ser justificada através dos seus efeitos fisiológicos, especialmente pela ligação e transporte de várias substâncias no sangue, pelas suas propriedades antioxidantes, pela modulação de NO e pela sua capacidade de tamponamento (Corrêa *et al.*, 2015).

2.7.1.2. Hidroxietilamido

As soluções de HES, são soluções sintéticas derivadas da amilopectina extraída do milho. São dos expansores coloidais mais utilizados em todo o mundo, maioritariamente devido ao seu baixo custo, em comparação com a albumina (Regalin, 2009; Corrêa *et al.*, 2015).

O HES apresenta vários tipos de solução, sendo cada uma delas caracterizada pelo peso molecular, concentração e grau de substituição (Regalin, 2009).

Para aumentar a solubilidade em água e diminuir a hidrólise pela amílase há uma substituição dos grupos hidroxil pelos hidroxi-etil, ocorrendo esta troca principalmente nos carbonos 2,3 e 6 (Barros, 2009).

Um alto grau de substituição em moléculas de glicose protege contra a hidrólise por amílases não específicas no sangue, prolongando deste modo a expansão intravascular. Não obstante, esta ação aumenta o potencial do HES para se acumular nos tecidos reticuloendoteliais, como a pele (resultando em prurido), fígado e rim (Myburgh & Mythen, 2013).

O HES 130/0,4, coloide de terceira geração e com propriedades oncóticas excelentes, possui um peso molecular específico, determinando assim o tempo em que a solução permanecerá dentro dos vasos. Este coloide apresenta em cada grupo de 10 glicoses, 04 que sofrem hidroxietilação especificamente no carbono 02, sendo denominado de hidroxietilamido de peso molecular 130 kDa e grau de substituição molar 0,4. O HES 130/0,4 possui um alto peso molecular e é hidrolisado rapidamente pela amílase plasmática, mantendo-se deste modo, pouco tempo na corrente sanguínea (cerca de 10 minutos) (Regalin, 2009; Soares *et al.*, 2009).

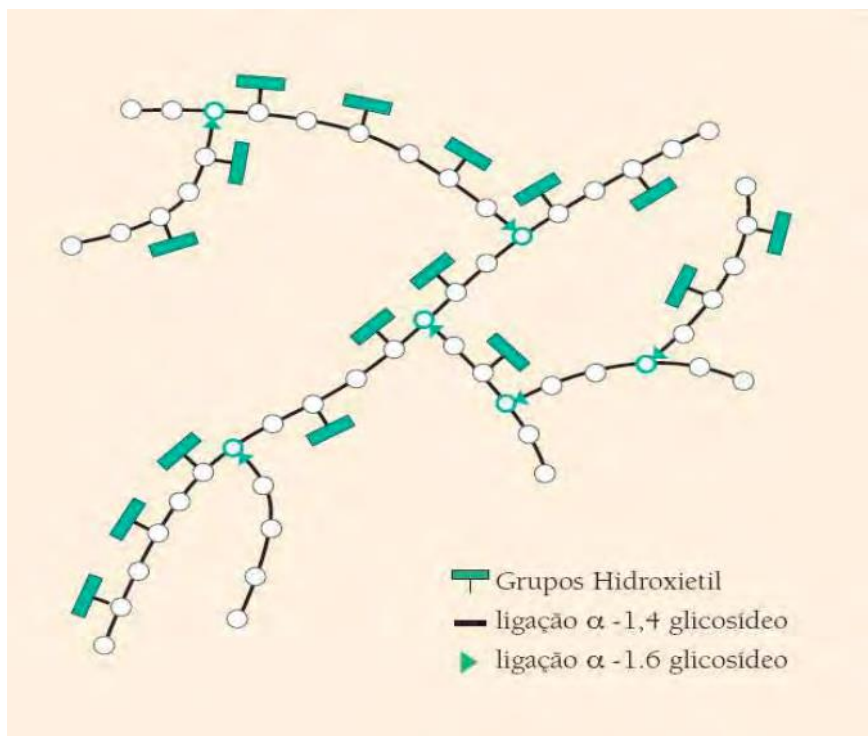


Figura 13. Diagrama esquemático da molécula de hidroxietilamido (Adaptado de Barros JMP, 2009)

2.7.1.3. Dextranas

As dextranas são polímeros de glicose de alto peso molecular onde as suas subunidades estão ligadas através de ligações alfa 1-6. São biossintetizadas através da conversão de sacarose em dextrose por hidrólise ácida e separadas por fracionamento repetido por etanol para a obtenção de um produto com menor peso molecular. Estão disponíveis para venda dois tipos de dextrose, distinguindo-se apenas pelo peso molecular, o dextran 40 a 10% e, o dextran 70 a 6% (Júnior *et al.*, s/d).

Comparativamente com o HES, as dextranas permanecem menos tempo no plasma. Este coloide sintético apresenta algumas desvantagens, tais como o fato de interagirem com os glóbulos vermelhos podendo dificultar a realização de provas cruzadas para a apuração do tipo de sangue do paciente, sendo que em caso de possibilidade de transfusão sanguínea, a tipificação deverá ser realizada antes da administração de soluções com dextranos que, por sua vez, interagem com as plaquetas, aumentando o tempo de coagulação. À semelhança do HES, podem provocar reações anafiláticas, e, no caso do dextran 70 existe a possibilidade de promover desmarginação dos neutrófilos, diminuindo a contagem dos mesmos (Pina, 2014).

2.7.2. CRISTALÓIDES

Os cristaloides são soluções compostas por água e pequenas partículas iônicas e não iônicas. São soluções que contém glicose ou cloreto de sódio que, em alguns casos, poderão conter outros componentes como potássio ou cálcio, e, podem também usar tampões como o lactato ou acetato para se assemelharem ao plasma (Corrêa *et al.*, 2015; Sakabe *et al.*, 2004).

Em relação com o plasma humano, as soluções cristaloides podem ser hipotônicas, isotônicas e hipertônicas (Corrêa *et al.*, 2015).

Nas soluções isotônicas, a distribuição volêmica extracelular encontra-se dividida em 25% intravascular (que permanece no espaço intravascular após 30 minutos) e 75% intersticial. Nas soluções hipertônicas, é promovida a mudança de água do espaço intracelular para o espaço extracelular (Sakabe *et al.*, 2004).

Os cristaloides apresentam como potenciais efeitos deletérios, a sobrehidratação, a hemodiluição e o edema intersticial. A sobrehidratação tem como

sinais, tremores, inquietações, secreções nasais serosas, taquicardia, taquipneia, tosse, poliúria, e, mais tarde quemose, exoftalmia, dispneia, crepitação e edema pulmonar, ascite, diarreia e vômito, hemodiluição e edema intersticial (Fernandes, 2014).

Dentro dos cristaloides mais utilizados estão o LR, a solução salina a 0,9%, o Normosol® –R e o Plasmalyte® A (Zancan, 2014; Fernandes, 2014).

Segundo Miranda *et al.*, (2013), os cristaloides estão indicados em:

- Desidratação com perda moderada de eletrólitos (vômito; diarreia; poliúria; sudção excessiva);
- Síndromes hipovolêmicas (hemorragias; queimaduras; choque cirúrgico);
- Alcalose débil.

Soluções/Características	Osmolaridade	PH	Sódio	Potássio	Cálcio	Magnésio	Tampão
Plasma	290	7.4	103	4	4	2	Bicarbonato (24)
Solução Salina (0,9% NaCl)	308	5.7	154	0	0	0	0
Lactato de Ringer	273	6.5	109	4	3	0	Lactato (28)
Lactato de Acetato	275	6.7	109	4	3	0	Acetato (28)
Plasma-Lyte	295	7.4	98	5	0	3	Acetato (28) Gluconato (23)

Figura 14. Principais soluções cristaloides e composição (Adaptado de Corrêa *et al.*, 2015)

2.7.2.1. Lactato de ringer

O LR é atualmente a solução mais utilizada na reposição da volémia de pacientes submetidos a cirurgias devido ao seu baixo custo e segurança. Para além destas, apresenta uma menor incidência de acidose hiperclorêmica. No entanto, não é de facto a melhor solução para efetuar esta reposição, uma vez que apresenta uma grande perda para o espaço intersticial e intracelular, levando a uma consequente administração de um maior volume de fluido, podendo deste modo apresentar riscos associados. Assim, em grandes administrações de RL, existe a possibilidade de formação de edema intersticial e endotelial, resultando da diminuição da pressão oncótica coloidal intersticial, podendo resultar numa diminuição da perfusão capilar e da tensão tecidual de O₂ (Barros, 2009).

Quadro 3. Vantagens e desvantagens das soluções (Adaptado de Barros, 2009)

Solução	Vantagem	Desvantagem
Colóide	Pequeno volume de infusão; Menos edema periférico; Aumento sustentado do volume plasmático.	Maior custo; Coagulopatia (Dextran> Hes); Edema pulmonar; Diminuição da taxa de filtração glomerular; Diurese osmótica.
Cristalóide	Menor custo; Maior fluxo urinário; Reposição do volume intersticial.	Aumento transitório do volume intravascular; Melhora transitória da hemodinâmica; Edema periférico; Edema pulmonar.

2.8. RIM

O rim é um órgão formado por uma densa cápsula de tecido conjuntivo, uma zona cortical e uma zona medular. Este órgão apresenta forma de feijão, com dois bordos, um convexo e outro côncavo, no qual se localiza o hilo. É possuidor de cálices que no ponto de união formam a pélvis renal, que é a parte superior dilatada do ureter (Junqueira & Carneiro, 1996).

2.8.1. FISILOGIA RENAL

A unidade funcional do rim é o nefrônio, que é formado por uma parte dilatada, o corpúsculo de Malpighi, pelo túbulo contornado proximal (TCP) e distal (TCD), e pela ansa de Henle (Junqueira & Carneiro, 1996).

Apresenta como funções, excreção e reabsorção de substâncias, regulação do equilíbrio hídrico e eletrolítico e regulação do equilíbrio ácido - básico (Engelhardt & Breves, 2005).

Em condições fisiológicas normais, os rins recebem cerca de 25% do DC, o córtex recebe a maior parte deste fluxo enquanto a medula recebe apenas 10% do seu total (Charpiot, 2012).

Em casos de alterações de PA, a autorregulação renal depende de dois fatores, de uma rápida resposta miogênica e do feedback tuboglomerular (Flemming et al., 2000).

2.8.2. RIM E CONTROLO DA PRESSÃO ARTERIAL

A regulação e controlo da pressão arterial a longo prazo tem uma relação direta com a capacidade de eliminação suficiente de sódio, por parte dos rins, de modo a manter um balanço de iões numa faixa normal (Martelli, 2012).

2.8.3. ALTERAÇÕES RENAS

A oxigenação medular renal é regulada por diversos fatores que controlam a relação entre a oferta e o consumo de O₂. A falha nesta regulação proporcionará uma possível hipóxia com conseqüente necrose tubular aguda (NTA), focando-se maioritariamente no ramo ascendente grosso ou nos segmentos proximais. Uma NTA poderá ser induzida através da perda de 40% a 50% de fluxo sanguíneo renal (Santos *et al.*, 2006). É de salientar o facto de que a redistribuição do fluxo sanguíneo no rim ocorre em pressões inferiores a 50 mmHg (Oliveira *et al.*, 2015).

Durante o choque hemorrágico ocorre vasoconstrição que diminui a filtração glomerular e agrava a acidose. Esta estabelece-se na face adrenérgica, sendo proporcional ao grau de hipotensão (Gaija, 2004). Esta vasoconstrição renal pode persistir mesmo após o estabelecimento da pressão arterial sistémica normal (Oliveira *et al.*, 2015).

Os rins podem ser severamente afetados pelo déficit de perfusão levando ao desenvolvimento de IRA com ocorrência de oligúria ou anúria e distúrbios eletrolíticos (Gaija, 2004).

A oligúria resultante do choque obriga ao doseamento de ureia e creatinina a fim de diagnosticar, precocemente uma possível IRA, e a poliúria também pode ocorrer devido à incapacidade de concentração urinária conseqüente à isquémia da medula renal. A NTA, a glomerulonefrite, a necrose cortical renal e a nefrite intersticial são os principais responsáveis pela insuficiência renal, resultantes da hipoperfusão renal (Dourado, 2010).

O débito urinário deve ser monitorizado em doentes clínicos graves pois uma diminuição deste poderá indicar má perfusão renal, secreção inapropriada da hormona antidiurética ou IRA (Gaija, 2004).

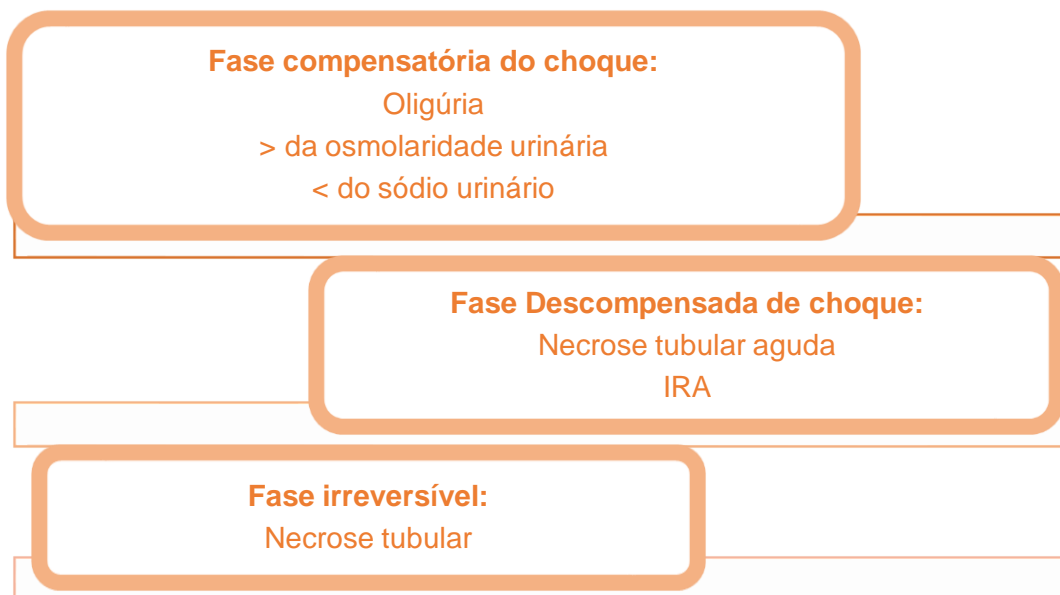


Figura 15. Fases do choque a nível renal. (Adaptado de Dourado, 2010)

2.9. INSUFECIÊNCIA RENAL AGUDA

O rim é um órgão extremamente sensível à hipoperfusão que apresenta IRA resultante de hipotensão grave como principal complicação (Fleming *et al.*, 2000).

Estes órgãos são responsáveis pelo equilíbrio de água e eletrólitos no plasma através da filtração na membrana glomerular e, de seguida, da reabsorção desse filtrado a partir do epitélio tubular renal. A perda deste processo de filtração e reabsorção tubular na IRA é o resultado consequente de alterações renais adaptativas que inicialmente atuam na preservação da perfusão renal e filtração glomerular. No entanto, quando estes processos adaptativos se esgotam, os mecanismos falham e ocorre uma disfunção renal (Fuhrman & Zimmerman, 2011).

A IRA é caracterizada pela redução abrupta e persistente da função renal que resulta na incapacidade dos rins em exercerem as suas funções básicas de excreção e manutenção da homeostase hidroeletrolítica do organismo, isto é, resulta numa diminuição da filtração glomerular e consequente acumulação de resíduos nitrogenados, tais como ureia nitrogenada sanguínea (BUN) e creatinina (Araraki, 2003; Schor *et al.*, 2000; Shibuya, 2006).

Como uma das funções mais importantes do rim é a filtração e a excreção de resíduos nitrogenados do sangue, as medições de ureia sanguínea elevada e da creatinina servem como indicadores de diminuição da função renal (Basile *et al.*, 2012).

A isquemia é uma das causas mais comuns de IRA e está relacionada com grandes cirurgias, traumas, hipovolémia severa, sepsis e queimaduras (Shibuya, 2006).

2.9.1. Etiologia

A etiologia desta condição é múltipla, no entanto, é uma situação que acarreta uma elevada morbidade/mortalidade (Araraki, 2003).

A IRA isquêmica é erradamente denominada como NTA visto que a progressão da mesma se deve à perda de função das células epiteliais tubulares devido a um processo de deleção ou morte celular. É uma condição que se desenvolve após a diminuição total ou parcial, súbita ou transitória do fluxo sanguíneo renal e pode ter várias causas, das quais são exemplo, o choque, a sepsis, as cirurgias de grande porte, a hipovolémia e o transplante renal (Charpiot, 2011; Feitosa *et al.*, 2005).

A disfunção tubular é responsável pela manutenção da insuficiência após o insulto. Os mecanismos tubulares envolvidos na fisiopatologia são a obstrução tubular, associada ao aumento da pressão intratubular, e o vazamento do filtrado tubular para o interstício renal (Shibuya, 2006).

Clinicamente pode ser agrupada em três etiologias primárias: pré-renal, renal e pós-renal (Basile *et al.*, 2012). No entanto, tem sido convencionalmente classificada como uma falência pré-renal, denotando uma alteração na circulação sistêmica que, conseqüentemente, incita a hipoperfusão renal (Lote *et al.*, 1996).

As causas de azotemia pré-renal incluem hipovolémia, resultante de situações clínicas como hemorragia, vômitos ou diarreia, queimaduras, sudorese excessiva, perdas renais, DC diminuído, resultado de insuficiência cardíaca congestiva, diminuição da resistência vascular, sepsis, medicamentos vasodilatadores, medicamentos vasoconstritores, entre outros (Basile *et al.*, 2012).

A resposta normal dos rins a condições pré-renais é concentrar a urina ao máximo e reabsorver avidamente o sódio de forma a manter/aumentar o volume

intravascular com fim a normalizar a perfusão renal (basile *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2003).

Em situações clínicas classificadas como sendo de etiologia renal, incluem-se todas as formas de lesões ao parênquima renal, como as causas hemodinâmicas (politraumatismos, hemorragias, choque séptico, reações a transfusão, hemorragia pós-parto, pancreatite, gastroenterite), as causas nefrotóxicas, as doenças glomerulares e as vasculares e as nefrites intersticiais agudas. Nestes casos, a NTA é responsável por mais de 50% dos casos (Costa *et al.*, 2003).

Situações classificadas como de etiologia pós-renal, menos frequentes, incluem situações de obstrução das vias urinárias, onde a sua reversibilidade está relacionada com o tempo de duração da obstrução (Costa *et al.*, 2003).

2.9.2. Lesão hipoperfusão/reperfusão

A hipoperfusão renal é uma das causas mais frequentes de IRA que tem como via final a morte das células tubulares, sendo estas o principal local de lesão renal, como já referenciado (ARAKAKI, 2003; Soares *et al.*, 2015).

Como uma das funções mais importantes do rim é a filtração e a excreção de resíduos nitrogenados do sangue, as medições de ureia sanguínea elevada e da creatinina servem como indicadores de diminuição da função renal (Basile *et al.*, 2012).

Em situação de hipoperfusão/isquémia, o balanço de O₂ é mantido através da redução do ritmo de filtração glomerular (RFG) e transporte de solutos. Este mecanismo de proteção tem como efeitos adversos, a produção de radicais livres que, por sua vez, vão diminuir mais o fluxo sanguíneo renal (FSR) na medula renal e aumentar a atividade da porção medular do segmento espesso do ramo ascendente da ansa de Henle. Devido a este mecanismo, a congestão vascular agrava a hipóxia presente nesta região, causando lesão e até mesmo a morte celular nos segmentos tubulares vulneráveis (Charpiot, 2011).

A taxa de filtração glomerular é o produto da taxa de filtração do nefrônio e do número de nefrônios a funcionar, esta taxa é definida pelas forças de starling (forças hidrostáticas e oncóticas) dos capilares glomerulares e das propriedades da parede glomerular (Fuhrman & Zimmerman, 2011).

A filtração glomerular depende da perfusão renal adequada e, visto que os rins recebem cerca de 25% do DC total o fluxo sanguíneo a nível renal é determinado pela PAS e pela resistência vascular renal (Araraki, 2003).

A forma de lesão renal, como já referido anteriormente, é acompanhada por oligúria e resulta de alterações da perfusão renal, após um período de hipóxia, hipotensão, disfunção cardíaca ou qualquer disfunção que comprometa a estabilidade hemodinâmica, diminuição do volume ou ambos os estados (Araraki, 2003).

Durante o período de isquemia renal, para além da vasoconstrição renal, ocorre uma resposta inflamatória onde são libertadas diversas citocinas pelos neutrófilos (Soares, 2015). Durante o processo vasoconstrição renal intensa e persistente, o fluxo sanguíneo renal reduz-se em 50% do valor que é normal, sendo que esta diminuição não é uniforme, tornando-se mais proeminente na faixa externa da zona externa da medula renal (Charpiot, 2011).

As reduções do DC e do volume intravascular efetivo são acompanhadas pelo aumento da atividade do sistema nervoso simpático, do sistema renina-angiotensina-aldosterona e da vasopressina circulante. Os sistemas neurais sinalizam o rim para que aumentem a reabsorção de sódio e água, de forma a restaurar o volume intravascular e aumentar o DC (Fuhrman & Zimmerman, 2011).

O mecanismo homeostático do rim, por vasoconstrição arteriolar aferente e vasodilatação arteriolar eferente diminuem a filtração glomerular do rim. Contudo, estes mecanismos homeostáticos não se mantêm sem limitações (Araraki, 2003).

De forma sucinta, a lesão renal resulta de um desequilíbrio generalizado ou localizado entre a entrega de O₂ e nutrientes e a remoção de resíduos e produtos resultantes do metabolismo das células do rim. Desta incompatibilidade resulta lesão epitelial tubular e, dependendo da gravidade, as células poderão sofrer morte por necrose ou por apoptose (Bonventre *et al.*, 2011).

Quando o período de privação de O₂ não se prolonga ao ponto de desencadear uma lesão irreversível, a reperfusão poderá salvar o tecido. No entanto, dependendo do tempo de isquémia, a reintrodução de O₂ poderá causar lesão adicional resultante em parte da produção de espécies reativas de O₂ (Souza, 2018).

2.10. APOPTOSE

A manutenção da integridade e homeostase de organismos multicelulares requer a atuação perfeita de diversos mecanismos celulares e moleculares envolvidos, do qual faz parte a morte celular programada (Ferreira *et al.*, 2010).

É um processo ativo que necessita gasto de energia, sendo que uma diminuição drástica nos fosfatos de alta energia (ATP), durante um período de isquemia, prevê uma lesão irreversível. No entanto, uma diminuição menos severa pode resultar apenas numa extensa morte celular programada (Pina, 2014; Benetone, 2005).

A apoptose foi originalmente descrita por Kerr *et al.* em 1972, mas só mais tarde em 1987 é que foi descrita no rim, aquando a descoberta de uma patogénese túbulo-intersticial renal ocorrida após uma obstrução ureteral unilateral. Existem muitos relatos dos resultados positivos ou negativos que este processo provoca a nível renal e dos mecanismos que induzem ou regulam a apoptose em vários tipos de células (Hughes *et al.*, 2007).

A apoptose é um fenómeno de morte celular programada que ocorre individualmente, uma vez que morte de uma célula não leva à morte de outras células e que geralmente não estimula respostas inflamatórias (Melanie *et al.*, 2015; Grivicich *et al.*, 2007).

A morte celular programada ocorre nas mais diversas situações, induzida por diversos fatores que ativam moléculas pró-apoptóticas, entre elas, a organogénese e a hematopoiese normal e patológica que ocorre na reposição fisiológica de alguns tecidos, na atrofia de órgãos e metamorfose, na resposta inflamatória e na eliminação de células após danos celulares por agentes genotóxicos (Grivicich *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2010).

A apoptose tem um papel tanto benéfico como prejudicial na fisiopatologia renal. Facilita a modelagem tecidual durante a morfogénese e o desenvolvimento renal e atua como um equilíbrio para a mitose na homeostase normal do tecido renal ao longo da vida do organismo. A apoptose é também fundamental na reversão da hiperplasia ou hiperproliferação renal e pode ajudar a controlar a infiltração de células inflamatórias em inflamações de carácter agudo ou crónico. Este processo de morte programada pode ainda ser particularmente proeminente durante a lesão renal aguda, ocorrendo também na doença renal crónica progressiva, como por exemplo em

mudanças associadas ao envelhecimento renal normal, doenças relacionadas com a idade, hipertensão e diabetes do tipo 2 (Hughes *et al.*, 2007).

A apoptose participa em vários processos patológicos como o cancro, entre eles, os cancros renais, onde ocorre espontaneamente ou em resposta à quimioterapia citotóxica, imunoterapia ou irradiação (Hughes *et al.*, 2007).

A apoptose é um processo controlado que mantém a integridade da membrana celular e requer a utilização de ATP, sendo que o que difere a apoptose e a necrose é facto da necrose ser sempre patológica, acompanhada por um processo inflamatório e por só se instalar quando existe uma depleção total de ATP (Benetone, 2005; Ferronato, 2014).

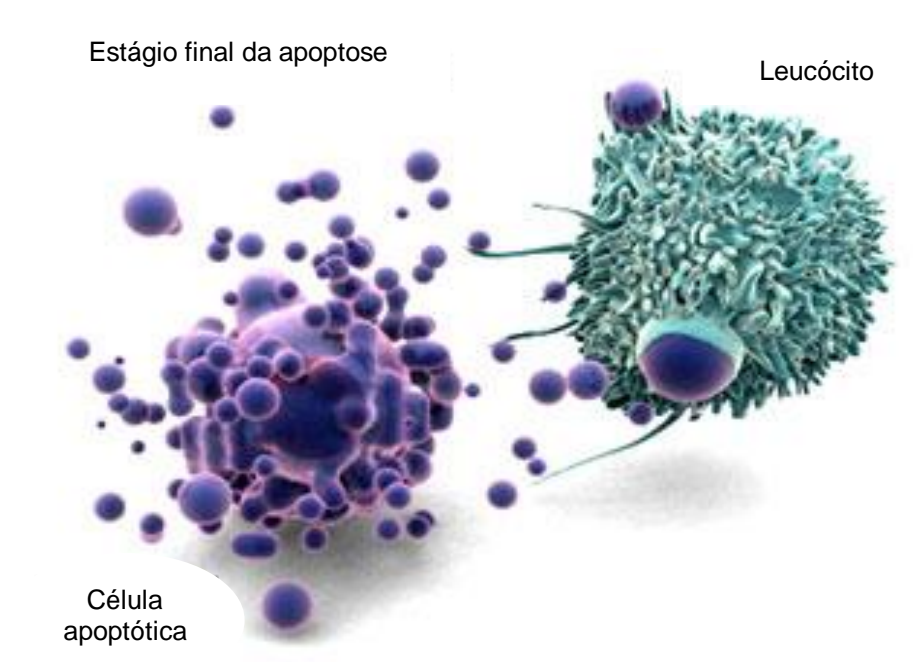


Figura 16. Célula em apoptose (Adaptado de Anónimo, 2013)

2.10.1. Morfologia da apoptose

A suscetibilidade de uma célula à apoptose é influenciada pelo ambiente extracelular, bem como pela expressão e atividade de proteínas intracelulares que são reguladoras do fenómeno apoptótico (Alves *et al.*, 2004).

As características morfológicas e ultraestruturais presentes na apoptose incluem, a retração celular, a perda de aderência à matriz extracelular e às células

vizinhas, a condensação e fragmentação da cromatina nuclear, a condensação e formação de prolongamentos nucleares e celulares (blebs) e, por fim, a formação de corpos apoptóticos ligados à membrana, com organelas preservadas e fragmentos nucleares ocasionais, os quais podem ser fagocitados por macrófagos residentes, visto serem considerados os primeiros passos para a identificação deste processo (Hughes *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2010).

Por norma, as organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção das mitocôndrias que poderão apresentar uma rutura da membrana externa (Grivicich *et al.*, 2007).

Os prolongamentos das membranas celulares aumentam de número e tamanho, e rompem à medida que se vai desenvolvendo o processo de apoptose originando estruturas envoltas por membrana celular e com conteúdo celular. Estas estruturas são denominadas por corpos apoptóticos (Grivicich *et al.*, 2007).

Neste mecanismo, as células são induzidas à morte pela ativação de um sistema de morte celular rigorosamente controlado por fatores genéticos e bioquímicos que envolve a participação de moléculas pró-apoptóticas (Fas e Fas-L, Bax, Caspases 2,3,6,7,8 e 9), capazes de provocar alterações morfológicas e funcionais drásticas. Neste processo a membrana plasmática celular permanece íntegra, sofrendo contudo, alterações estruturais como a distribuição de fosfatidilserina na camada externa da membrana. Esta alteração, por ser um sinalizador de reconhecimento para os fagócitos, faz com que a célula seja rapidamente removida, sem que exista extravasamento de conteúdo citoplasmático, evitando, deste modo, uma possível resposta inflamatória (Ferreira *et al.*, 2010).

As alterações morfológicas causadas são o resultado final da ativação das caspases (proteases aspartato-específicas dependentes de cisteína), sendo que, independentemente do agente indutor deste processo, as alterações vão acabar por ser as mesmas. A ação das caspases representa, deste modo, uma via final comum que opera em todas as células programadas para morrer (Marinho, 2013).

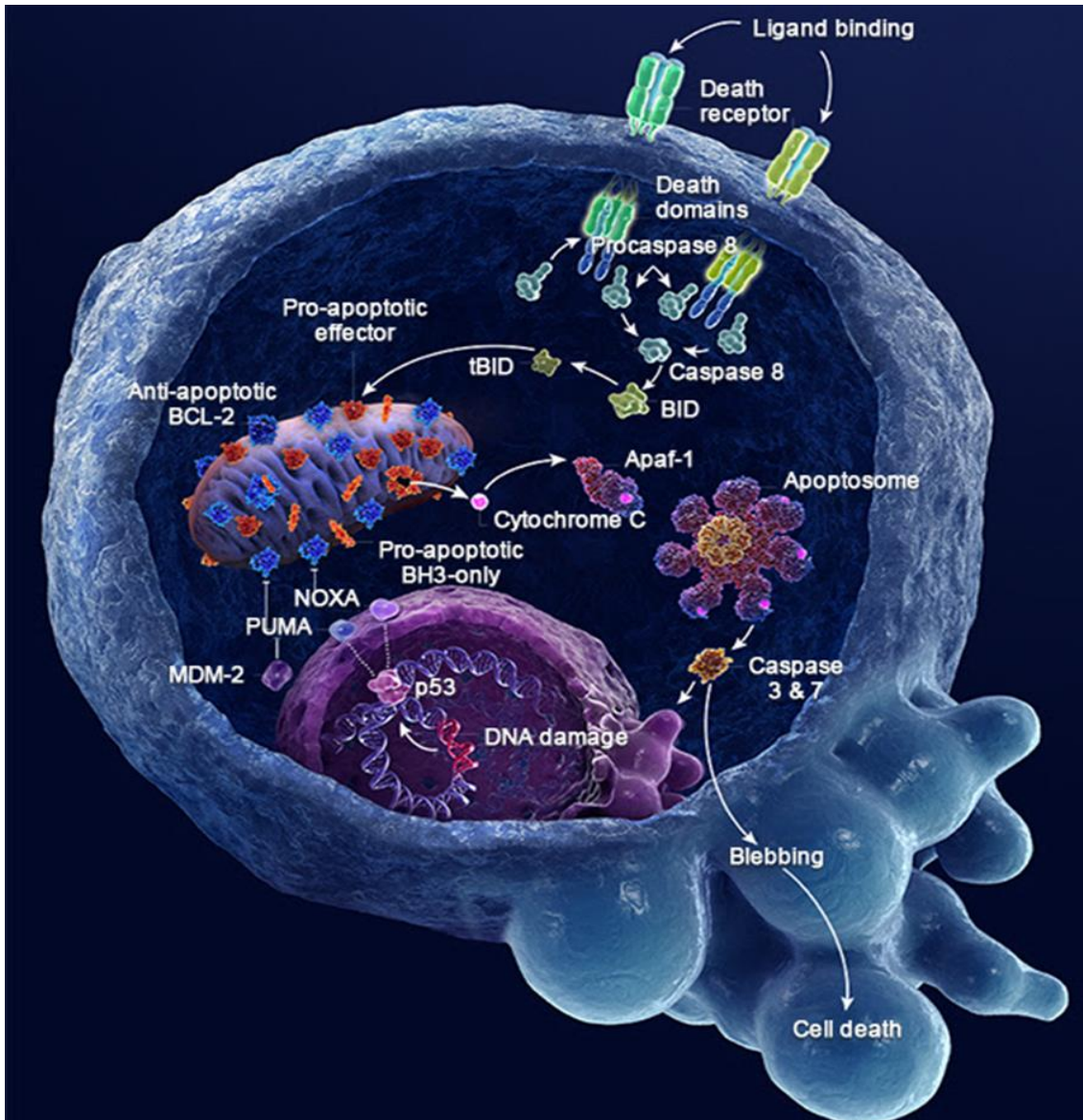


Figura 17. Figura representativa do processo de morte celular programada (Adaptado de <https://www.bioncology.com/pathways/cancer-tumor-targets/bcl-2/bcl-2-dysregulation.html>)

2.10.2. Caspases

As caspases são sintetizadas como precursores inativos denominados de zimogénios que, após um sinal de morte celular, ativam por clivagem proteolítica (Grivicich *et al.*, 2007).

Estas enzimas pertencem à família das cisteínas proteases (denominação que advém possuírem uma cisteína no sítio ativo) que detêm a capacidade de reconhecimento e clivagem de substratos que contenham resíduos de aspartato. No humano foram identificadas mais de 14 tipos de caspases, contudo, nem todas

apresentam propriedades pró-apoptóticas. As caspases envolvidas neste processo são, a 3, 6, 7, 8, 9 e 10. Dependendo da fase em que participam durante o processo de apoptose, as caspases podem ser denominadas de iniciadoras, caspases 8 e 10, ou executoras, caspases 3 e 7 (Ferreira *et al.*, 2010; Grivicich *et al.*, 2007).

2.10.3. Vias de ativação da apoptose

A apoptose pode ser ativada por estímulos externos, via ativação de recetores específicos presentes na superfície celular, denominados de recetores de morte (via extrínseca) ou por via intrínseca, mitocondrial (Ferreira *et al.*, 2010).

A via intrínseca ou mitocondrial é ativada por stress intracelular ou extracelular, como a privação de fatores de crescimento, danos no ADN, hipóxia ou ativação de oncogenes. Os sinais responsivos a estes insultos convergem principalmente para a mitocôndria (Grivicich *et al.*, 2007).

Os sinais produzidos nesta via são iniciados na mitocôndria e atuam diretamente nos alvos do interior da célula (Paiva, 2014). Em resposta, a mitocôndria sofre modificações de potencial de membrana interna, de permeabilidade de membrana e aumento de densidade da matriz. Estas modificações mitocondriais podem ser cruciais para o disparo de morte celular, podendo facilitar a translocação de proteínas mitocondriais, o bloqueio na síntese de ATP e o aumento da produção de espécies reativas de O₂ que, por sua vez, desencadeia a oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, além de contribuir para ativação das caspases 9 e 3 (Ferreira *et al.*, 2010).

O desarranjo mitocondrial desencadeado pode facilitar ainda a libertação do citocromo c para o citoplasma, formando um complexo de ativação associado à apoptose e à caspase 9, que promove a clivagem da pro-caspase 9, libertando em seguida a caspase 9 ativada que, por sua vez, possui a capacidade de ativação da caspase 3 que vai desencadear todo o processo de apoptose (Ferreira *et al.*, 2010).

O processo de morte celular programada por esta via é controlado por proteínas da família Bcl-2 (B-cell lymphoma 2). Estas proteínas são reguladas por p53 (proteína supressora tumoral) que controla a integridade do genoma frente a danos celulares, como a hipóxia, regulando deste modo a expressão de proteínas anti ou pró-apoptóticas. Estas proteínas têm como função promover ou abortar o processo de

apoptose e possuem ainda a função de regular a libertação do citocromo c (Marinho, 2013; Pimenta *et al.*, 2013).

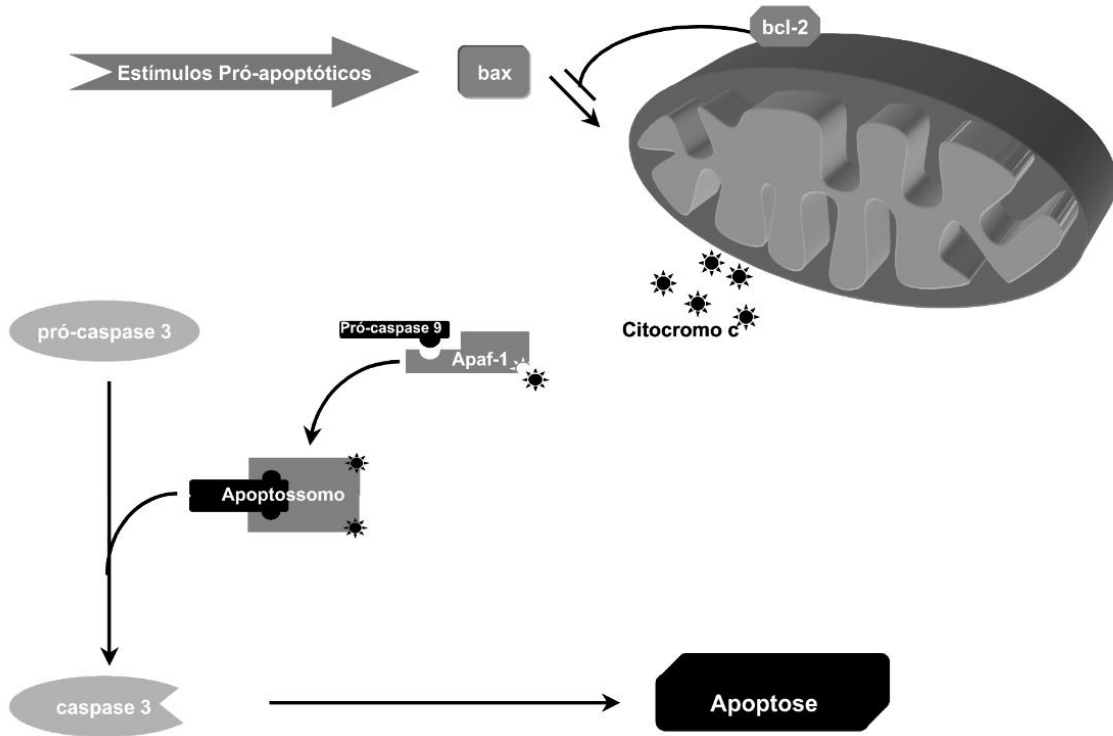


Figura 18. Via de ativação intrínseca do processo de apoptose. (Adaptado de Grivicich *et al.*, 2007)

A via extrínseca é responsável pela eliminação de células indesejadas durante o desenvolvimento, maturação do sistema imune e remoção de tumores, sendo mediada pelo sistema imune. Esta via envolve interações mediadas por recetores transmembranares e é desencadeada pela interação de ligantes específicos a grupos de recetores de origem comum pertencentes à família do fator de necrose tumoral (TNF), capazes de provocar a ativação da caspase 3 e, conseqüentemente, morte celular. Membros da família TNF compartilham domínios extracelulares ricos em cisteínas e possuem no citoplasma o “domínio de morte” DD (Death domain) que, por sua vez, leva os sinais da superfície de membrana para a via de sinalização intracelular (Marinho, 2013).

O domínio de morte desempenha um papel crítico na transmissão do sinal de morte da superfície da célula para as vias de sinalização intracelular. Até à data, os

ligantes e os recetores melhor caracterizados incluem o FASL/FASR, o TNF- α /TNFR1, o Apo3L/DR3, o Apo2L/DR4 e o Apo2L/DR5 (Elmore, 2007).

A sequência de eventos que define a fase extrínseca da apoptose é melhor caracterizada pelos modelos FASL/FASR (FAS ligand/FAS receptor) e TNF- α /TNFR1 (Tumor necrosis factor/ Tumor necrosis factor receptor 1) (Marinho, 2013). Nesta via, a libertação das proteínas pró-apoptóticas é precedida pelo acoplamento de ligantes específicos aos recetores de morte celular localizados na membrana celular. Esta união vai evocar proteínas adaptadoras FADD (Fas associated death domain), para a ligação fasL/FasR e TRADD para a ligação TNF- α /TNFR1 que, por conseguinte, apresentam domínios de morte correspondentes que se ligam aos recetores. Em seguida, o FADD, que possui capacidade de recrutar a pro-caspase 8, liga-se à mesma e forma-se um complexo de sinalização indutor de morte (DISC - death-inducing signalling complex) que culmina na auto-clivagem e ativação da pro-caspase 8. A ativação da caspase 8 vai direta ou indiretamente ativar a caspase 3 indispensável na sinalização dos eventos de morte celular, nomeadamente formação de corpos apoptóticos e condensação da cromatina (Pereira *et al.*, 2012; Bergantini *et al.*, 2005).

Este processo de ativação das caspases ocorre no meio citosólico sem o envolvimento de mitocôndrias. A ativação da caspase 8 também é responsável pela clivagem de proteínas citosólicas, que atuam sobre a membrana mitocondrial externa, provocando a libertação do citocromo c no citosol que, por sua vez, vai intensificar a ativação da caspase 3 (Pereira *et al.*, 2012; Bergantini *et al.*, 2005).

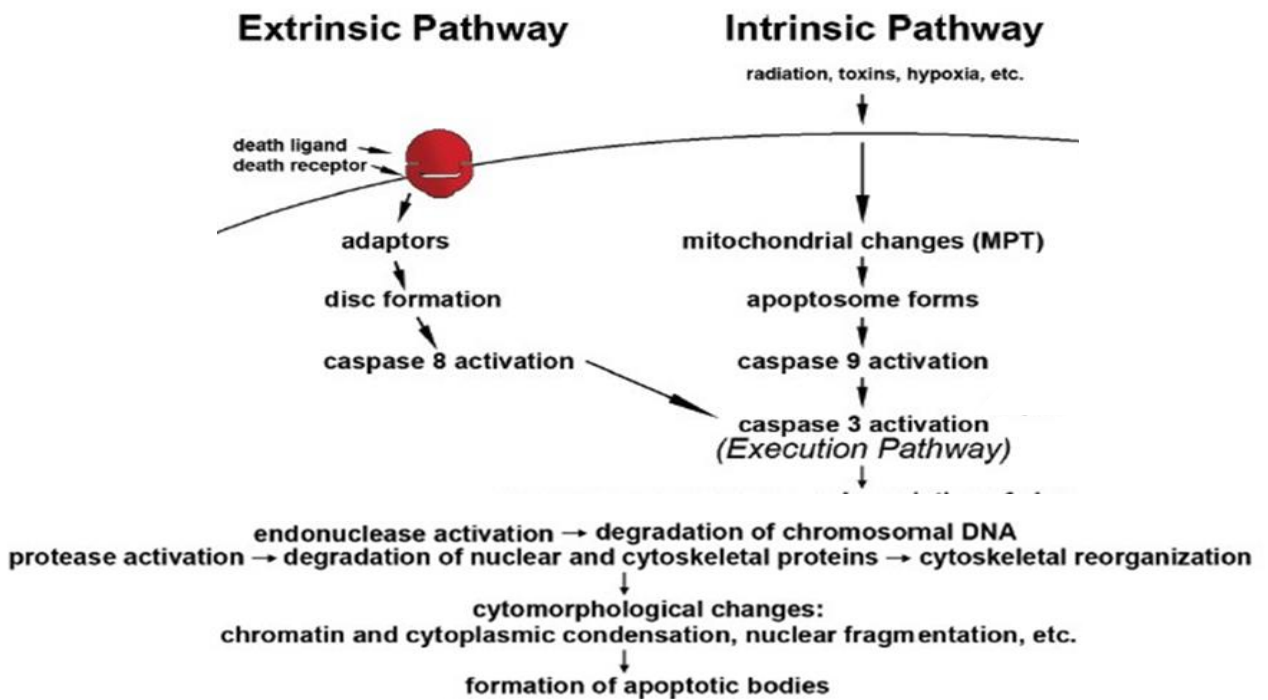


Figura 19. Vias de ativação do processo de morte celular programada.

2.10.4. Apoptose/Regeneração Tubular

Os rins devido à sua função de reabsorção e secreção possuem uma alta taxa metabólica, principalmente na região dos túbulos renais. Devido a estas funções, não só ficam expostos a altas concentrações de agentes nefrotóxicos, como também se tornam mais suscetíveis a danos causados por isquémia, que provoca NTA, podendo esta evoluir para IRA (Bragato et al., 2015).

A perda por apoptose de células isoladas do epitélio de revestimento tubular é eficientemente compensada pelas células epiteliais tubulares viáveis adjacentes que, por divisão mitótica, preenchem a falha epitelial. Uma perda mais severa de células do epitélio tubular é reparada pela proliferação das restantes células epiteliais viáveis sobre uma membrana basal intacta, formando uma camada de células cuboidais mais baixas, em vez de um epitélio cilíndrico maduro, assemelhando-se a um epitélio proximal mais dilatado (Melanie *et al.*, 2015).

A restituição da função renal ocorre, no entanto, este mecanismo de restabelecimento de função não é ainda inteiramente conhecido. O principal fator determinante desta capacidade regenerativa é a integridade da membrana basal (Melanie *et al.*, 2015).

2.11. O PAPEL DO ENFERMEIRO VETERINÁRIO

A prioridade de um Enfermeiro Veterinário (EV) na atividade diária dum CAMV passa por garantir o bem-estar animal e a sua monitorização constante, tornando possível a garantia de intervenção atempada em todas as situações de emergência que necessitam de rápida atuação (Caetano, 2009).

Na Medicina Veterinária os parâmetros comumente monitorizados são a PA e a PVC (Kunzler, 2014). O PVC é um reflexo do volume sanguíneo intravascular, da função cardíaca, da competência venosa e da pressão intratorácica (Pinheiro, 2013).

Em urgências por situações de hipoperfusão é crucial não deixar agravar o quadro clínico, sendo que, os EV deverão estar familiarizados quanto a parâmetros mencionados anteriormente, visto que são, muitas vezes, as primeiras pessoas a reconhecer alterações súbitas nos pacientes (Pinheiro, 2013).

Segundo Pinheiro (2013), a equipa de enfermagem em casos de emergência deverá:

- Garantir a correta identificação e o correto alojamento/isolamento de pacientes, exceto indicação contrária;

- Demonstrar carinho e respeito pelo paciente não praticando atos de forma negligente;

- Ter o treino adequado para manter um temperatura corporal adequada garantindo o conforto e limpeza do paciente;

- Garantir a administração de medicamentos segundo ordens do MV;

- Saber utilizar corretamente O₂, anestésicos, tubos endotraqueais, equipamentos de monitorização e reanimação, realizar eletrocardiogramas (ECG) e ajudar em possíveis reanimações cardiovasculares;

- Estar apto na monitorização e administração de fluidoterapia;

- Registar na ficha clínica todas as notas da equipa de enfermagem.

Por estas razões, consideramos que o EV também deve ser detentor de conhecimentos sobre as soluções de reposição de volémia disponíveis, de forma atuar assertivamente perante rápidas instruções dadas em contexto de urgência, estando a par dos seus efeitos para poder a monitorização eficientemente dos pacientes reperfundidos.

3. PARTE PRÁTICA

3.1. OBJETIVOS

. Pretende-se com este estudo fazer a comparação do efeito do LR, um cristalóide, e, do HES 130/0,4, um colóide, na integridade do tecido renal em situação clínica sob anestesia geral, após hemorragia aguda.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi efetuado num modelo animal submetido a uma anestesia geral, seguida de sangramento e reposição da volémia. Este estudo encontra-se inserido no projeto Ovislab PTDC/CVT/101999/2008 autorizado pela Direção Geral de Veterinária, onde se pode consultar detalhadamente todos os passos decorridos durante a parte todo o estudo experimental.

Para a realização deste estudo recorreu-se ao modelo suíno, onde foram simuladas as circunstâncias que decorrem em casos de hipovolémia aguda, sobretudo em situações ocorridas durante as intervenções cirúrgicas efetuadas sob anestesia geral.

Foi escolhido um representante de cada grupo de fluidos, um colóide, o HES 130/0,4, por apresentar uma grande capacidade expansora na reposição do volume intravascular, e um cristalóide, o LR por ser um dos cristalóides mais selecionados em necessidades de reposição da volémia.

Para efetuar uma avaliação do efeito das diferenças entre estes dois fluidos, efetuou-se em estudo histopatológico detalhado, utilizando o método de rotina com coloração por hematoxilina e eosina (H&E), e métodos imunohistoquímicos para deteção de fenómenos pré-apoptóticos, o citocromo c, e apoptóticos, o método TUNEL e imunofluorescência (M30).

Os animais foram selecionados aleatoriamente, cerca de um mês antes do início do estudo, sujeitos a desparasitação e, alojados/isolados com acesso livre a alimentos e água.

Posteriormente, os animais foram postos em contacto com humanos, para fomentar a familiarização, de forma a reduzir o stress.

No dia antes de serem expostos aos procedimentos, todos os animais foram sujeitos a um jejum, apenas com livre acesso à água.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: grupo controle, grupo 1 (LR) e grupo 2 (HES), que diferiam nos seguintes aspectos:

Grupo controle – animais submetidos à TIVA (anestesia total intravenosa), sem qualquer procedimento de sangramento ou de reposição de volêmia.

Grupo 1 (LR) – animais que receberam uma solução IV de cristalóide, lactato de ringier, passados 20 minutos após o final da hemorragia

Grupo 2 (HES) – animais que receberam uma solução IV (intravenosa) de colóide, HES 130/0,4, passados 20 minutos após o final da hemorragia.

Após esta distribuição, 28 porcos da raça Large White foram pré-medicados com azaperona intramuscular 30 minutos, antes de serem submetidos à TIVA.

Todos os grupos foram submetidos a procedimentos semelhantes, com exceção do grupo controle que apenas foi submetido à TIVA, não ocorrendo após isso, o respectivo sangramento e reposição da volêmia. A inclusão deste grupo controle no estudo foi efetuada com intuito de obter informação sobre a influência da TIVA prolongada com propofol no tecido renal.



Figura 20. Porco de raça Large White. Adaptado de <http://www.dino.com.br/releases/inovacao-em-genetica-suina-combina-o-melhor-do-large-white-com-o-lado-bom-do-landrace-dino890120577131>

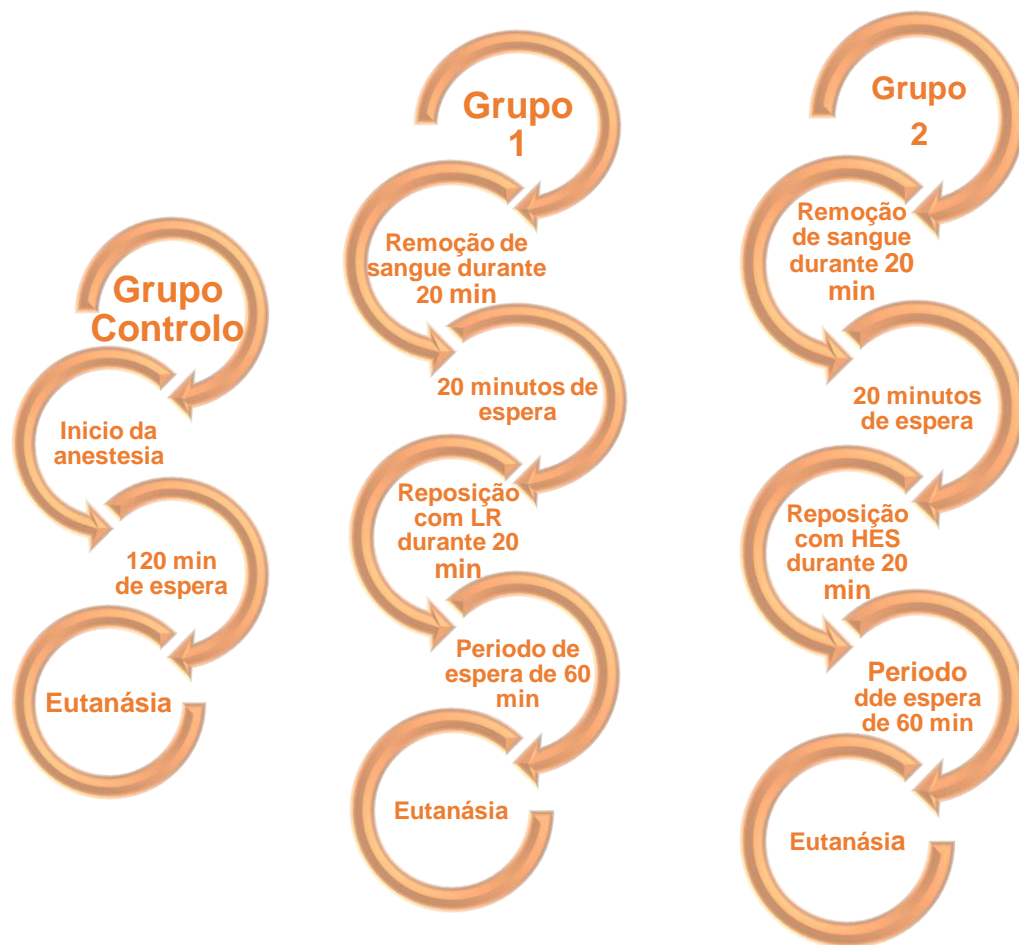


Figura 21. Cronograma do procedimento realizado em cada grupo de animais

3.2.1. PROTOCOLO ANESTÉSICO

Para consultar detalhadamente este protocolo, deverá ser consultada a tese de doutoramento da Doutora Ana Liza Cardoso Neto Oliveira Ortiz, com o tema “The influence of administering Ringer’s Lactate solution or HES 130/0.4 on the integrity of the small intestinal mucosa in a pig model of controlled Haemorrhage”.

Trinta minutos antes do início de indução da anestesia, todos os animais foram submetidos a uma pré-medicação, por via intramuscular, com azaperona, numa dose de 4 mg/kg (Stresnil®).

Após a pré-medicação foi colocado um cateter na veia auricular direita para a administração de fármacos e fluídos. Foi utilizada uma torneira de três vias para unir

o cateter intravenoso ao sistema de entrega e manutenção de fluidos e ao sistema de administração de propofol a 1% e de remifentanil.

Seguidamente à indução anestésica, deu-se início à infusão intravenosa contínua de propofol, numa taxa de 15/mg/kg/h, e, simultaneamente, de remifentanil, numa taxa de 0,3 µg/kg/h. A taxa utilizada na indução anestésica de propofol neste ponto do estudo manteve-se inalterada até ao final do mesmo. A taxa de remifentanil foi alterada após efetuados todos os procedimentos de monitorização para 0,2 µg/kg/h.

Após a obtenção de uma anestesia estável, foram realizados os procedimentos cirúrgicos com o fim de colocar cateteres venosos e arteriais.



Figura 22. Stresnil. Adaptado de <http://www.yorkvetsupplies.co.uk/product/stresnil-40mg-ml-solution-for-injection-for-pigs-100ml>

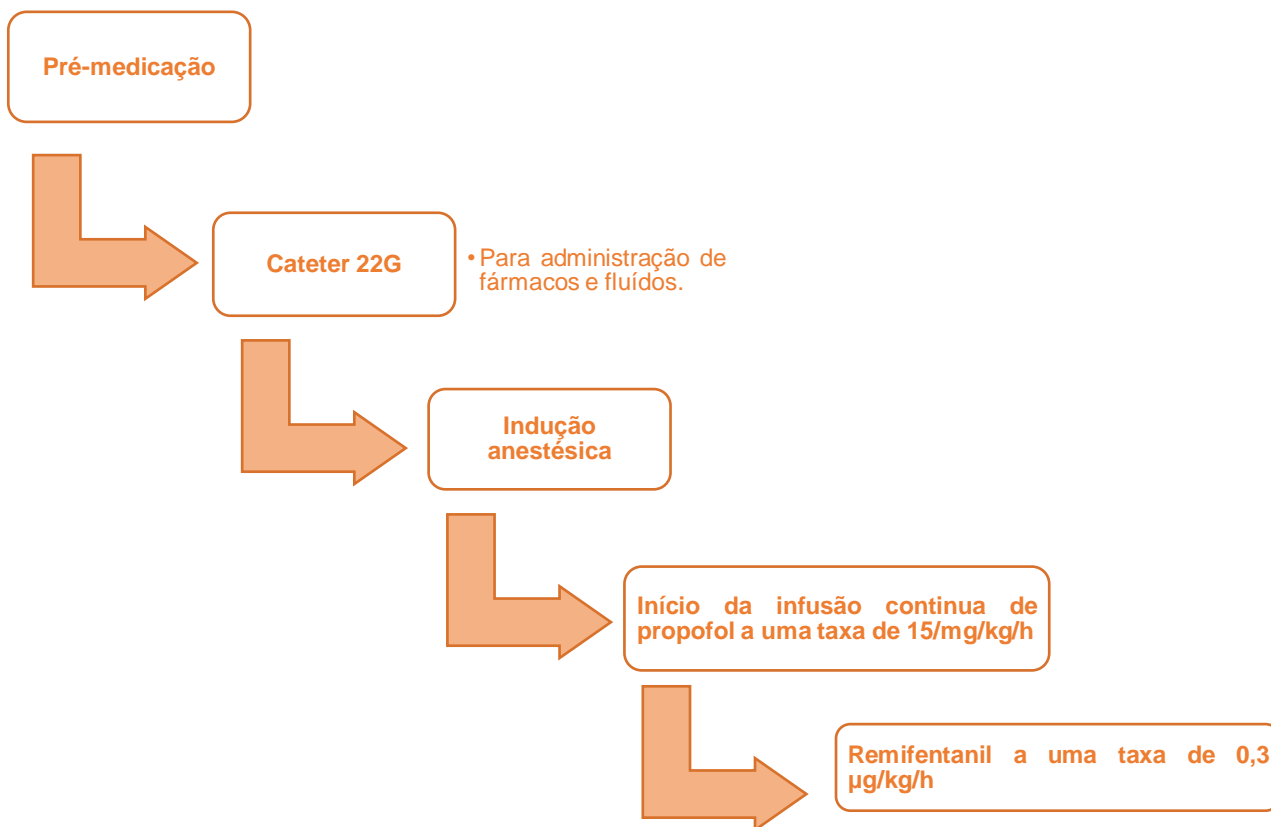


Figura 23. Protocolo anestésico.

3.2.2. MONITORIZAÇÃO HEMODINÂMICA E CEREBRAL E EQUIPAMENTOS

Em todos os animais foram monitorizados os seguintes parâmetros, a saturação de O₂ no sangue, o ritmo cardíaco e a pressão sanguínea. Foi também recolhida informação sobre a PVC e o DC.

A recolha de informação eletroencefalográfica foi efetuada através de um eletrodo cutâneo.

Para consultar detalhadamente a monitorização efetuada, deverá ser consultada a tese de doutoramento da Doutora Ana Liza Cardoso Neto Oliveira Ortiz, com o tema “The influence of administering Ringer’s Lactate solution or HES 130/0.4 on the integrity of the small intestinal mucosa in a pig model of controlled Haemorrhage”.

3.2.3. PROTOCOLO CLÍNICO

Após completar todos os procedimentos anestésicos e monitorização, foi recolhida uma amostra de sangue venoso de cada animal para se fazer uma análise hematológica e bioquímica antes de se provocar a hemorragia passiva.

Em seguida, os animais foram submetidos a uma hemorragia aguda grave, onde, durante aproximadamente 20 minutos, foram removidos 25 ml/kg de sangue passivamente, a partir da artéria femoral direita.

Passados 20 minutos após a hemorragia, procedeu-se à reposição da volémia, também num período de cerca de 20 minutos. Foi administrado HES 130/0,4 no grupo HES, numa dose de 20 ml/kg, e no grupo LR, foi administrado LR, numa dose de 25 ml/kg, ou seja, 25% superior à dose administrada de HES. Ambos a uma taxa de infusão de 999 ml/h.

Após o final da infusão de fluidos (reposição da volémia), a infusão de propofol e de remifentanil foi mantida por mais uma hora extra, ao fim da qual os animais foram eutanasiados, com cloreto de potássio intravenoso.

3.2.4. NECRÓPSIA E FIXAÇÃO DE AMOSTRAS

Após eutanásia foi efetuado o exame necrópsico detalhado e recolhidas todas as amostras necessárias para, posteriormente, se proceder ao estudo histopatológico.

O presente trabalho centra-se apenas na avaliação das amostras de rim, as quais foram devidamente fixadas em formol tamponado a 10%, durante um período de 24 horas.

Foram recolhidas também amostras de sangue da artéria femoral esquerda antes do início do sangramento e, ao final do estudo, para determinação dos níveis sanguíneos de nitrogênio uréico (BUN) e creatinina.

3.2.5. MÉTODO HISTOPATOLÓGICO

Após a fixação, as amostras seguiram para o processamento de tecidos, onde foram impregnadas com parafina, um material capaz de lhes conferir um estado sólido. Como a parafina é insolúvel em água, neste processamento ocorreu primeiro a desidratação dos tecidos, utilizando álcoois de concentrações crescentes (após fixação, os tecidos ainda retêm cerca de 85% de água), a diafanização dos tecidos com xilol, porque, uma vez que a parafina também é pouco solúvel em álcoois, estes

terão que ser substituídos por um produto que apresente afinidade com a parafina (Figura 18) (Nunes *et al.*, 2016).

Após desidratação as amostras foram incluídas em blocos de parafina (previamente derretida a temperatura de aproximadamente 60°) e posteriormente cortadas com recurso a um micrótomo (Leica RM2255), tendo sido obtidos cortes histológicas com 3 µm de espessura. Estes cortes foram posteriormente transferidos para lâminas adesivas de vidro.

Os cortes histológicos foram submetidos a um banho de xilol, durante um período de 15 minutos, para se efetuar a desparafinação, e seguidamente, procedeu-se à hidratação com a passagem em álcoois de concentração decrescente, álcool a 100% durante 10 minutos, e pelos restantes 5 minutos, respetivamente, 96%, 80% e 70% (Figura 19).

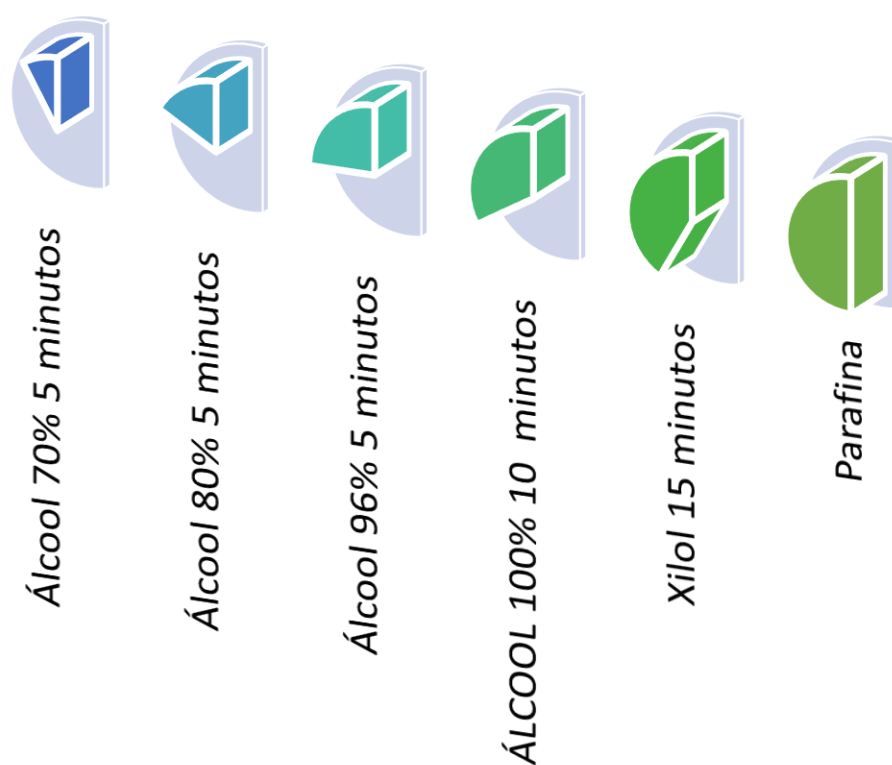


Figura 24. Processamento de tecidos

Todos os cortes histológicos utilizados nas técnicas de imunohistoquímica foram sujeitos a uma inibição da peroxidase endógena à temperatura ambiente com peróxido de hidrogénio (H₂O₂) a 3% em metanol. Esta inibição da peroxidase endógena efetuou-se por um período de 30 minutos sob agitação contínua.

No final, as secções histológicas foram lavadas, por 3 vezes, em solução tampão de pH=7,4, Tris – Buffered Salina (TBS).



Figura 25. Esquema representativo do processo desparafinação e hidratação

3.2.5.1. Hematoxilina & Eosina

Após realizado o processo de hidratação dos cortes, efetuou-se a coloração durante um período de 8 minutos, com uma solução corante básica/corante nuclear, a hematoxilina de Harris. Após a coloração procedeu-se à lavagem dos cortes em água tépida durante 10 minutos. Como corante contraste foi utilizada a eosina alcoólica a 1%, onde os cortes histológicos ficaram por 6 minutos (Figura 20).

Depois de lavados, os cortes foram novamente desidratados, seguindo o mesmo processo já inicialmente efetuado, só que por ordem inversa, passando duas vezes por álcool a 96%, a primeira num ciclo de 10 minutos e a segunda num ciclo de 5 minutos, e de seguida por álcool a 100%, em dois ciclos de 5 minutos e, para terminar foi efetuado um ciclo de 5 minutos no xilol. Procedeu-se então à montagem das lâminas de forma permanente.

Todos os cortes corados com a hematoxilina e eosina foram examinadas por microscopia de luz, utilizando o microscópio Zeiss Axioplan 2 e observadas por dois patologistas independentes, de modo a identificar/avaliar as lesões, representadas na Quadro 4.

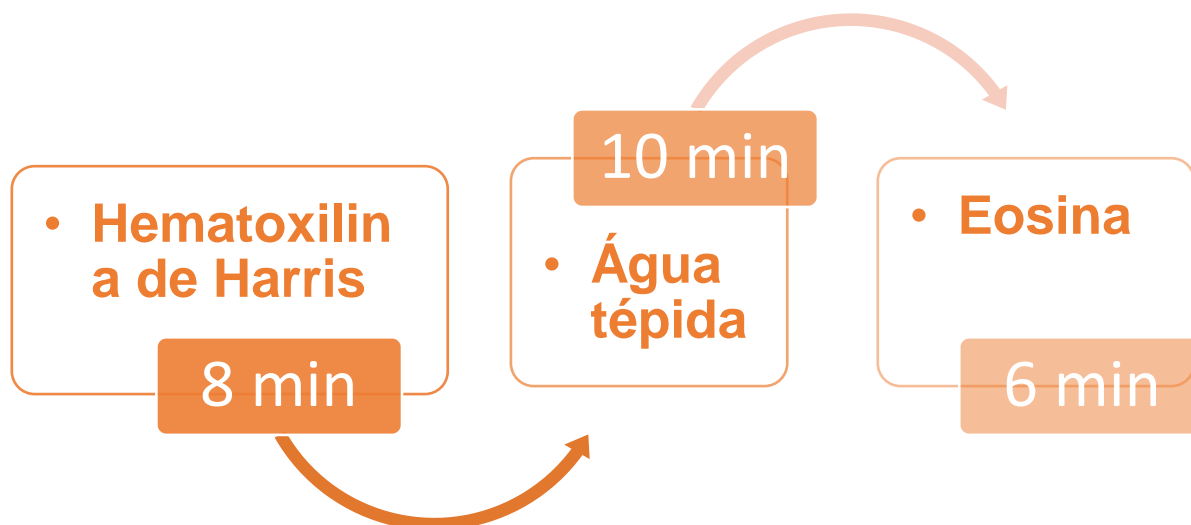


Figura 26. Processo de coloração H&E

Quadro 4. Quadro representativo das lesões avaliadas com a Hematoxilina & Eosina

Lesões Gomerulares	Dilatação do espaço de Bowman
	Gotículas hialinas no espaço de Bowman
	Hiper celularidade glomerular
	Expansão mesengial
Lesões Tubulares	Descamação celular
	Blebbing (aparecimento de protuberâncias irregulares na membrana plasmática das células)
	Tumefação celular
	Degenerescência Hidrópica
	Degenerescência vacuolar
	Material hialino concêntrico
	Cilindros hialinos
Lesões Intersticiais	IFTA (Fibrose intersticial e atrofia tubular).
	Irregularidade da MBT (membrana tubular basal).
	Infiltrado inflamatório.
Lesões Vasculares	Congestão

Hiperémia
Edema
Hemorragia
Dilatação vascular
Hialinose arteriolar
Aterosclerose
Hialinose venular
Necrose papilar

3.2.5.2. Citocromo C

O citocromo c situa-se no espaço mitocondrial intermembranário quando a célula entra em oxidação. Esta situação é resultante de um estado de hipoperfusão onde irá decorrer a transição da permeabilidade da mitocôndria, resultando na libertação do citocromo c.

A deteção do citocromo c citosólico serve para identificar células em apoptose (morte celular programada) e é realizada por imuno-histoquímica, utilizando o método indireto Avidina-Biotina, através do complexo estreptavidina-biotina (sistema de coloração LSBA de cabra ImmunoCruz TM: sc 2053).

Para a recuperação antigénica, os cortes foram colocados numa solução tampão citrato de ph 6,0. Foram executados no microondas 3 ciclos de 5 minutos cada, com um breve arrefecimento entre cada ciclo exceto no último, onde o arrefecimento durou cerca de 25 minutos. Entre cada ciclo, foram adicionadas pequenas quantidades de água destilada, para compensar a evaporação.

Foi utilizado o anticorpo policlonal de cabra, Cytocrome c (C20): sc-8385 (Santa Cruz Biothecnology, Inc.), ao que se seguiu a introdução do anticorpo secundário biotilado dirigido contra o anticorpo primário e, posteriormente, aplicou-se estreptavidina marcada com peroxidase, para permitir a visualização.

Após esta recuperação antigénica, foram realizadas 3 lavagens com a solução tampão TBS.

Em seguida, todos os passos foram realizados em câmara húmida vertical, seguindo o protocolo detalhado no quadro 5.

Quadro 5. Técnica Citocromo c.

Aplicar 2 gotas de solução de bloqueio de soro durante um período de 10 minutos
Incubar o anticorpo primário citocromo c a uma diluição de 1:3000 (diluição para anticorpos – diluente de anticorpo, Zytomed). Deixar incubar durante toda a noite à temperatura ambiente
Efetuar 3 lavagens em TBS de 5 minutos cada
Incubar o anticorpo secundário biotinilado durante 30 minutos, à temperatura ambiente
Retirar o anticorpo secundário com três lavagem de TBS
Efetuar a incubação do complexo enzimático de estreptavidina-biotina, durante um período de 10 minutos
Efetuar três lavagens em TBS
Revelar com DAB (d 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) durante 5 minutos à temperatura ambiente (após o tempo de revelação, colocar as lâminas numa solução tampão para parar a revelação e, em seguida, colocar as lâminas de baixo de água tépida e morna)
Realizar a coloração de contraste com Hematoxilina de Harris, durante um período de 5 minutos, à temperatura ambiente
Colocar novamente as lâminas de baixo de água tépida e morna, num período de 10 minutos
Para a desidratação efetuar banhos em séries graduadas de álcoois, nomeadamente: 2 Banhos de em álcool 96%, num período de 5 minutos 2 Banhos em álcool a 100%, num período de 5 minutos
Finalizar com uma imersão de 5 minutos em xilol

3.2.5.3. TUNEL

A técnica TUNEL consiste na marcação enzimática, através da enzima deoxinucleotidil transferase terminal (TDT), da fragmentação de ADN (ácido desoxirribonucleico) decorrente do processo de apoptose. A identificação destes fragmentos é possível devido à aplicação do TUNEL “*Terminal Dupt Nick End- Labelling*”, através do qual a deoxiuridina trifosfato se une enzimaticamente à extremidade 3' - OH dos fragmentos de ADN, tornando a marcação microscópica dos substratos cromogénicos visível (Paiva, 2014).

A técnica de TUNEL foi realizada com recurso ao *kit In Situ Cell Death Detection, POD* (Cat. No. 11684817910, Roche, Mannheim, Germany), segundo o protocolo recomendado pelo fabricante.

Neste estudo, foi utilizado um protocolo muito semelhante ao escolhido no citocromo c, tendo sido efetuada exatamente da mesma maneira a recuperação antigénica, seguindo os mesmos passos até chegar à câmara húmida.

Após recuperação antigénica, os cortes seguiram para câmara húmida, seguindo-se os passos descritos no quadro 6.

Quadro 6. Técnica TUNEL

Incubar com solução enzimática (TdT) (100 µl), por um período de 90 minutos a 37 graus centígrados
Lavar as lâminas em solução tampão (TBS) por 3 vezes, 5 minutos cada
Incubar com solução Converter-POD durante 10 minutos, a uma temperatura de 37 graus centígrados
Efetuar 5 lavagens de 5 minutos cada com TBS
Aplicar o DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) para revelação, num espaço de 5 minutos à temperatura ambiente
Colocar as lâminas numa solução tampão para parar a revelação e, em seguida, colocar as lâminas de baixo de água tépida e morna.
Realizar a coloração por contraste com hematoxilina de Harris, durante um período de 10 minutos, à temperatura ambiente
Colocar novamente as lâminas de baixo de água tépida e morna, num período de 10 minutos
Para a desidratação efetuar banhos em séries graduadas de álcoois, nomeadamente: 2 Banhos de em álcool 96% num período de 5 minutos 2 Banhos em álcool a 100% num período de 5 minutos
Finalizar com uma imersão de 5 minutos em xilol.

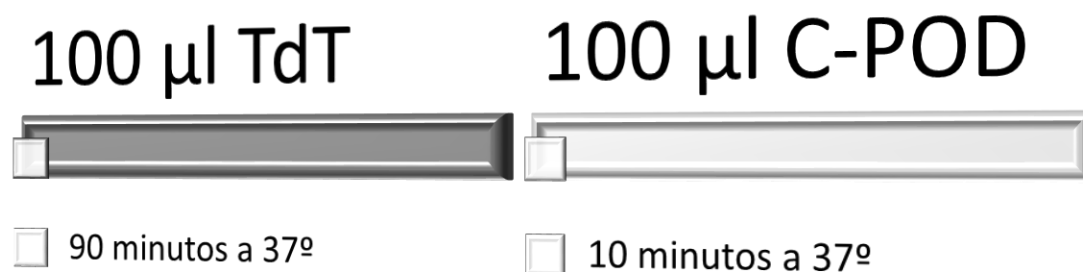


Figura 27. Esquema representativo da técnica TUNEL

3.2.5.4. M30

A técnica M30 é outra das técnicas utilizadas para deteção de células apoptóticas. Os anticorpos M30 vão interagir com o neoepítipo (que se forma após clivagem da citoqueretina 18 durante o processo de apoptose), marcando apenas células mortas. Não marca células vivas, pois nestas o neoepítipo não é detetável.

As citoqueratinas 8 e 18 são os principais componentes dos filamentos intermediários das células epiteliais simples. Durante o processo de apoptose os filamentos da citoqueratina 18 reorganizam-se em estruturas granulares devido a

fosforilação em serina 53. A citoqueratina 18 liberta um fragmento proteolítico que migra juntamente com a citoqueratina 18 clivada até às caspases executoras despoletando o início do processo (Benetone, 2005).

.A citoqueratina 18 quando clivada, dá origem a dois resíduos conservados de aspartato. Os anticorpos que podem reconhecer estes fragmentos produzidos pelas caspases marcando seletivamente células pré-apoptóticas e apoptóticas (Vasconcelos, 2016).

Esta técnica é de extrema importância visto que reconhece o sítio de clivagem da caspase específica da citoqueratina 18, o que, conseqüentemente, torna esta técnica uma ferramenta eficaz para a detecção em estágio precoce da apoptose (Brant, 2008).

Os anticorpos M30 vão interagir com o neopítipo (que se forma após clivagem da citoqueratina 18 durante o processo de apoptose), marcando apenas células mortas. Não marca células vivas, pois nestas o neopítipo não é detetável.

Utilizou-se o anticorpo M30 *Cytodeath Fluorescein* (Roche, Mannheim, Germany), procedendo-se de acordo com as indicações do fabricante.

A recuperação antigénica foi efetuada tal como descrito nas técnicas anteriores, utilizando o microondas e utilizando o tampão citrato de pH=6,0, tendo apenas sido ligeiramente alterado o tempo e potências utilizados.

Para a recuperação do antígeno foi inicialmente utilizado o microondas a uma potência de 850 W (até atingir a ebulição) em tampão citrato 0,01 e, em seguida, após fervura, a potência foi alterada para 100W, de forma a manter-se quente e, deste modo, as lâminas ficarem a incubar durante um período de 15 minutos. Após isto, as lâminas apenas arrefeceram durante 5 minutos à temperatura ambiente e foram posteriormente lavadas 3 vezes em PBS e incubadas num recipiente com a mesma solução durante 2 minutos. Seguidamente, os cortes foram bloqueados com uma solução de bloqueio 10 minutos à temperatura ambiente.

Por fim, removeu-se o tampão de incubação e adicionou-se 100 µl do anticorpo M30 deixando-se incubar por um período de 1 hora em camara húmida à temperatura ambiente, tal e qual como nas técnicas anteriores. Imediatamente após esta incubação as lâminas foram lavadas com a solução tampão de lavagem.

3.2.5.5. Análise

No final de todas as etapas, em todas as técnicas, procedeu-se à montagem das lâminas, efetuada com meio de montagem Entellan®.

Para observação e avaliação dos cortes foi utilizado um microscópio Zeiss e as imagens foram obtidas através de uma camera digital microscópica Leica DFC450 e do software Advanced Analysis Bundle, utilizando ampliações de 20x e 40x, de acordo com a intensidade da coloração (Quirezze *et al.*, 2006; Figueira, 2007).

Na H&E as lesões histopatológicas foram categorizadas em lesões glomerulares, tubulares, vasculares e intersticiais e, posteriormente, analisadas e semi - quantificadas numa escala de 0 a 3. Nesta escala, o 0 correspondia à ausência de lesão, o 1 à presença de lesão discreta ou focal, o 2 à presença de lesão moderada e o 3 à presença de lesão intensa (Quirezze *et al.*, 2006; Figueira, 2007).

Para avaliar o grau de lesões provocadas pela hemorragia foram efetuadas comparações não-paramétricas, entre os três grupos (1-LR, 2-HES e Controlo), recorrendo ao teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. As análises foram realizadas com o programa estatístico GraphPad Prism ver. 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA), onde apenas os valores de P inferiores a 0.05 foram considerados estatisticamente significativos.

No Citocromo C, no TUNEL e no M30 as reações foram avaliadas por dois patologistas independentes (de forma a reduzir a subjetividade da avaliação) que realizaram uma análise semi-quantitativa das reações, onde se delineou uma escala de 0 a 4. Nesta escala, o 0 equivalia a ausência de reação, o 1 a uma reação débil, o 2 a uma reação moderada, o 3 a uma reação intensa e, por fim, o 4 a uma reação muito intensa. Com estes valores, delineou-se o chamado sistema “Quick-score” para todos os animais em estudo e, posteriormente, um “Quick-score” para o grupo, através da média dos 6 animais por grupo. Este consistiu numa multiplicação (AxB) entre a proporção de células positivas (A) e o valor de intensidade de reação (B), resultando um quick – score entre 0 e 12, o qual se traduziu em 5 hipóteses de 0 a 4 como mostra o quadro 7 (Pina, 2014; Reifenrath, 2014).

Na técnica TUNEL e no M30, foi ainda avaliado o total de células apoptóticas existentes em 10 campos já selecionados, tendo por base o número de células positivas e a intensidade da reação obtida. Desta contagem, resultou a atribuição de um score a cada animal (H-Score), entre 0 e 400. Nesta avaliação, o 0 correspondia

à ausência de reação na totalidade das células, entre 0 e 100 a um grau lesional baixo, dos 100 aos 200 a um grau lesional médio, entre os 200 e os 300 a um grau lesional elevado. De 300 a 400 corresponde a um grau lesional muito elevado e 400 representa uma reação de intensidade máxima na totalidade das células em avaliação (Detre *et al.*, 1995).

Nos 10 campos selecionados, foi ainda avaliado o total de células apoptóticas e o índice apoptótico, calculado através da comparação entre o total de células positivas e a totalidade de células contabilizadas (positivas e negativas). Foi ainda contabilizado o número de células apoptóticas existentes em cada milímetro quadrado de tecido analisado.

O Q-score para o citocromo c, M30 e TUNEL assim como as células apoptóticas, foram analisados para o córtex e medula renal.

Os resultados foram divididos por quatro intervalos para facilitar a sua interpretação.

Quadro 7. Quick – Score Cálculos

A - % de células positivas	B – Intensidade de reação	AxB – Q-Score
0 = sem células positivas	0 = Ausência de reação	0 – 1 = Negativo (0)
1 = <25%	1 = Reação débil	2 – 3 = Débil (1)
2 = 25 – 50%	2 = Reação moderada	4 – 8 = Moderado (2)
3 = 50 – 75%	3 = Reação intensa	9 – 12 = Intenso (3)
4 = > 75%	4 = Reação muito intensa	> 12 = Muito intenso (4)



Figura 28. High-Score

4. RESULTADOS

Quanto às análises efetuadas no antes e depois do protocolo experimental, nomeadamente os níveis séricos de BUN e da creatinina, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, isto é, o “p” foi sempre superior a 0.05.

Quadro 8. Resultados das análises efetuadas antes e depois do protocolo experimental. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$).

Grupo	BUN (mg/dL)		Creatinina (mg/dL)	
	Antes do sangramento	Final do estudo	Antes do sangramento	Final do estudo
Controlo	20.40 ± 6.66	22.40 ± 7.27	0.88 ± 0.11	0.84 ± 0.09
Grupo 1 LR	19.50 ± 8.06	20.50 ± 6.81	0.88 ± 0.15	0.85 ± 0.13
Grupo 2 HES	19.20 ± 2.77	18.20 ± 2.95	0.90 ± 0.10	0.86 ± 0.09

4.1. HEMATOXILINA & EOSINA

A análise histológica avaliada revelou alterações mínimas a moderadas no tecido renal de todos os animais, tanto tratados com HES 130/0,4, como com RL.

As diferenças significativas encontradas foram entre nas classes de lesões glomerular e vascular.

Relativamente às lesões glomerulares, representadas no quadro 9, todos os grupos, com exceção do grupo controlo (que não apresentou animais com dilatação do espaço de Bowman), apresentaram animais com lesão de grau 1 e 2.

No que diz respeito às restantes lesões, o grupo controlo revelou quase sempre lesão. O número de animais apresentados com lesão nos restantes grupos foi igual, sendo que estatisticamente significativo ao comparar entre grupos, apenas se revelou a hiperplasticidade glomerular, com $p = 0,026$.

Quadro 9. Resultados H&E a nível glomerular

Lesões Histológicas Glomerulares					
	Porco	Dilatação do espaço de Bowman	Gotículas hialinas no espaço de Bowman	Hiper celularidade glomerular	Expansão mesengial
Grupo Controlo N=6	1	0	1	0	0
	2	0	1	2	0
	3	0	1	2	1
	4	0	2	2	1
	5	0	2	1	1
	6	0	1	2	1
	Total	0/6	6/6	5/6	4/6
Grupo 1 RL N=11	7	0	0	0	0
	8	1	0	0	0
	9	0	0	0	0
	10	0	1	0	0
	11	0	1	0	0
	12	0	1	0	0
	13	0	2	0	0
	14	0	2	0	0
	15	1	1	2	1
	16	0	1	2	1
	17	0	2	2	1
Total	2/11	8/11	3/11	3/11	
Grupo 2 HES N=11	18	0	0	0	0
	19	1	0	0	0
	20	0	1	0	0
	21	0	1	0	0
	22	0	0	0	0
	23	0	2	0	0
	24	0	1	0	2
	25	1	2	0	0
	26	0	1	2	0
	27	0	2	1	1
	28	0	1	1	1
	2/11	8/11	3/11	3/11	

Nas lesões histológicas tubulares observadas não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas na comparação entre grupos. O número de animais com lesão foi idêntico nos grupos, existindo uma pequena variação em algumas lesões como foi o caso das degenerescências, do material concêntrico e dos cilindros hialinos, com diferença de 1 animal. Neste grupo de lesões representado no quadro 10, apenas se observaram lesões de grau 1 e 2.

Quadro 10. Resultados H&E a nível tubular

Lesões histológicas Tubulares							
	Porco	Descamação celular	Blebbing	*Deg. Hidrópica	*Deg. Vacuolar	*Mat. hialino concêntrico	Cilindros hialinos
Grupo Controlo N=6	1	0	1	1	0	1	1
	2	0	0	2	1	0	1
	3	0	1	1	0	1	1
	4	0	0	1	1	1	2
	5	1	1	1	1	1	1
	6	1	1	1	1	2	1
	Total		2/6	4/6	6/6	4/6	5/6
Grupo RL N=11	7	0	0	2	0	1	1
	8	0	0	1	0	1	0
	9	0	0	0	2	0	1
	10	0	0	0	1	0	1
	11	0	0	0	0	1	1
	12	0	0	0	1	0	0
	13	1	1	1	1	0	0
	14	0	1	1	1	0	2
	15	0	0	0	1	1	1
	16	0	2	2	2	1	1
	17	1	2	2	1	2	2
Total		2/11	4/11	10/11	3/11	8/11	8/11
Grupo HES N=11	18	0	0	1	0	0	0
	19	1	0	0	2	0	1
	20	0	0	0	1	0	0
	21	0	0	0	1	1	1
	22	0	0	0	1	0	1
	23	0	1	1	1	0	1
	24	0	2	2	2	2	0
	25	0	0	0	1	0	0
	26	0	1	1	2	1	1
	27	1	0	0	1	0	1
	28	0	2	2	1	1	1
Total		2/11	4/11	11/11	4/11	7/11	7/11

** Deg. - Degenerescência; Mat. – Material.

Relativamente às lesões histológicas intersticiais, representadas no quadro 11, não foram observadas lesões estatisticamente significativas entre grupos. A diferença entre animais com lesão variou entre 1 e 2 animais, sendo que, no geral, não foi estatisticamente significativo. As lesões observadas apenas foram de grau 1 e 2.

Quadro 11. Resultados H&E a nível Intersticial

Lesões Histológicas Intersticiais				
	Porco	IFTA	Irregularidade da MBT	Infiltrado inflamatório
Grupo Controlo N=6	1	1	0	1
	2	1	0	2
	3	1	0	2
	4	0	0	1
	5	0	0	2
	6	0	0	1
	Total	3/6	0/6	6/6
Grupo RL N=11	7	0	0	1
	8	0	0	1
	9	0	0	2
	10	0	1	1
	11	0	1	1
	12	0	0	2
	13	0	0	1
	14	0	0	2
	15	1	0	2
	16	2	0	2
	17	0	0	2
Total	2/11	2/11	11/11	
Grupo HES N=11	18	0	1	1
	19	0	1	2
	20	0	0	1
	21	0	0	1
	22	0	1	1
	23	0	0	2
	24	0	0	1
	25	0	0	1
	26	0	0	1
	27	0	0	2
	28	1	1	2
Total	1/11	4/11	11/11	

Na classe de lesões vasculares, apenas a congestão obteve valores estaticamente significativos. O grupo 2 foi o grupo que apresentou menos animais com lesão, comparativamente ao grupo controlo e ao grupo 1, com $p = 0,048$. As lesões observadas apenas foram de grau 1 e 2 como podemos verificar no quadro 12.

Quadro 12. Resultados H&E a nível vascular

Lesões Histológicas Vasculares									
	Porco	*Cong.	Edema	Hiperémia	Hemorragia	*Dil. V	*H. art.	Aterios- clerose	*H. ven.
Grupo Controlo N=6	1	1	1	0	1	0	0	0	2
	2	2	0	1	1	0	0	0	2
	3	0	1	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	1	2	0	0	0	0	0	2
	6	1	2	1	0	0	0	0	2
	Total	4/6	4/6	2/6	2/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Grupo RL N=11	7	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	2	0	1	0	0	0	1
	9	2	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	1
	11	0	0	0	0	0	0	0	2
	12	0	1	0	1	0	0	0	0
	13	0	0	0	0	0	0	0	1
	14	1	0	0	1	0	0	0	2
	15	0	1	0	0	0	0	0	0
	16	1	2	1	0	0	0	0	0
	17	1	1	0	0	0	0	0	2
Total	4/11	5/11	1/11	3/11	0/11	0/11	0/11	0/11	6/11
Grupo HES N=11	18	0	0	0	0	0	0	0	0
	19	0	0	0	0	0	1	0	0
	20	0	0	0	0	0	0	0	0
	21	0	0	0	0	0	0	0	0
	22	0	0	0	0	0	0	0	0
	23	0	0	0	0	0	0	0	1
	24	0	1	0	0	0	0	0	1
	25	0	1	0	0	0	0	0	1
	26	0	0	0	0	0	0	0	2
	27	1	1	0	0	0	0	0	1
	28	0	1	1	0	0	1	0	2
Total	1/11	4/11	1/11	0/11	0/11	2/11	0/11	6/11	

* Cong. – Congestão; Dil. V – Dilatação vascular; H – art – Hianose arteriolar; H. ven. Hianose venular.

Por fim, nesta classe de lesão, como se pode observar no quadro 13, tanto o grupo 1 como o grupo 2 apresentaram apenas um animal com lesão avaliada com grau 1, já o grupo controlo não revelou nenhum animal com lesão, não sendo portanto, estatisticamente significativa a comparação entre grupos.

Quadro 13. Resultados H&E a nível da papila renal

	Lesões Histológicas da papilla renal	
	Porco	Necrose da papilla renal
Grupo Controlo N=6	1	0
	2	0
	3	0
	4	0
	5	0
	6	0
	Total	0/6
Grupo HES N=11	7	1
	8	0
	9	0
	10	0
	11	0
	12	0
	13	0
	14	0
	15	0
	16	0
	17	0
Total	1/11	
Grupo RL N=11	18	1
	19	0
	20	0
	21	0
	22	0
	23	0
	24	0
	25	0
	26	0
	27	0
	28	0
Total	1/11	

Quadro 14. Quadro resumo dos resultados das lesões avaliadas na H&E

Lesão Histológica		Grupos experimentais			
		Grupo 2 (HES 130/0,4)	Grupo 1 (LR)	Grupo Controlo	P
		n = 11	n = 11	n = 6	
Lesões Glomerulares	Dilatação do espaço de Bowman	2/11 (18.2%)	2/11 (18.2%)	0/6 (0.0%)	0.56
	Gotículas hialinas no espaço de Bowman	8/11 (72.7%)	8/11 (72.7%)	6/6 (100%)	0.58
	Hiper celularidade glomerular	3/11 (27.3%)	3/11 (27.3%)	5/6 (83.3%)	0.026
	Expansão mesengial	3/11 (27.3%)	3/11 (27.3%)	4/6 (66.7%)	0.30
Lesões Tubulares	Descamação celular	2/11 (18.2%)	2/11 (18.2%)	2/6 (33.3%)	0.65
	Blebbing	4/11 (36.4%)	4/11 (36.4%)	4/6 (66.7%)	0.80
	Tumefação celular	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/6 (0%)	-
	Degenerescência Hidrópica	11/11 (100%)	10/11 (90.9%)	6/6 (6%)	0.72
	Degenerescência Vacuolar	4/11 (36.4%)	3/11 (27.3%)	4/6 (66.7%)	0.34
	Material hialino concêntrico	7/11 (63.6%)	8/11 (72.7%)	5/6 (83.3%)	0.47
	Cilindros hialinos	7/11 (63.6%)	8/11 (72.7%)	6/6 (100%)	0.11
Lesões Intersticiais	IFTA	1/11 (9.1%)	2/11 (18.2%)	3/6 (50%)	0.20
	Irregularidade da MBT	4/11 (36.4%)	2/11 (18.2%)	0/6 (0.0%)	0.18
	Infiltrado inflamatório	11/11 (100%)	11/11 (100%)	6/6 (100%)	0.48
Lesões Vasculares	Congestão	1/11 (9.1%)	4/11 (36.4%)	4/6 (66.7%)	0.048
	Edema	4/11 (36.4%)	5/11 (45.5%)	4/6 (66.7%)	0.26
	Hiperémia	1/11 (9.1%)	1/11 (9.1%)	2/6 (33.3%)	0.28
	Hemorragia	0/11 (0.0%)	3/11 (27.3%)	2/6 (33.3%)	0.12
	Dilatação vascular	0/11 (0.0%)	0/11 (0.0%)	0/6 (0%)	-
	Hialinose arteriolar	2/11 (18.2%)	0/11 (0.0%)	0/6 (0.0%)	0.47
	Aterosclerose	0/11 (0.0%)	0/11 (0.0%)	0/6 (0.0%)	0.14
	Hialinose venular	6/11 (54.5%)	6/11 (54.5%)	4/6 (66.7%)	0.52
	Necrose papila renal	1/11 (9.1%)	1/11 (9.1%)	0/6 (0.0%)	0.76

* p<0.05

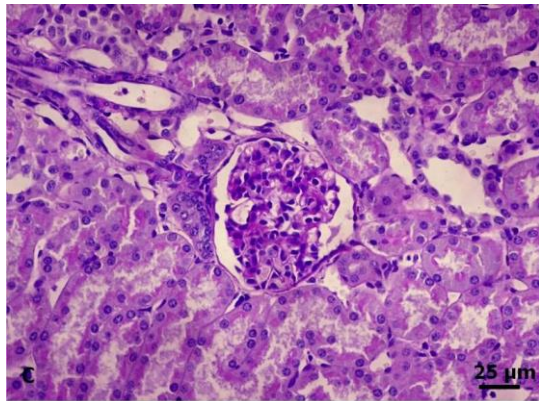


Figura 29. Hipercelularidade Glomerular Grau 1 no grupo 2

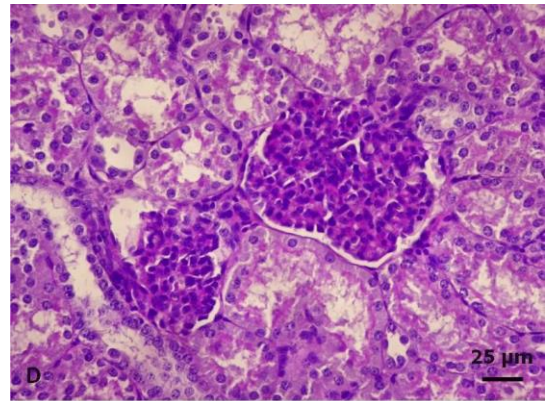


Figura 30. Hipercelularidade Glomerular Grau 2 no grupo 1

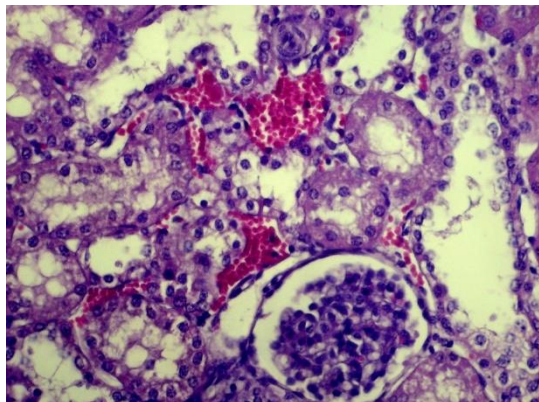


Figura 31. Congestão Grau 1 no Grupo 2

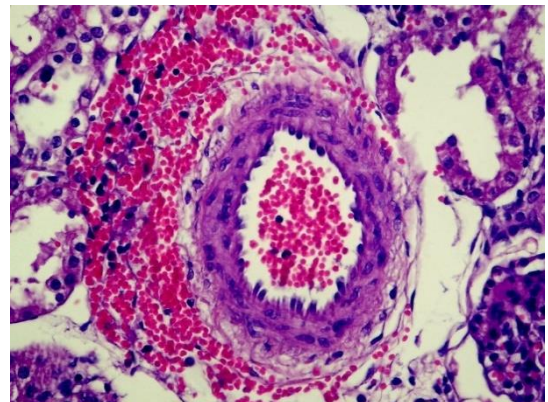


Figura 32. Hiperémia Grau 2 no Grupo 2

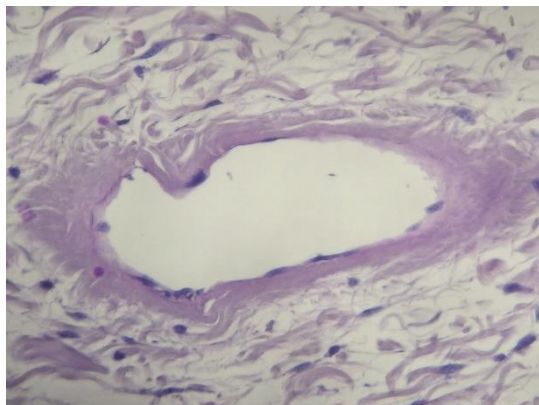


Figura 33. Hialinose Venular no grupo 2

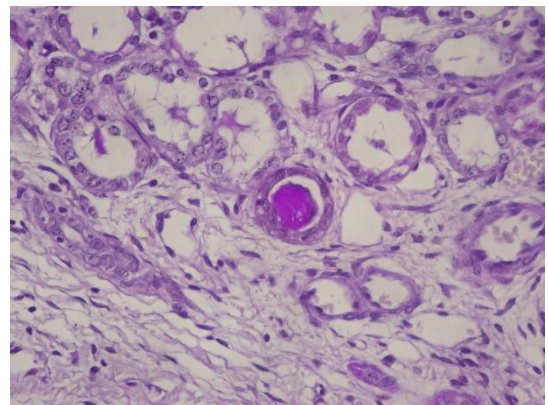


Figura 34. Cilindros Hialinos TCD do grupo 2

4.2. CITOCROMO C

No método imunohistoquímico Citocromo c, em todos os grupos, os glomérulos foram negativos, contudo foi observada imunorreatividade positiva noutras estruturas, como nos TCP e TCD, tubos coletores (TC) e ansa de Henle.

Os TCP e TCD de todos os grupos experimentais, revelaram imunorreatividade positiva com intensidades variáveis. As células epiteliais do segmento grosso da ansa de Henle exibiram também imunorreatividade positiva em todos os grupos experimentais, com uma intensidade de coloração classificada principalmente com grau 4 (muito intenso), à exceção dos animais do grupo controlo.

No grupo controlo (Quadro 15), em todos os animais, os TCP e os TCD exibiram 100% das células epiteliais com imunorreatividade citoplasmática positiva com intensidade de reação variando entre 2 (Moderado) e 3 (Intenso).

O segmento fino da ansa de Henle revelou-se negativo ao citocromo c, já o segmento grosso apresentou 100% das células com imunorreatividade citoplasmática positiva, com intensidade de marcação variável predominantemente entre grau 3 e 4.

Nos TC todos os animais exibiram imunorreatividade positiva, no entanto, 4 animais exibiram intensidade de reação <25%, tendo os outros dois exibido 75%, já relativamente à intensidade de coloração, foi predominante o grau 2.

Quadro 15. Resultados citocromo c – Grupo Controlo

Porco	Córtex			Medula		TC	Q-score Final
	Glom.	TCP	TCD	Segmento fino da ansa de Henle	Segmento grosso da ansa de Henle		
1	0	2	2	0	3	2	2
2	0	2	2	0	2	1	1
3	0	3	3	0	4	2	2
4	0	2	2	0	3	2	2
5	0	2	2	0	3	2	2
6	0	2	2	0	3	2	2
Intensidade de reação	0	100%	100%	0	100%	<25% (4) 75% (2)	
Média Q-score total							1,83

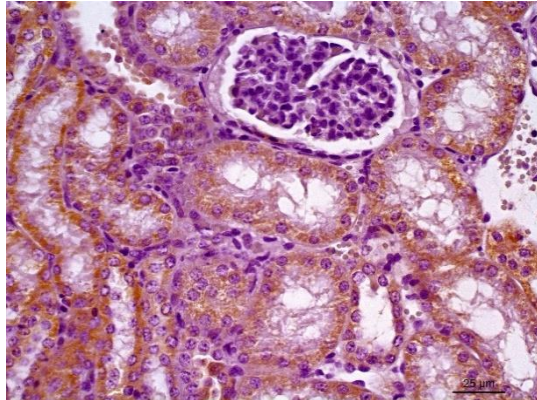


Figura 35. CórTEX: Glomérulo negativo; TCP grau 1; TCD grau 2. Grupo Controllo

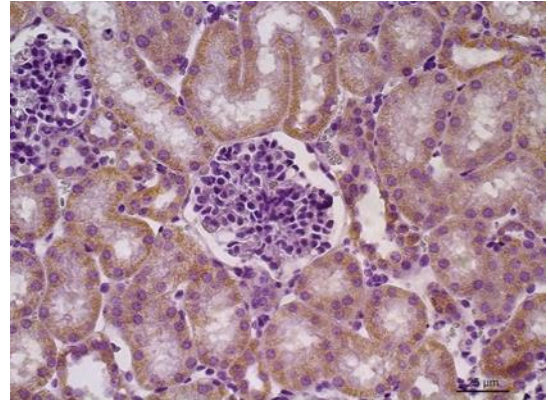


Figura 36. CórTEX: TCP grau 2; TCD grau 3 Grupo Controllo

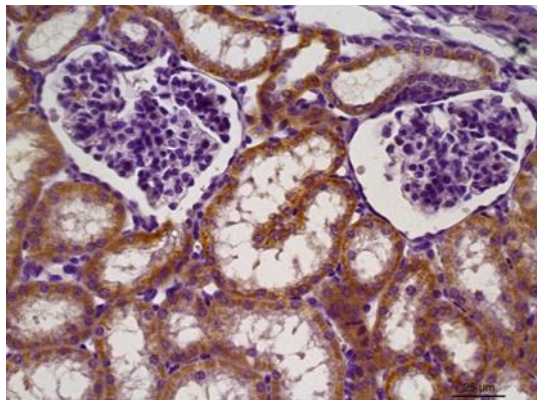


Figura 37. CórTEX: Glomérulo negativo; TCP grau 3; TCD com grau 4. Grupo Controllo

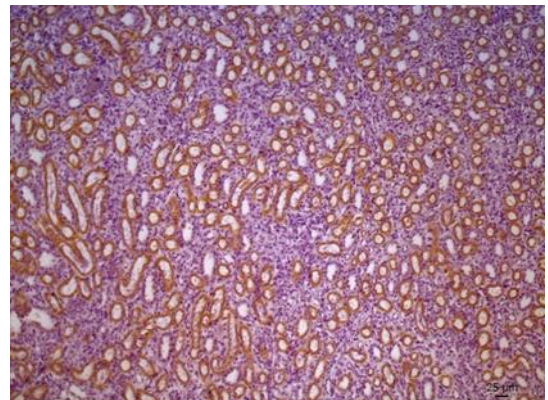


Figura 38. Medula: Segmento grosso da AH grau 4; segmento fino da AH negativo; TC grau 2. Grupo Controllo

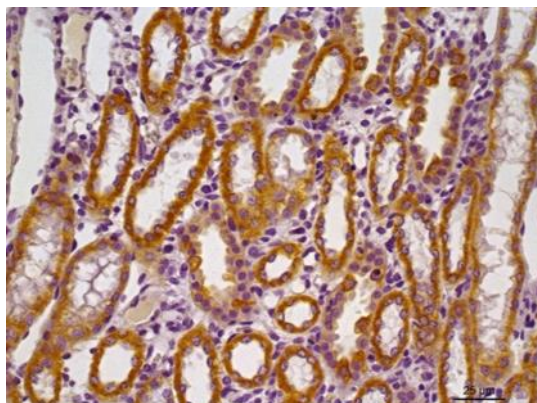


Figura 39. Medula: Segmento grosso da AH grau 4; segmento fino da AH negativo; TC grau 2. Grupo Controllo

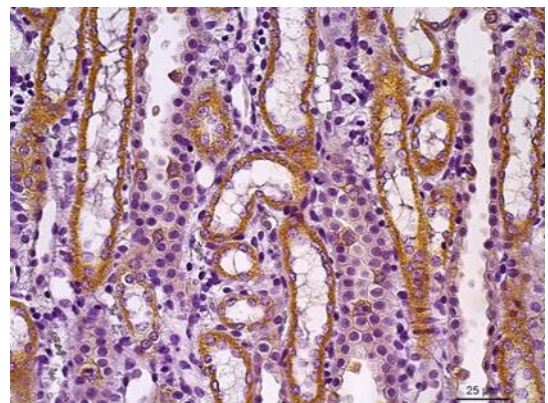


Figura 40. Medula: Segmento grosso da AH grau 4; segmento fino da AH negativo; TC grau 2. Grupo Controllo

No grupo 1 (Quadro 16), todos os animais foram negativos nos glomérulos.

Nos TCP todos os animais exibiram 100% das células epiteliais com imunorreatividade citoplasmática positiva, com uma intensidade de marcação classificada com grau 2. Os TCD exibiram 100% das células epiteliais com imunorreatividade citoplasmática positiva. A intensidade da reação predominante foi de grau 3 em 5 animais.

No que diz respeito ao segmento fino da ansa de Henle, 3 animais (50%) revelaram imunorreatividade positiva, com intensidade de marcação variando entre 1 e 2, já os restantes, foram negativos. As células epiteliais do segmento grosso da ansa de Henle (100%) também exibiram imunorreatividade citoplasmática positiva, com intensidade de coloração de grau 4 em todos os animais.

Neste grupo todos os animais revelaram uma imunorreatividade positiva em 75% das células dos TC, variando a intensidade de marcação entre 1 (2 porcos) e 2 (4 porcos).

Quadro 16. Resultados citocromo c - Grupo 1 (RL)

Porco	Córtex			Medula		TC	Q-score Final
	Glom.	TCP	TCD	Segmento fino da ansa de Henle	Segmento grosso da ansa de Henle		
7	0	2	3	1	4	2	2
8	0	2	3	0	4	1	2
9	0	2	3	0	4	2	2
10	0	2	3	0	4	2	2
11	0	2	4	2	4	2	2
12	0	2	3	2	4	1	2
Intensidade de reação	0	100%	100%	50%(1) 75%(2)	100%	75%	
Média Q-score total							2

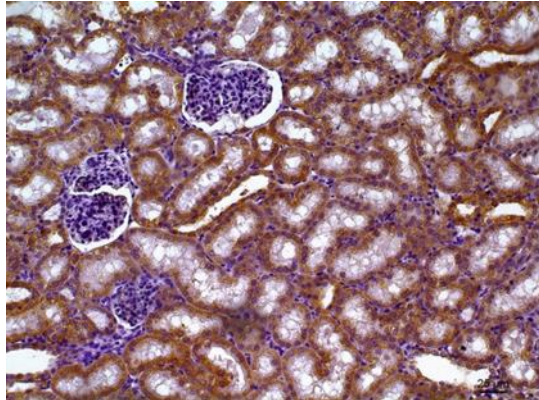


Figura 41. Córtex: Glomérulo negativo; TCP grau 2; TCD grau 3. Grupo 1

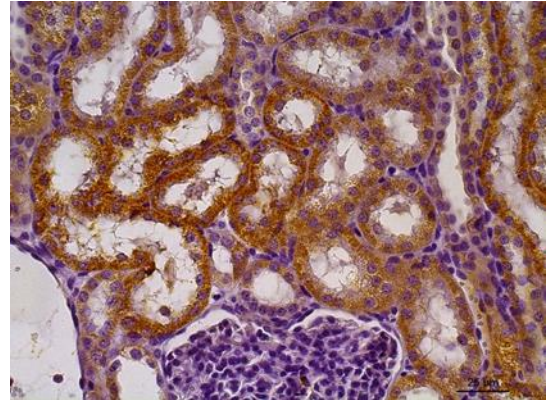


Figura 42. Córtex: Glomérulo negativo; TCP com grau 2; TCD com grau 3. Grupo 1

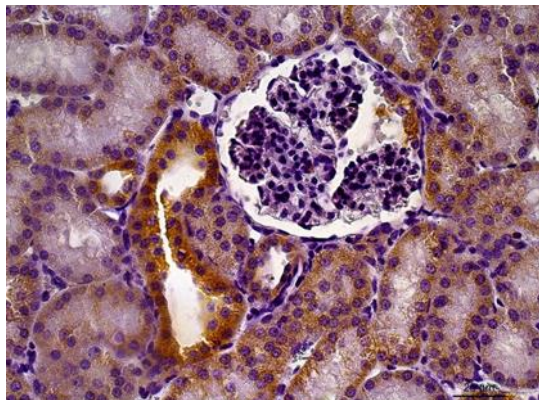


Figura 43. Córtex: Glomérulo negativo; TCP grau 2; TCD grau 4. Grupo

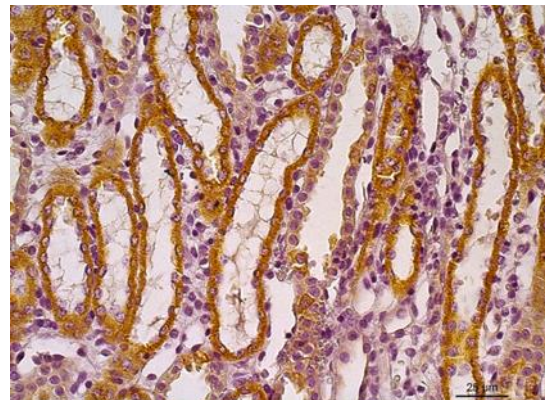


Figura 44. Medula: Segmento grosso da AH grau 4; segmento fino da AH negativo; TC grau 2. Grupo 1

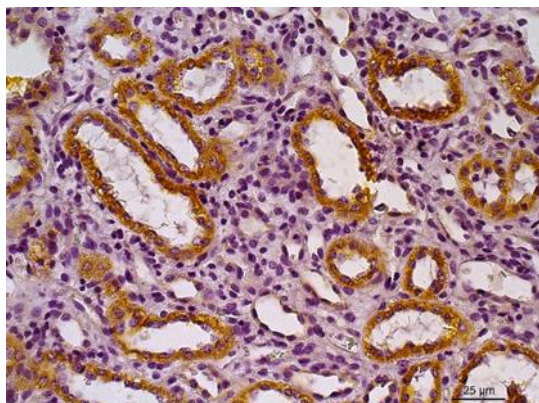


Figura 45. Medula: Segmento grosso da AH grau 4; segmento fino da AH grau 1, TC grau 2. Grupo 1

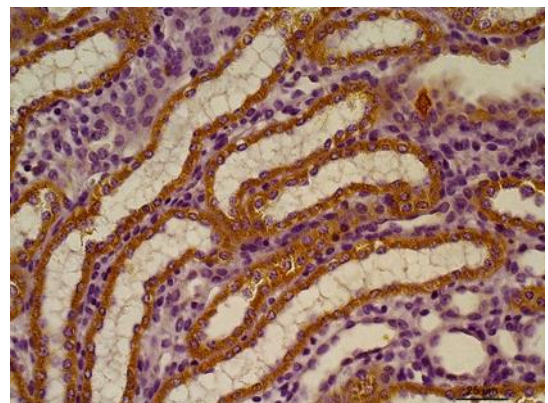


Figura 46. Medula: Segmento grosso da AH grau 4; segmento fino da AH grau 2, TC grau 1. Grupo 1

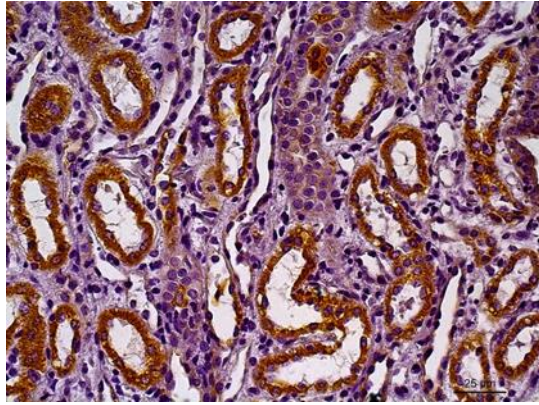


Figura 47. Medula: Segmento grosso da AH com grau 4; segmento fino da AH grau 2; TC grau 2. Grupo 1

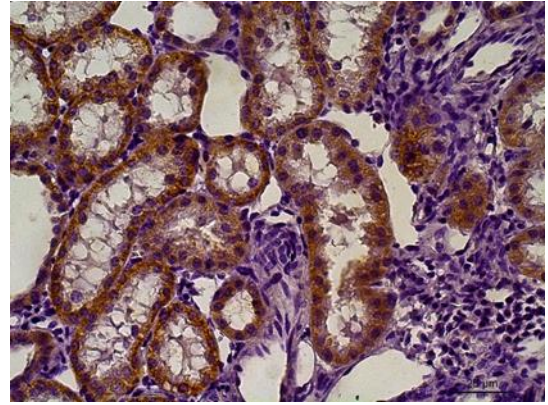


Figura 48 Medula: Segmento grosso da AH com grau 4; segmento fino da AH grau 2. Grupo 1

No grupo 2 (Quadro 17), todos os animais foram negativos nos glomérulos.

Nos TCP, 100% das células epiteliais exibiram imunorreatividade citoplasmática positiva, com intensidade de grau 3 em todos os animais.

Nos TCD, 100% das células epiteliais apresentaram imunorreatividade citoplasmática positiva, com a intensidade da reação 4, também em todos os animais.

No segmento grosso da ansa de Henle, todos os animais exibiram 100% das células com imunorreatividade citoplasmática positiva, com intensidade de reação de grau 4. Já no segmento fino da ansa de Henle, a intensidade do grau de imunorreatividade variou entre 1 (3 porcos) e 2 (3 porcos).

Nos TC, verificou-se uma reação citoplasmática positiva em todos os animais, no entanto a intensidade de reação variou entre 75% (3 porcos) e 100% (3 porcos), com a intensidade de marcação variando entre 1 e 2.

Quadro 17. Resultados citocromo c – Grupo 2 (HES)

Porco	Córtex			Medula		TC	Q-score Final
	Glom.	TCP	TCD	Segmento fino da ansa de Henle	Segmento grosso da ansa de Henle		
13	0	3	4	1	4	1	2
14	0	3	4	1	4	1	2
15	0	3	4	2	4	2	3
16	0	3	4	1	4	1	2
17	0	3	4	2	4	2	3
18	0	3	4	2	4	2	3
Intensidade de reação	0	100%	100%	50%(4) 75%(2)	100%	75% (3) 100%(3)	
Média Q-score total							2,5

Analisando os Q-Score finais dos três grupos pôde concluir-se que o grupo 1, com uma média Q-score de 2, revelou-se menor, comparativamente ao HES com 2,5. O grupo 2 registou Q-scores mais elevados que o 1.

Os grupos 1 e 2 quando comparados com o grupo controlo foram superiores, no entanto, quando comparados entre si, não houve diferenças estatisticamente significativas entre o grupo Controlo e o grupo 1 ou entre o grupo 1 e o grupo 2, registando-se apenas diferença significativa ($p < 0,05$) entre o Controlo e o 2.

Quadro 18. Resultado estatisticamente significativo do grupo 2 comparativamente ao grupo controlo.

Citocromo C

Controlo vs LR $P > 0,05$

Controlo vs HES $P < 0,05$

$P = 0,035$

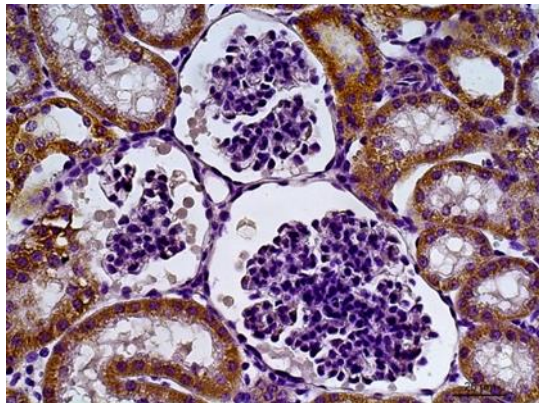


Figura 49. CórteX: Glomérulos negativos; TCP grau 3; TCD grau 4. Grupo 2

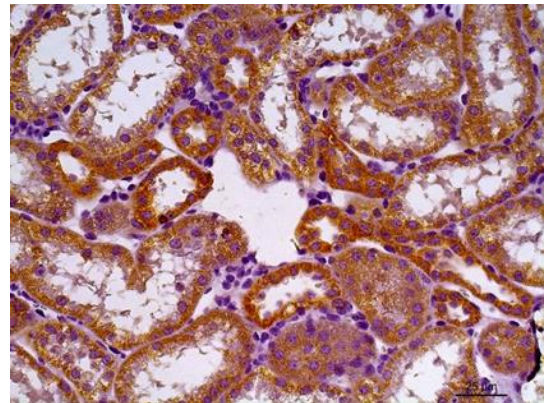


Figura 50. CórteX: TCP grau 3; TCD grau 4. Grupo 2

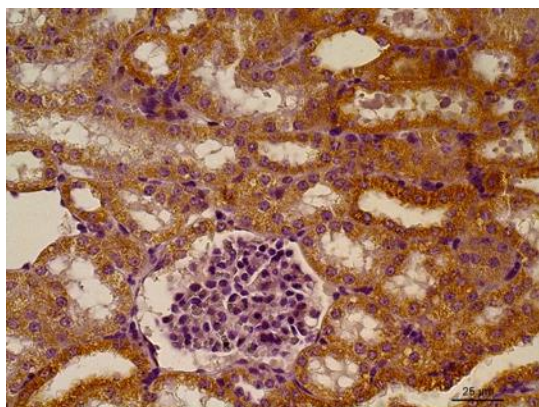


Figura 51. CórteX: Glomérulo negative; TCP grau 3; TCD grau 4. Grupo 2

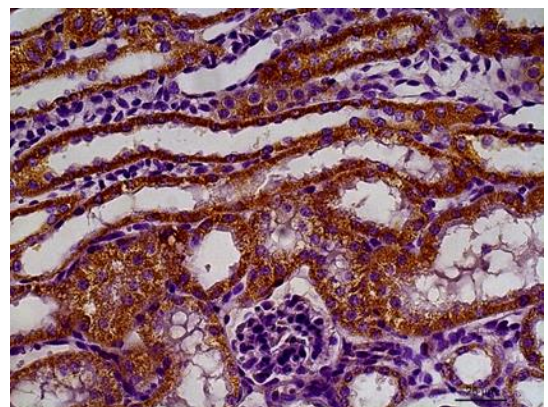


Figura 52. CórteX: Glomérulo negative; TCP grau 3; TCD grau 4. Grupo 2

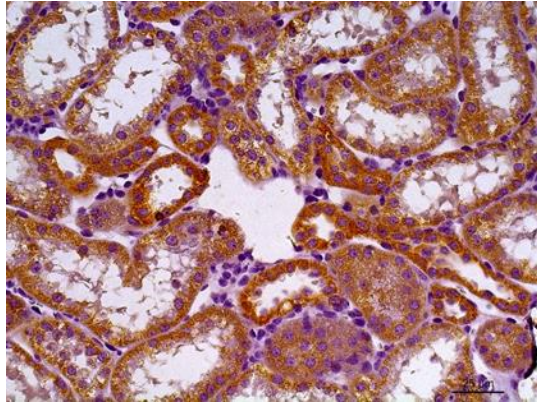


Figura 53. Córtex: TCP grau 3; TCD grau 4. Grupo 2

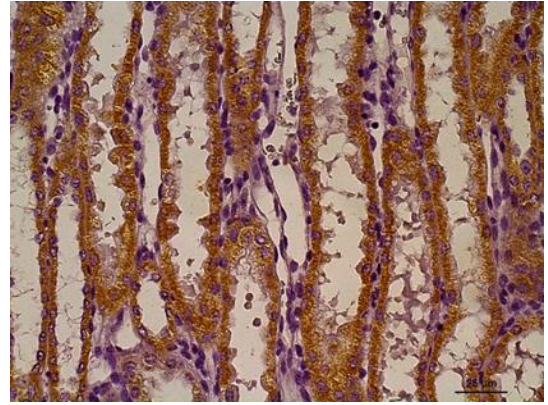


Figura 54. Medula: Segmento grosso da AH grau 4; segmento fino da AH grau 1. Grupo 2

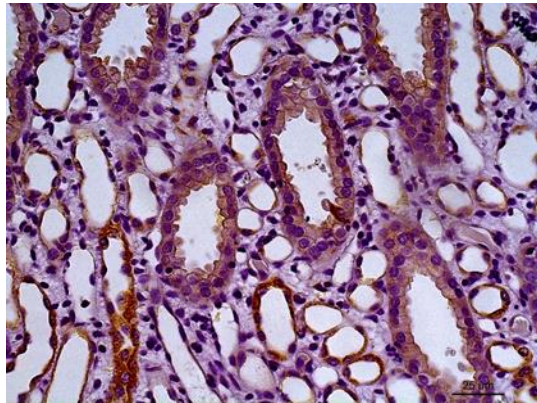


Figura 55. Medula: Segmento grosso da AH grau 4; segmento fino da AH grau 1, TC grau 2. Grupo 1

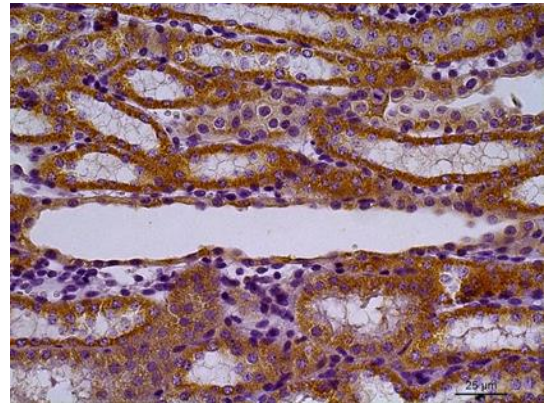


Figura 56. Medula: Segmento grosso da AH grau 4; segmento fino da AH grau 2, TC grau 1. Grupo 1

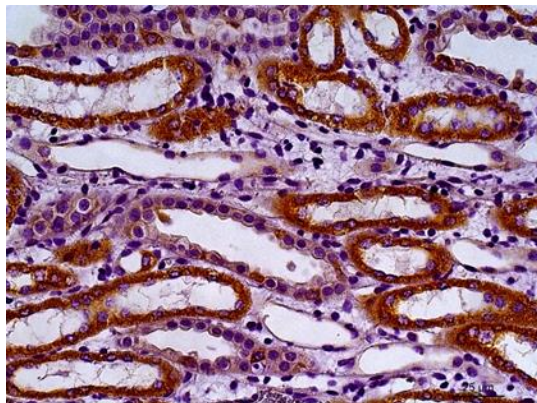


Figura 57. Medula: Segmento grosso da AH grau 4; segmento fino da AH grau 2; TC grau 2. Grupo 2

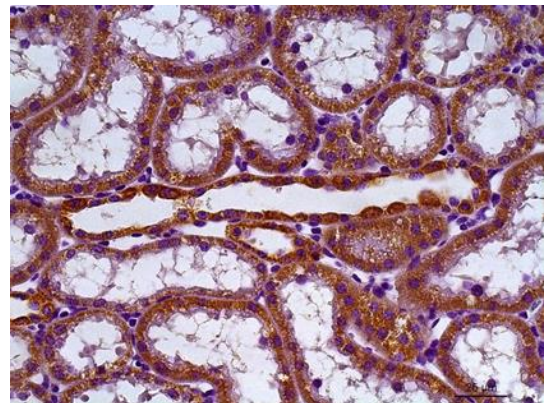


Figura 58. Medula: Segmento grosso da AH grau 4; segmento fino da AH grau 2. Grupo 2

4.3. TUNEL

No TUNEL, apesar de existirem pequenas variâncias nos glomérulos, nos TCP e TCD, e nos segmentos finos e grossos da ansa de Henle, nos TC verifica-se uma diferença mais significativa entre os grupos.

No grupo Controlo (Quadro 19), tanto os TCP como os TCD foram negativos a esta técnica em todos os animais. Já nos glomérulos, houve um animal que exibiu imunorreatividade positiva de grau 1, sendo todos os outros negativos.

Ambos os segmentos da ansa de Henle, exibiram 100 % das células com imunorreatividade citoplasmática positiva, também em apenas um animal, com intensidade de reação de grau 2.

Os TC foram a única estrutura que revelou um maior número de animais (5 porcos) com reação citoplasmática positiva em 100% das células epiteliais. A intensidade de marcação nestas estruturas variou entre 1 (1 porco), 2 (2 porcos), 3 (1 porco) e 4 (1 porco).

Quadro 19. Resultados Q-score TUNEL - Grupo Controlo

Porco	Córtex			Medula		TC	Q-score
	Glom.	TCP	TCD	Segmento fino da ansa de Henle	Segmento grosso da ansa de Henle		
1	1	0	0	0	0	2	1
2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	4	1
4	0	0	0	0	0	2	0
5	0	0	0	0	0	3	1
6	0	0	0	2	2	1	1
Intensidade de reação	<25%	0	0	100%	100%	100%	
Média Q-score total							0,67

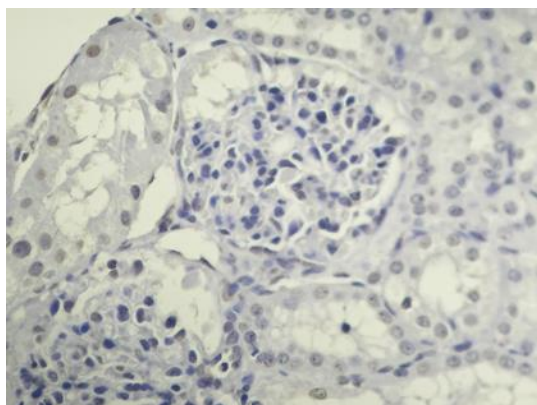


Figura 59. CórTEX: Glomérulo grau 1. Grupo Controlo

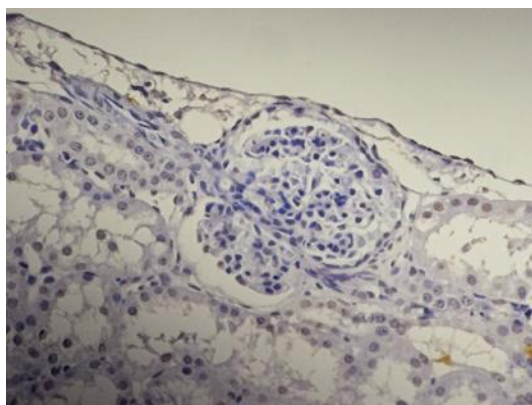


Figura 60. CórTEX: Glomérulo grau 1. Grupo Controlo

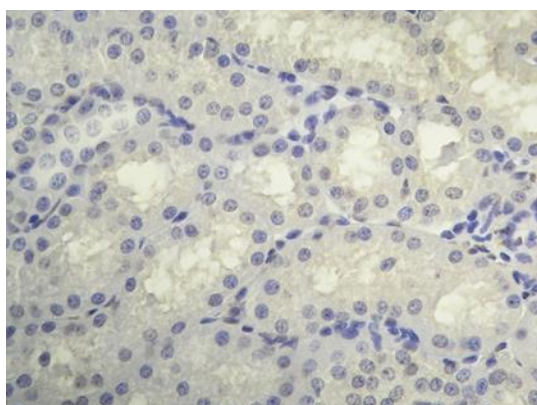


Figura 61. CórTEX: TCP e TCD negativos. Grupo Controlo

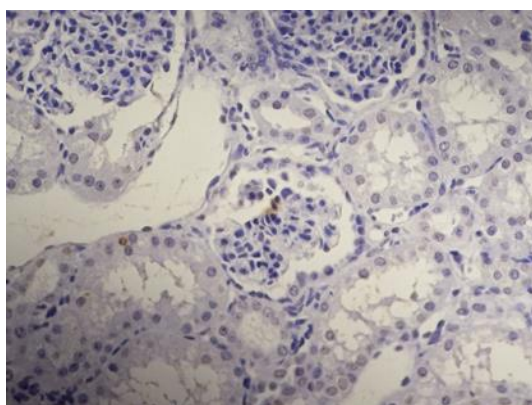


Figura 62. CórTEX: TCP e TCD com algumas células com grau 2. Grupo Controlo

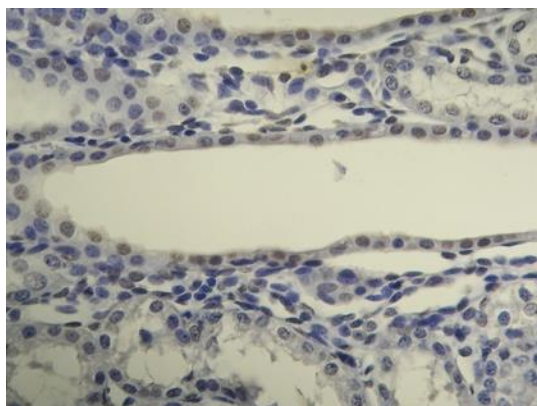


Figura 63. Medula: Segmento grosso da AH negativo, Segmento fino da AH negativo; TC grau 3. Grupo Controlo

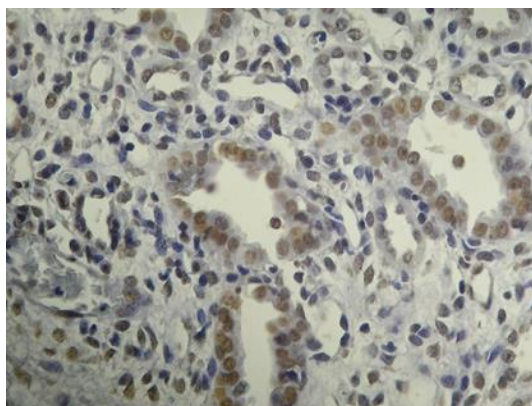


Figura 64. Medula: Segmento grosso da AH grau 3; Segmento fino da AH grau 3; TC grau 4. Grupo Controlo

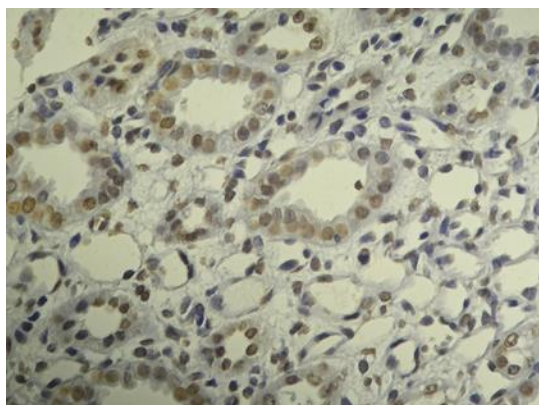


Figura 65. Medula: Segmento grosso da AH grau 3; Segmento fino da AH com grau 3; TC com grau 4. Grupo Controlo

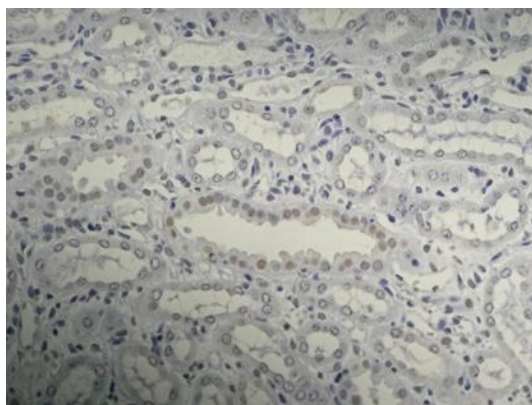


Figura 66. Medula: Segmento grosso da AH e Segmento fino da AH negativos; TC com grau 3. Grupo Controlo

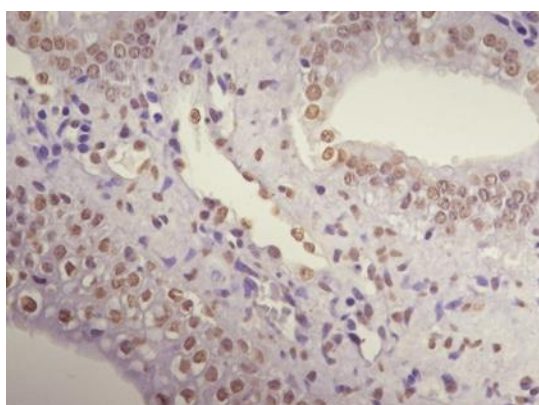


Figura 67. Medula: Um Segmento fino da AH com grau 3; TC com grau 3. Grupo Controlo

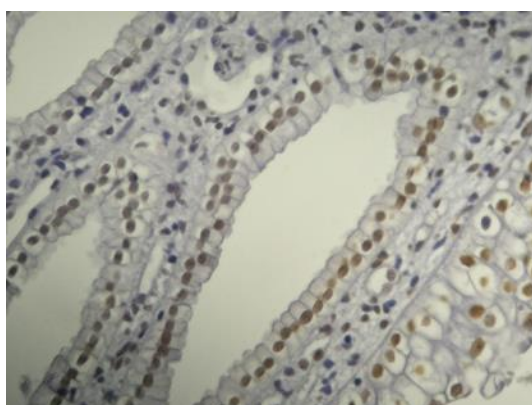


Figura 68. Medula: TC com grau 4. Grupo Controlo

No grupo 1 (Quadro 20), os glomérulos exibiram 25% das células com imunorreatividade positiva de grau 2 num animal apenas. À semelhança dos glomérulos, tanto os TCP como os TCD, exibiram 75% das células epiteliais com imunorreatividade citoplasmática positiva, com intensidade de grau 2 também apenas num animal, sendo os restantes negativos. Ambos os segmentos da ansa de Henle, exibiram 100 % das células com imunorreatividade citoplasmática positiva, também em apenas um porco, com intensidade de reação de grau 2 e 3, respetivamente.

Os TC à semelhança do grupo controlo, foram a única estrutura que revelou um maior número de animais (5 porcos) com reação citoplasmática positiva em 100% das células epiteliais. A intensidade de coloração nestas estruturas variou entre 1 (2 porcos), 2 (2 porcos) e 3 (1 porco).

Quadro 20. Resultados Q-score TUNEL - Grupo 1 (RL)

Porco	Córtex			Medula		TC	Q-score
	Glom.	TCP	TCD	Segmento fino da ansa de Henle	Segmento grosso da ansa de Henle		
7	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	2	0
9	0	0	0	0	0	2	0
10	2	2	2	2	3	3	2
11	0	0	0	0	0	1	0
12	0	0	0	0	0	1	0
Intensidade de reação	25%	75%	75%	100%	100%	100%	
Média Q-score total							0,33

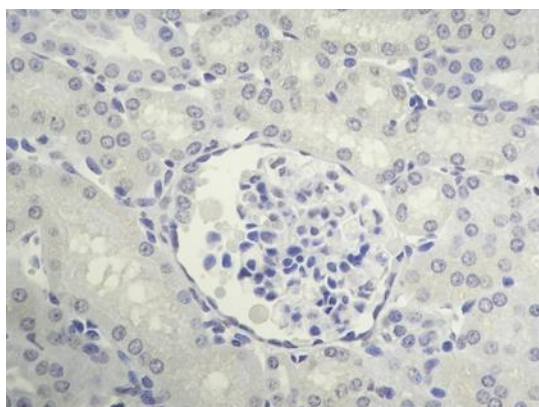


Figura 69. Córtex: Glomérulo, TCP e TCD negativos. Grupo 1

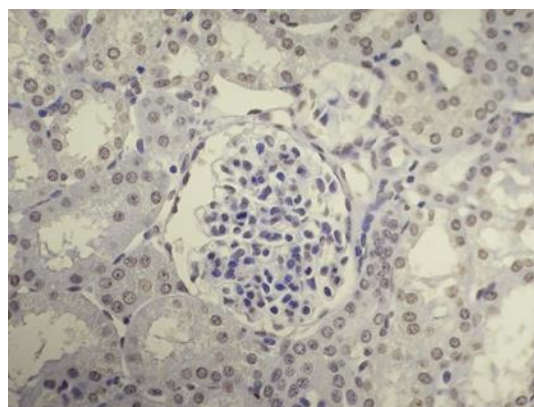


Figura 70. Córtex: Glomérulo, TCP e TCD grau 2. Grupo 1

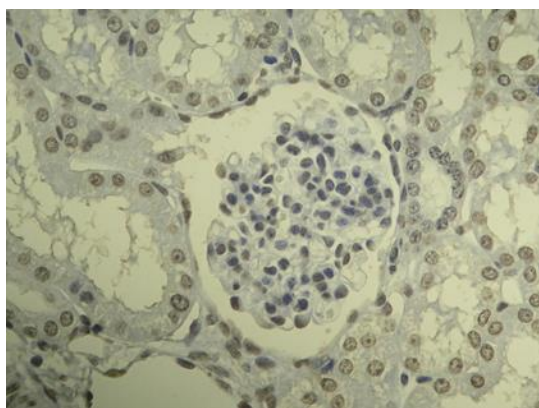


Figura 71. Córtex: Glomérulo, TCP e TCD grau 2. Grupo 1

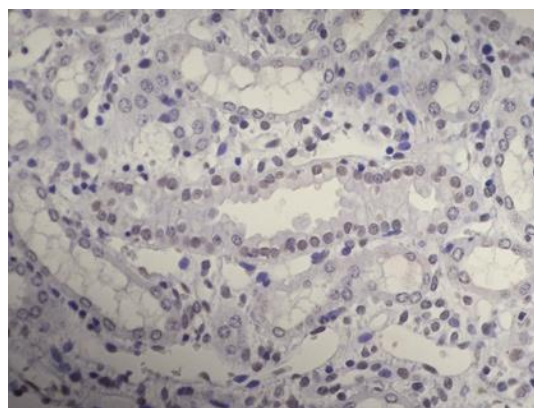


Figura 72. Medula: TC negativos. Grupo 1

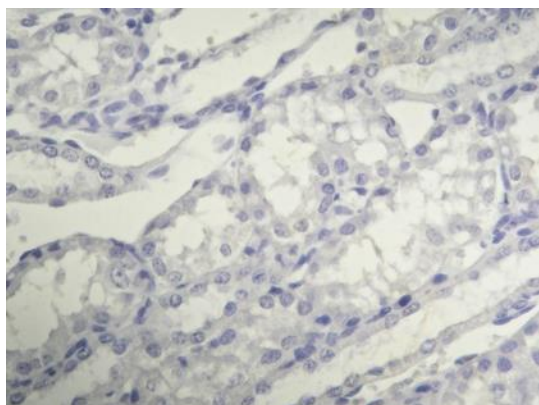


Figura 73. Medula: Segmento grosso da AH, segmento fino da AH e TC negativos. Grupo 1

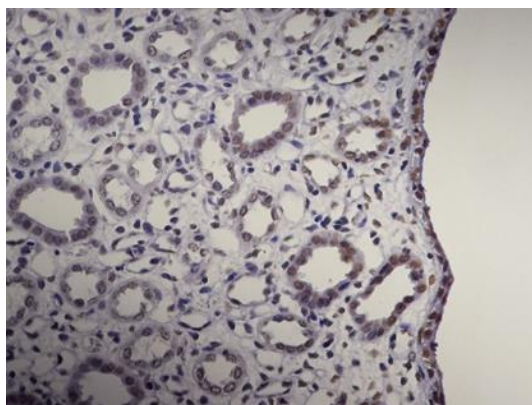


Figura 74. Medula: TC grau 3. Grupo 1

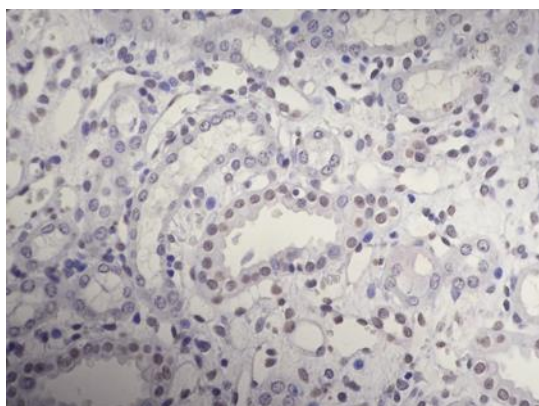


Figura 75. Medula: Segmento grosso da AH grau 2; Segmento fino da AH grau 2; TC grau 3. Grupo 1

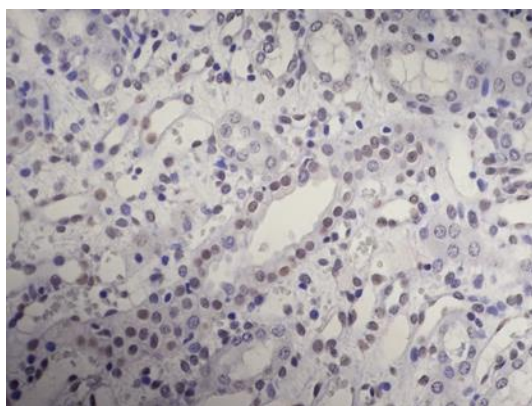


Figura 76. Medula: TC grau 2. Grupo 1

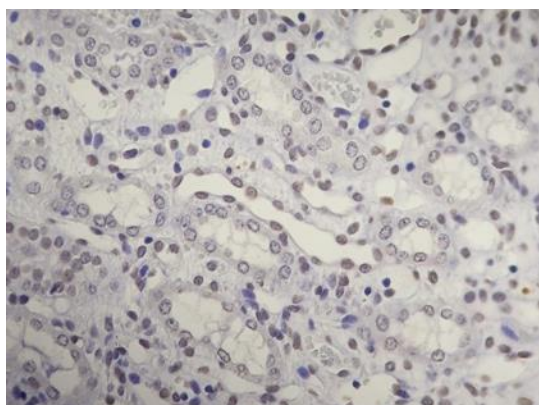


Figura 77. Medula: Um segmento fino da AH grau 2; TC negativos. Grupo 1

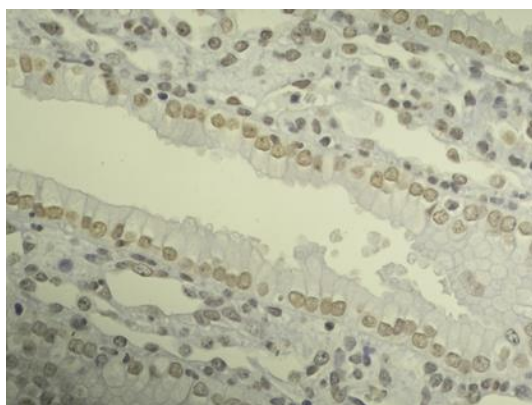


Figura 78. Medula: TC grau 4. Grupo 1

No grupo 2 (Quadro 21), à semelhança do grupo 1 nos glomérulos, apenas um animal apresentou imunorreatividade positiva em <25% das células epiteliais.

Neste grupo, tanto os TCP como os TCD, exibiram 75% das células epiteliais com imunorreatividade citoplasmática positiva e com intensidade de grau 1 em apenas um animal.

Ambos os segmentos da ansa de Henle, exibiram 75 % das células com imunorreatividade citoplasmática positiva, também num animal, com intensidade de reação de grau 3.

Os TC foram a única estrutura que revelou reação citoplasmática positiva em todos os animais e em 100% das células epiteliais. A intensidade de marcação nestas estruturas variou entre 2 (2 porcos) e 3 (4 porcos).

Quadro 21. Resultados Q-score TUNEL – Grupo 2 (HES)

Porco	Córtex			Medula		TC	Q-score	
	Glom.	TCP	TCD	Segmento fino da ansa de Henle	Segmento grosso da ansa de Henle			
13	0	0	0	0	0	2	0	
14	0	0	0	0	0	2	0	
15	0	0	0	0	0	2	0	
16	0	0	0	0	0	3	1	
17	0	0	0	0	0	2	0	
18	1	1	1	3	3	3	2	
Intensidade de reação	<25%	75%	75%	75%	75%	100%		
Média Q-score total								0,5

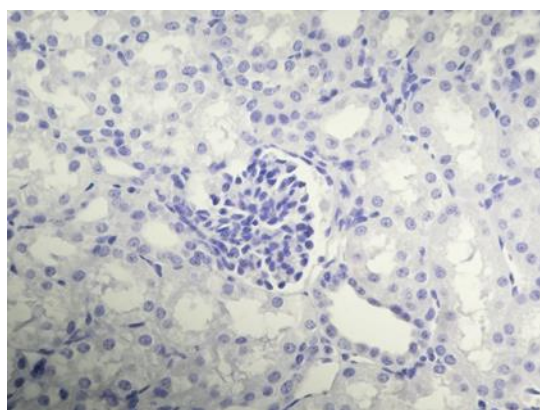


Figura 79. Córtex: Glomérulo, TCP e TCD negativos. Grupo 2

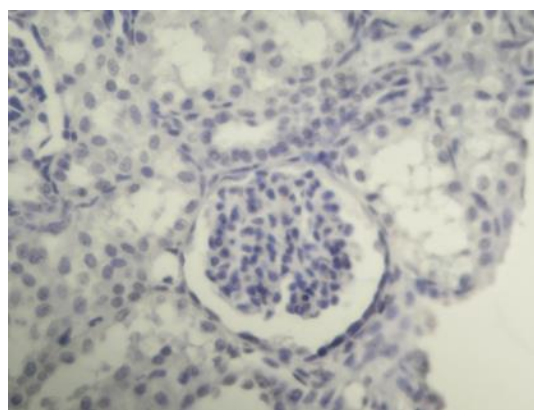


Figura 80. Córtex: Glomérulo negativo; TCP e TCD grau 1. Grupo 2

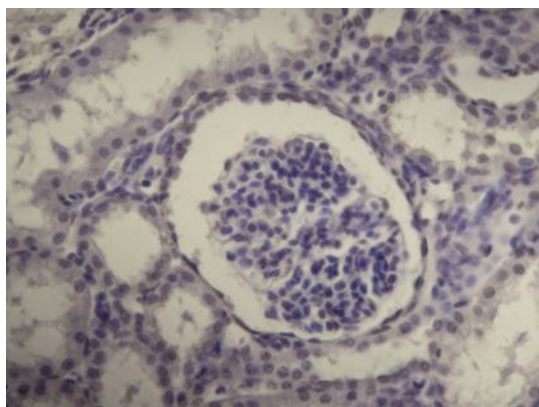


Figura 81. CórteX: Glomérulo grau 1. Grupo 2

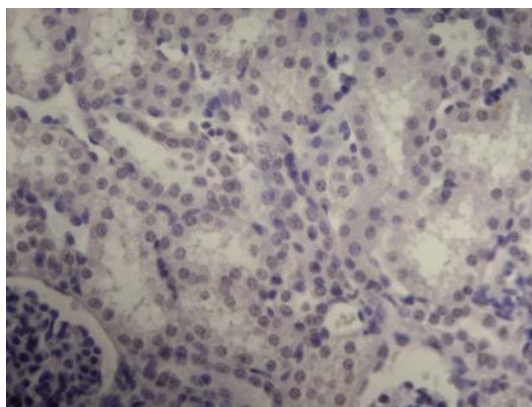


Figura 82. CórteX: Glomérulo, TCP e TCD grau 1. Grupo 2

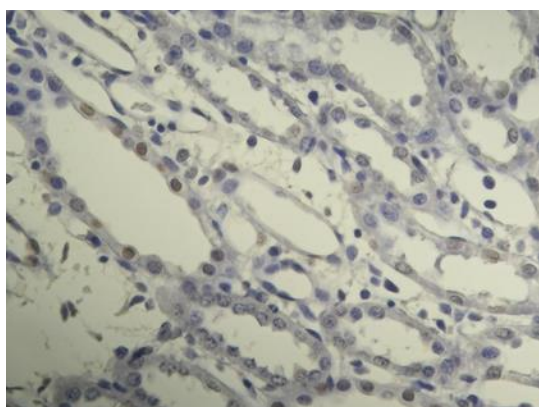


Figura 83. Medula: TC grau 3. Grupo 2

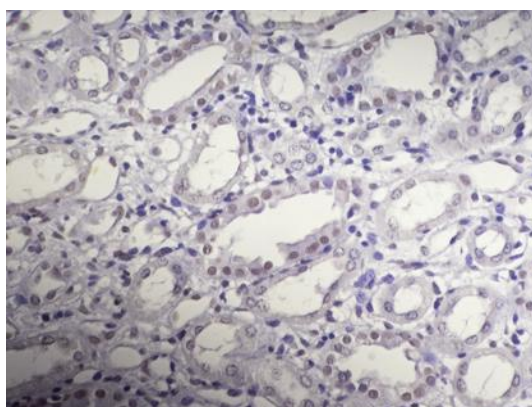


Figura 84. Medula: Segmento grosso da AH negativo; Segmento fino da AH grau 3; TC grau 3. Grupo 2

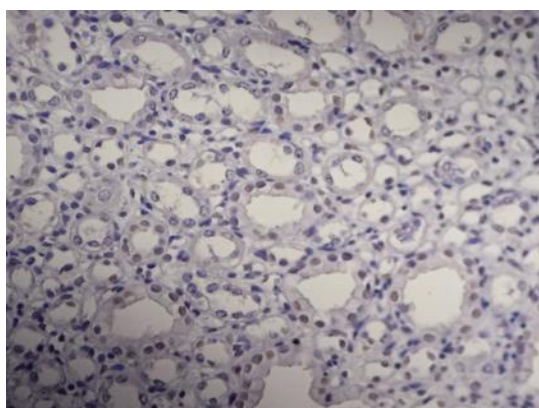


Figura 85. Medula: TC grau 3. Grupo 2

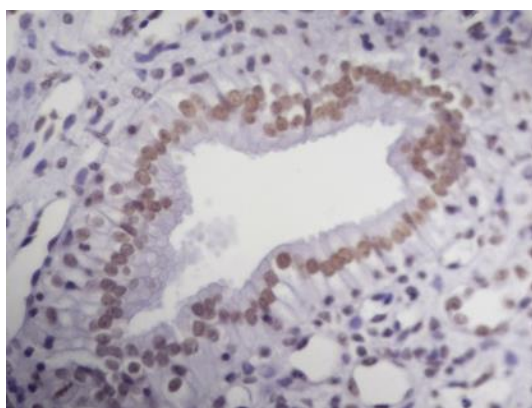


Figura 86. Medula: TC grau 4. Grupo 2

Avaliando os três grupos podemos afirmar que o valor da média Q-score final dos porcos foi menor no 1 (0,33), comparativamente ao grupo controlo (0.67) e ao grupo 2 (0.5). Pode ainda afirmar-se que no Q-score final calculado para as estruturas, é de extrema importância notar que o valor do grupo 1 nos túbulos coletores de 1,5 comparativamente ao controlo, foi menor, sendo que no grupo controlo o valor foi de 2 nos TC.

Quando comparados entre si, os Q-score de todos os grupos apresentaram valores de P superiores a 0,05, portanto não significativos estatisticamente.

Quadro 22. Resultados High-Score da técnica TUNNEL

TUNEL	Porco	H-score estruturas		Células apoptóticas		% de Células apoptóticas		Células Apoptóticas/mm ²	
		C	M	C	M	C	M	C	M
Controlo	1	25,54	39,54	186	387	18,11	25,21	395,72	823,35
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	99,97	0	632	0	31,63	0	1.344,60
	4	0	65,9	0	451	0	27,19	0	959,51
	5	0	82,33	0	645	0	35,15	0	1.372,25
	6	0	165,21	0	822	0	58,09	0	1.747,82
Grupo 1 – RL	7	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	45,2	0	265	0	17,62	0	563,79
	9	0	15,77	0	233	0	15,96	0	495,71
	10	148,26	203,57	855	1240	61,47	79,9	1.819,03	2.638,13
	11	0	9,13	0	157	0	8,75	0	334,02
	12	0	17,55	0	275	0	16,4	0	584,73
Grupo 2 - HES	13	0	21,28	0	481	0	25,34	0	1.023,34
	14	0	125,58	0	1031	0	61,7	0	2.193,48
	15	0	118,63	0	834	0	64,9	0	1.773,34
	16	0	78,87	0	657	0	36,48	0	1.397,78
	17	0	37,65	0	519	0	34,67	0	1.104,18
	18	16,51	189,95	278	1131	15,6	60,35	591,45	2.406,23

Quadro 23. Média dos resultados obtidos no Córtex e na Medula renal no High-Score da técnica TUNNEL

Médias TUNEL	Porco	H-score total	Total células	% T
Controlo	1	32,54	573	48
	2	0	0	0
	3	49,99	632	32
	4	32,95	451	27
	5	41,2	645	35
	6	82,6	822	59
Grupo 1 RL	7	0	0	0
	8	22,6	265	18
	9	7,89	233	16
	10	175,9	2095	100
	11	4,57	157	0,08
	12	8,77	275	16
Grupo 2 HES	13	10,64	481	25
	14	62,79	1031	62
	15	59,32	834	65
	16	39,44	657	36
	17	18,83	519	35
	18	103,23	1409	85

Analisando os H-score de todos os grupos, podemos afirmar que, embora os valores registados no grupo 2 sejam quase sempre superiores aos restantes grupos, não foram de facto encontradas diferenças significativas entre eles, tanto no córtex como na medula.

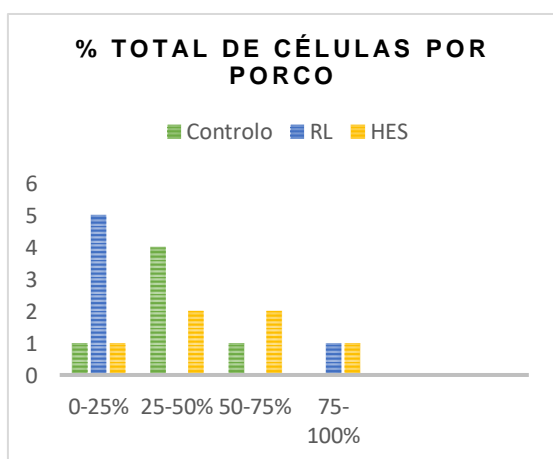


Figura 87. Gráfico High - score da percentagem de células positivas por grupo experimental

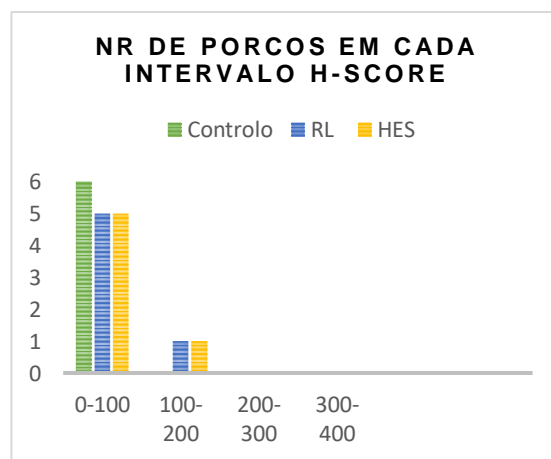


Figura 88. Gráfico High - score do nr de porcos existente em cada intervalo avaliado por grupo experimental

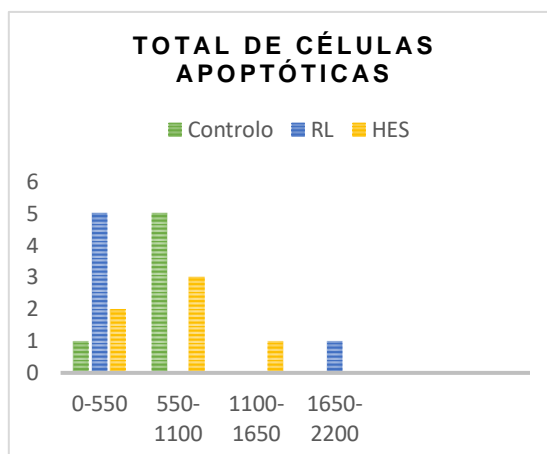


Figura 89. Gráfico High - score do total de células apoptóticas por grupo experimental

4.4. M30

Os glomérulos, os TCD e o segmento fino da ansa de Henle foram sempre negativos ao M30 em todos os grupos experimentais.

No grupo controlo (Quadro 24), apenas um animal exibiu imunorreatividade positiva nos TCP e nos TC com Q-score 2 e 1 respetivamente, ambos em menos de 25% das células epiteliais, sendo os restantes negativos em todas as estruturas.

Quadro 24. Resultados Q-score M30 - Grupo Controlo

Porco	Córtex			Medula			TC	Q-score
	Glom.	TCP	TCD	Segmento fino da ansa de Henle	Segmento grosso da ansa de Henle			
1	0	2	0	0	0	0	1	1
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
Intensidade de reação	0	<25%	0	0	0	0	<25%	
Média Q-score total								0,17

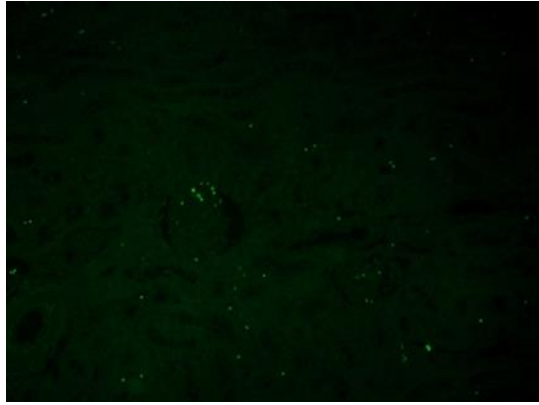


Figura 90. CórteX: Glomérulo negativo; TCP grau 1. Grupo Controllo

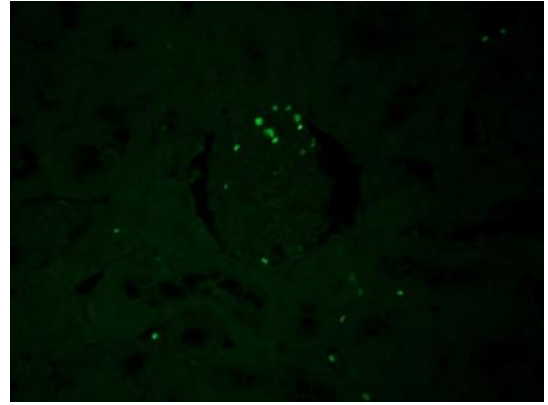


Figura 91. CórteX: Glomérulo negativo TCP grau 1. Grupo Controllo

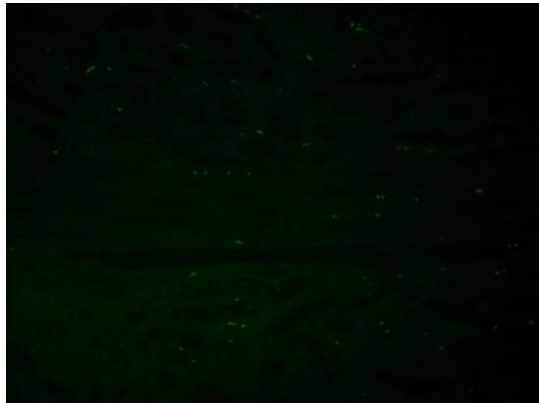


Figura 92. Medular negativa. Grupo Controllo

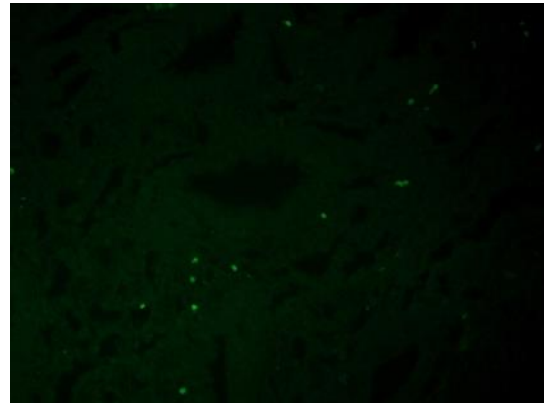


Figura 93. Medular negativa. Grupo Controllo

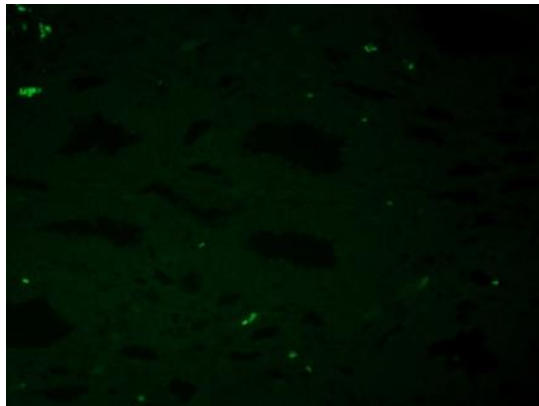


Figura 94. Medular negativa. Grupo Controllo

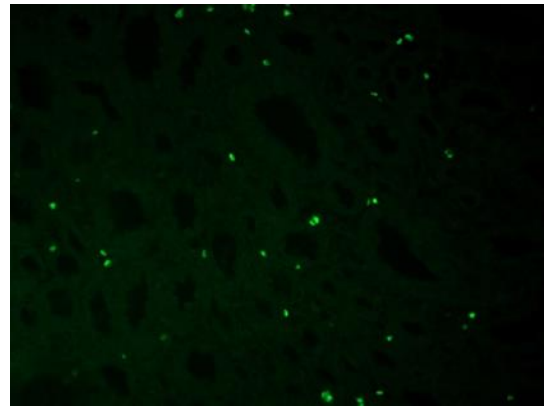


Figura 95. Medular negativa. Grupo Controllo

No grupo 1 (Quadro 25), os glomérulos e os TCD foram sempre negativos.

Nos TCP observaram-se animais com percentagem de reação nas células epiteliais de 100%, exibindo uma imunorreatividade citoplasmática positiva que variou no grau de intensidade entre 3 (1 porco) e 2 (3 porcos).

Neste grupo, apenas um animal exibiu 100% das células com imunorreatividade citoplasmática no segmento grosso da ansa de Henle, com grau 2. O segmento fino da ansa de Henle revelou-se negativo a este método.

Nos TC apesar de existirem alguns animais com células positivas, estas foram de grau 1 em 25%, o que resultou num Q-score negativo.

Quadro 25. Resultados Q-score M30 - Grupo 1 (RL)

Porco	Córtex			Medula		TC	Q-score
	Glom.	TCP	TCD	Segmento fino da ansa de Henle	Segmento grosso da ansa de Henle		
7	0	2	0	0	2	0	1
8	0	2	0	0	0	0	0
9	0	2	0	0	0	0	0
10	0	3	0	0	0	0	1
11	0	2	0	0	0	0	0
12	0	2	0	0	0	0	0
Intensidade de reação	0	100%	0	0	100%	0	
Média Q-score total	0	2,16	0	0	0,33	0	0,33

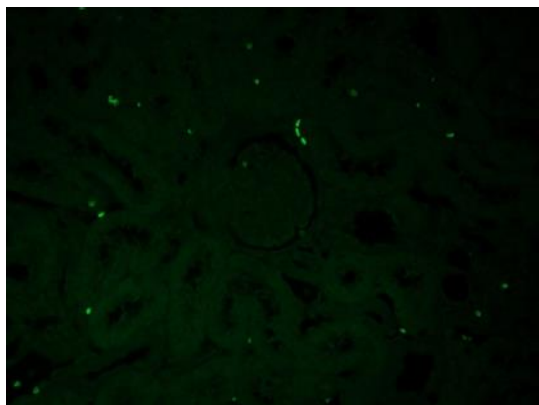


Figura 96. Córtex: Glomérulo negativo; TCP grau 1. Grupo 1

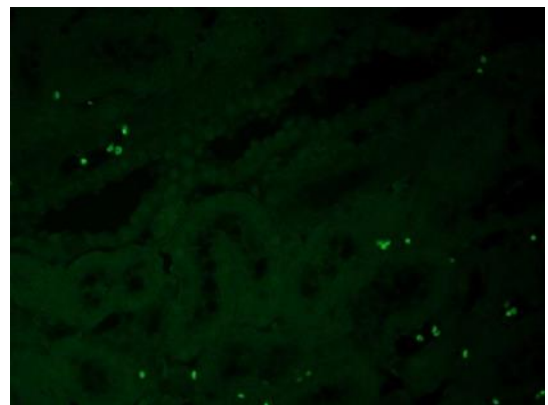


Figura 97. Córtex: TCP grau 1. Grupo 1

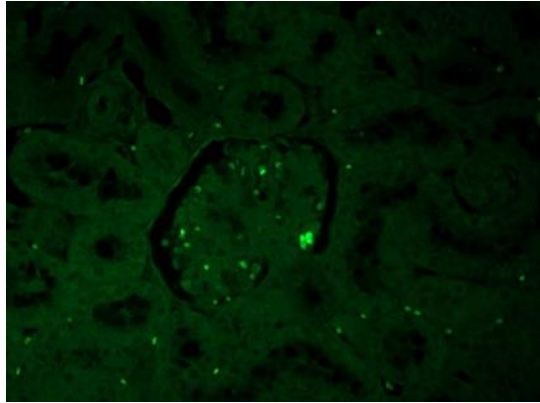


Figura 98. CórteX: Glomérulo negativo; TCP grau 2. Grupo 1

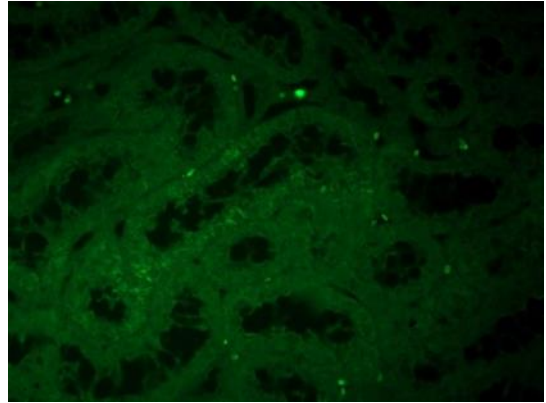


Figura 99. CórteX: TCP grau 3. Grupo 1

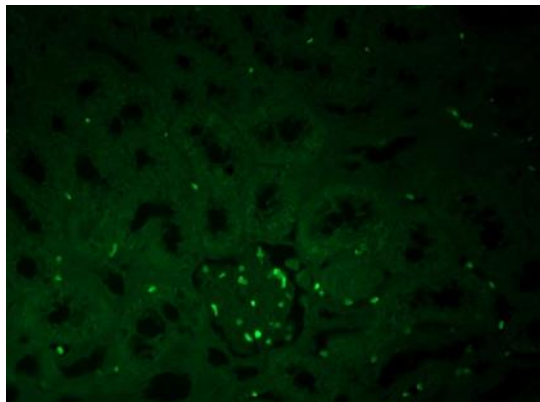


Figura 100. CórteX: Glomérulo negativo; TCP grau 3. Grupo 1

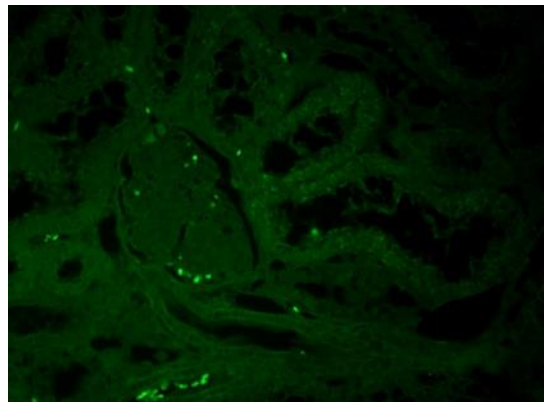


Figura 101. CórteX: Glomérulo negativo; TCP grau 3. Grupo 1

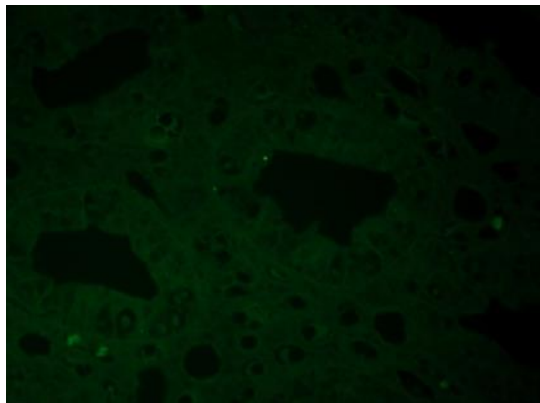


Figura 102. Medular negativa. Grupo 1

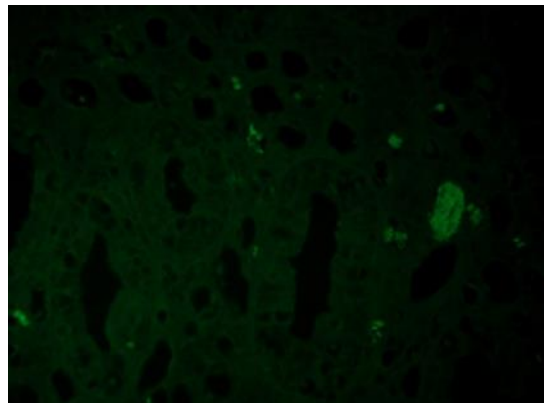


Figura 103. Medular negativa. Grupo 1

No grupo 2 (Quadro 26), à semelhança do grupo 1, os glomérulos e os TCD foram negativos, no entanto observou-se imunorreatividade positiva nos TCP de todos os animais. A intensidade de coloração nesta estrutura foi diferente entre os animais, variando entre o grau 3 (3 porcos) e grau 4 (3 porcos).

Neste grupo, 4 animais exibiram imunorreatividade positiva em 100% das células do segmento grosso da ansa de Henle com grau de intensidade de 2 predominante. Dois animais foram negativos nesta estrutura. O segmento fino da ansa de Henle foi negativo a este método.

Nos TC apenas um pequeno número de células (<25%) exibiu imunorreatividade positiva com intensidade de reação 1, em quase todos os animais (5 porcos), com exceção de um animal que se revelou negativo.

Quadro 26. Resultados Q-score M30 – Grupo 2 (HES)

Porco	Córtex			Medula		TC	Q-score
	Glom.	TCP	TCD	Segmento fino da ansa de Henle	Segmento grosso da ansa de Henle		
13	0	4	0	0	3	1	1
14	0	3	0	0	2	1	1
15	0	3	0	0	2	1	1
16	0	4	0	0	0	1	1
17	0	3	0	0	0	0	1
18	0	4	0	0	2	1	1
Intensidade de reação	0	100%	0	0	100%	<25%	
Média Q-score total	0	3,5	0	0	1,5	1	1

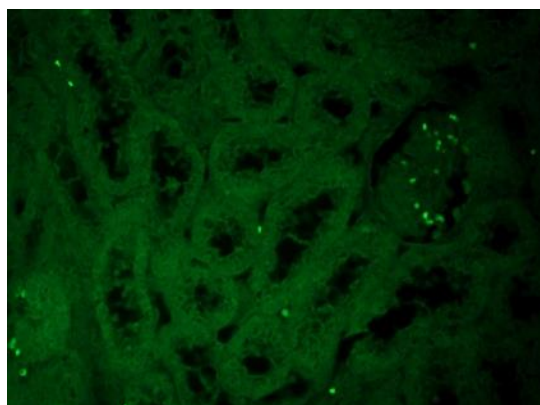


Figura 104. Córtex: Glomérulo negativo; TCP grau 4. Grupo 2

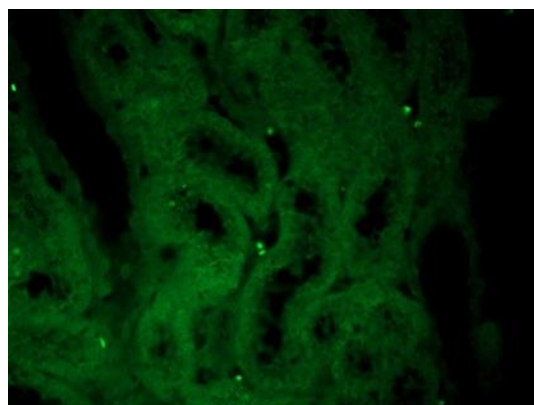


Figura 105. Córtex: Glomérulo negativo; TCP grau 4. Grupo 2

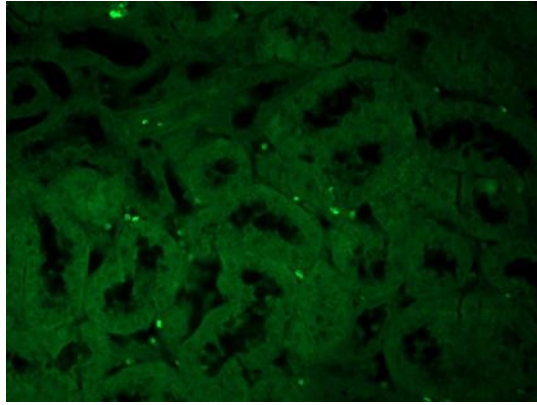


Figura 106. Córtex: TCP grau 4. Grupo 2

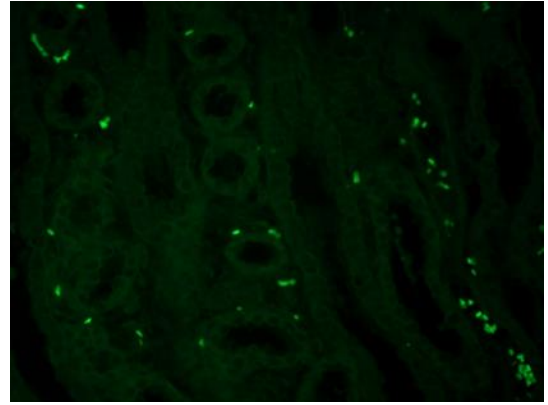


Figura 107. Medula: Segmento grosso da AH grau 2; TC grau 2. Grupo 2

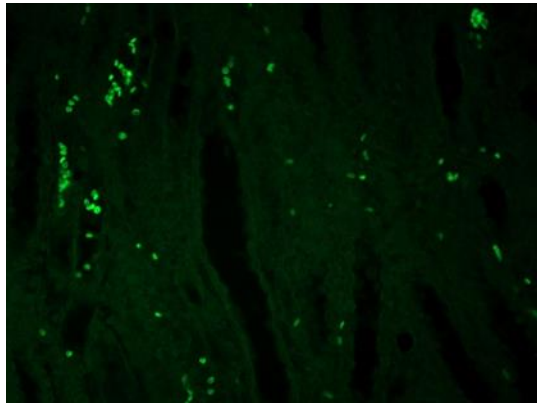


Figura 108. Medula: AH negativa. Grupo 2

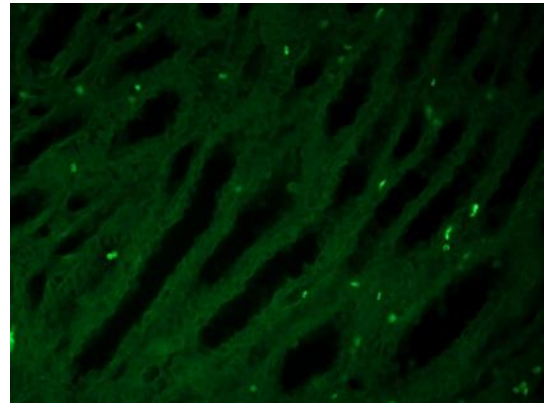


Figura 109. Medula: Segmento grosso da AH grau 2; TC grau 2. Grupo 2

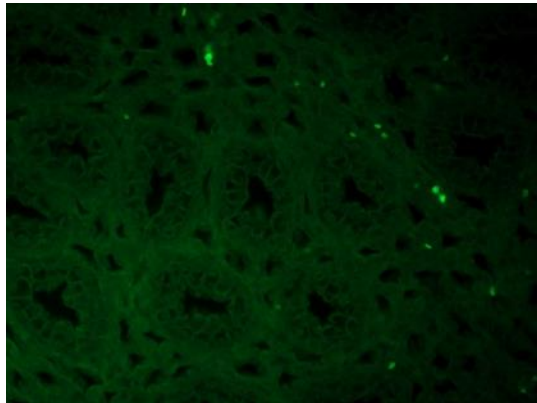


Figura 110. Medula: TC grau 3. Grupo 2

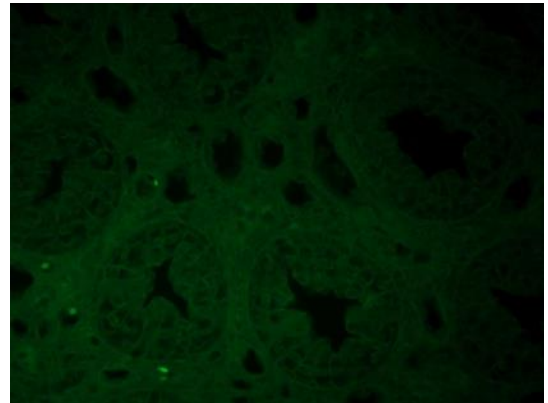


Figura 111. Medula: TC grau 3. Grupo 2

Quadro 27. Resultados High-Score da técnica M30

	Porco	H-score		Células apoptóticas		% de células apoptóticas		Células Apoptóticas/mm ²	
		C	M	C	M	C	M	C	M
Controlo	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0
Grupo 1 - RL	7	142,85	67,23	1890	1331	71,95	59,1	4.021,02	2.831,73
	8	59,15	6,64	1217	164	57,79	7,19	2.589,20	348,91
	9	11,79	0	273	0	12,21	0	580,81	0
	10	93,12	0	779	0	35,8	0	1.656,39	0
	11	83,34	0	952	0	41,36	0	2.025,40	0
	12	69,33	0	813	0	35,39	0	1.729,68	0
Grupo 2 - HES	13	271,56	139,9	2069	950	75,26	51,6	4.401,85	2.021,15
	14	192,87	139,2	1434	1575	67,71	69,94	3.050,87	3.350,85
	15	237,73	135,62	1542	1544	81,89	58,15	3.280,64	3.283,01
	16	338,76	101,38	1795	910	85,72	47,77	3.818,91	1.936,05
	17	181,65	0	1739	0	60,44	0	3.699,76	0,00
	18	289,59	88,37	1942	1161	73,06	44,48	4.131,65	2.470,06

Na avaliação dos H-score, o grupo controlo revelou-se sempre negativo, em todos os porcos e em todos os grupos. No grupo 1, todos os porcos foram positivos no córtex, no entanto, apesar de ser quase todos se terem revelado negativos na medula, houve dois porcos positivos, onde um deles (porco 8) se revelou negativo ao cálculo do Q-score por revelar muito poucas células contadas no H-score (H-score total de 6,64).

No que diz respeito ao H-score do grupo 2, todos os animais tiveram células positivas, tanto no córtex como na medula, tendo sido o grupo com mais células e maior grau de intensidade contadas.

Quadro 28. Média dos resultados obtidos no Córtex e na Medula renal no High-Score da técnica M30

Médias M30	Porco	H-score total	Total células	% T
Controlo	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	0	0	0
	4	0	0	0
	5	0	0	0
	6	0	0	0
Grupo 1 RL	7	105,04	3221	100
	8	32,89	1381	69
	9	5,89	273	12
	10	46,56	779	35
	11	41,67	952	41
	12	34,67	813	35
Grupo 2 HES	13	205,73	3019	100
	14	166,04	3009	100
	15	186,68	3086	100
	16	220,07	2705	100
	17	90,83	1739	60
	18	188,98	3103	100

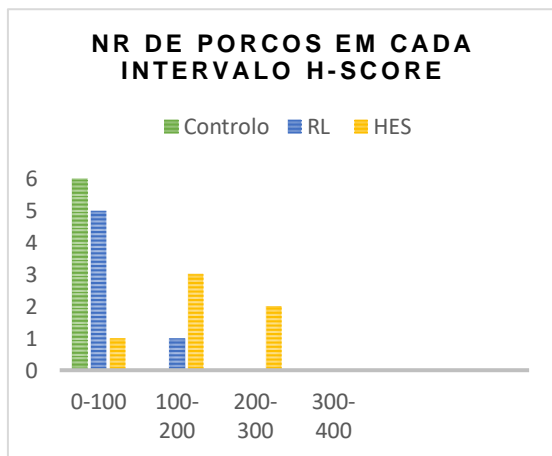


Figura 112. Gráfico High - score da percentagem de células positivas por grupo experimental

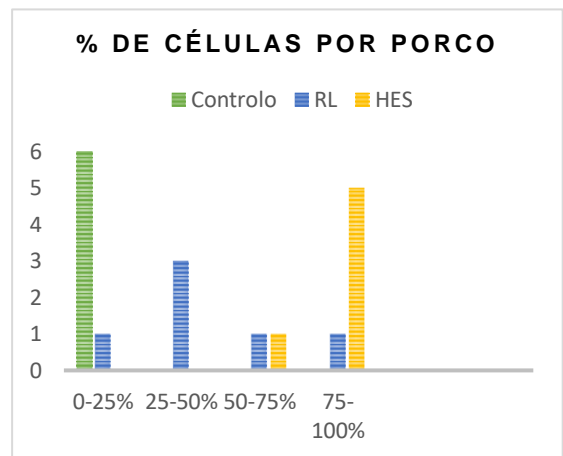


Figura 113. Gráfico High - score do nr de porcos existente em cada intervalo avaliado por grupo experimental

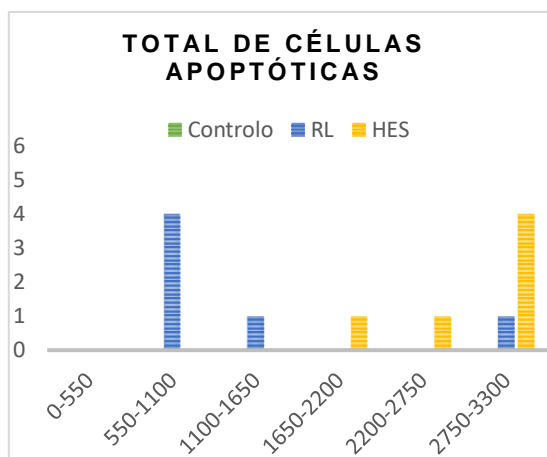


Figura 114. Gráfico High - score do total de células apoptóticas por grupo experimental

Quadro 29. Resultados da análise Kruskal-Wallis, seguida da análise Dunn para a técnica M30

H-score M30		Total células apoptóticas		% células apoptóticas		Células apoptóticas/mm ²	
Córtex	Medula	Córtex	Medula	Córtex	Medula	Córtex	Medula
Controlo vs. LR P> 0.05	Controlo vs. LR P> 0.05	Controlo vs. LR P> 0.05	Controlo vs. LR P> 0.05	Controlo vs. LR P> 0.05	Controlo vs. LR P> 0.05	Controlo vs. LR P> 0.05	Controlo vs. LR P> 0.05
P=0.001 Controlo vs. HES P <0.05	P=0.006 Controlo vs. HES P <0.05	P=0.001 Controlo vs. HES P <0.05	P=0.013 Controlo vs. HES P <0.05	P=0.001 Controlo vs. HES P <0.05	P=0.017 Controlo vs. HES P <0.05	P=0.001 Controlo vs. HES P <0.05	P=0.013 Controlo vs. HES P <0.05
Controlo vs LR P> 0.05	Controlo vs LR P> 0.05	Controlo vs LR P> 0.05	Controlo vs LR P> 0.05	Controlo vs LR P> 0.05	Controlo vs LR P> 0.05	Controlo vs LR P> 0.05	Controlo vs LR P> 0.05

Relativamente à análise Kruskal-Wallis, seguida da análise Dunn para comparação entre grupos, podemos afirmar que existiram diferenças significativas entre o grupo controlo e o grupo 2, tanto na medula como no córtex a nível geral, em todos os parâmetros.

Não foram encontradas diferenças significativas nos respetivos parâmetros entre o grupo controlo e o grupo 1 ou entre o grupo 1 e o grupo 2.

4.5. Resumo de resultados

4.5.1. Resumo Quick – Score resultados

Resumindo todos os resultados Quick-score, podemos afirmar que os animais que receberam HES 130/0,4 apresentaram maior grau de lesão, evidenciando deste modo que, o melhor soluto para repor a volémia em caso de hipoperfusão aguda será o RL.

Quadro 30. Quadro resumo dos resultados obtidos com a técnica do Citocromo-c

RIM Cit. C	Grupo Controlo						Grupo 1 - RL						Grupo 2 - HES					
Porco	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Q-score	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	3	3
Média	1,83						2,00						2,5					

Quadro 31. Quadro resumo dos resultados obtidos com a técnica TUNEL

RIM TUNEL	Grupo Controlo						Grupo 1 - RL						Grupo 2 - HES					
Porco	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Q-score	1	0	1	0	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	2
Média	0,67						0,33						0,50					

Quadro 32. Quadro resumo dos resultados obtidos com a técnica M30

RIM M30	Grupo Controlo						Grupo 1 - RL						Grupo 2 - HES					
Porco	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Q-score	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
Média	0,17						0,33						1,00					

4.5.2. Resumo High-score resultados

Resumindo todos os resultados High-score, podemos afirmar que os animais que receberam HES 130/0,4 apresentaram maior grau de agressão pré-apoptótica e apoptótica às células renais, quando comparados àqueles que receberam RL. Deste modo, estes resultados vieram reforçar os resultados já obtidos com o Quick-score, indicando que, o RL com menor grau de lesão, será, portanto, o melhor soluto para a reperfusão a nível renal.

Quadro 33. Quadro resumo dos resultados obtidos com o high-score nas técnicas TUNEL e M30

H-score	Porco	H-score TUNEL Córtex + Medula	H-score M30 Córtex + Medula
Grupo Controlo	1	32,54	0
	2	0,00	0
	3	49,99	0
	4	32,95	0
	5	41,17	0
	6	82,61	0
Grupo 1 RL	7	0,00	105,04
	8	22,60	32,895
	9	7,89	5,895
	10	175,92	46,56
	11	4,57	41,67
	12	8,78	34,665
Grupo 2 HES	13	10,64	205,73
	14	62,79	166,035
	15	59,32	186,675
	16	39,44	220,07
	17	18,83	90,825
	18	103,23	188,98

5. DISCUSSÃO

Após publicação de revisão sistemática e meta-análise sobre a utilização de HES 130/0,4 como fluido de ressuscitação por Gattas e colaboradores (2012), indicando não existir diferenças entre a utilização de HES 130/0,4 em comparação com outros fluidos de ressuscitação, pretendemos com este estudo abordar os efeitos sobre a integridade do tecido renal num modelo animal sujeito a hemorragia sob anestesia geral, após a administração de HES 130/0,4 e de LR durante um breve período de tempo.

O remifentanil apresenta-se como o componente analgésico de eleição para a associação com propofol numa TIVA. No entanto, sabe-se que, isoladamente ou combinado com outros medicamentos, podem causar lesão renal. O Propofol parece diminuir o fluxo sanguíneo renal mas tendo em conta que é administrado em bolús na indução da anestesia e rapidamente metabolizado, não tem efeitos colaterais na reperfusão do órgão. Contudo, esta redução acentuada da perfusão, foi um fato relevante a ser considerado na avaliação dos efeitos histológicos da hipoperfusão renal após mais de 4 horas de anestesia com propofol. O remifentanil tem como principal metabolito o GR90291 que apresenta uma potência opióide 4 mil vezes maior que o próprio. Devido a este facto, e como este metabolito é primariamente eliminado pelos rins, a dose de administração do remifentanil, em pacientes com lesão renal, deverá ser devidamente considerada (Paiva, 2012; Gimenes, 2005).

Neste estudo todos os animais foram previamente medicados com azaperona que apresenta uma rápida biotransformação e eliminação após administração, contudo, regista acumulações de resíduos nos rins, podendo, deste modo, contribuir para o aparecimento de possíveis lesões renais (Marqueti, 2008), as quais não foram identificadas neste estudo.

O grupo controlo foi um grupo que apenas serviu para fornecer informação sobre a influência da TIVA prolongada no tecido renal, visto que, caso se tivesse procedido ao sangramento sem reposição da volémia teria fornecido informações significativas sobre possíveis lesões renais parenquimatosas, devido à própria hipoperfusão e não relativamente aos fluidos (Ortiz, 2015).

As lesões histopatológicas evidenciadas nos grupos deste estudo, grupo HES e LR, foram discretas, no entanto, a análise imuno-histoquímica sugeriu que a administração de LR poderá ser mais eficaz na preservação da integridade celular a

nível renal após grave perda de volume circulatório, diminuindo os eventos pré-apoptóticos e apoptóticos analisados.

As lesões observadas no grupo controlo comparativamente aos grupos sujeitos a hemorragia sugerem que, apesar de todos os parâmetros clínicos se terem mantido dentro dos limites fisiológicos, quanto maior for a concentração plasmática de propofol e de remifentanil durante a TIVA, maior será a probabilidade de lesão renal.

Ao analisar as lesões renais, constatou-se que todos os grupos apresentaram lesões sugestivas de processos agudos, como as degenerescências, decorrentes da diminuição de filtração glomerular ou de lesões tubulares, e de processos crónicos, como as fibroses que, por sua vez, já existiriam antes do estudo experimental.

As lesões frequentemente encontradas foram, o depósito de gotículas no espaço de bowman (a nível glomerular), a degenerescência hidrópica, os depósitos de materiais hialinos e os cilindros hialinos (a nível tubular), infiltrado inflamatório (a nível intersticial) e a hialinose venular (a nível vascular).

Na estatística calculada para avaliar as lesões, as diferenças apenas foram significativas nas lesões que evidenciaram $p < 0.05$, sendo que as únicas lesões que evidenciaram diferenças foram a hiperplasia glomerular com $p = 0.026$ e a congestão com $p = 0.048$, ambas com $p < 0.05$. No caso da hiperplasia glomerular, tanto o grupo RL como o HES evidenciaram 3 animais com lesão, apresentando valores inferiores ao grupo controlo com 4 animais com lesão. Relativamente à congestão, o HES exibiu 1 animal com congestão e o RL exibiu 4, sendo que, comparativamente ao grupo controlo, nenhum superou o valor de animais com lesão.

De referir que apesar de todas as lesões observadas, os níveis séricos de BUN e creatinina não se alteraram durante e após o período de estudo experimental, sugerindo deste modo que, não houve nenhum comprometimento agudo da função renal associado ao protocolo experimental

A hipoperfusão renal conduz a uma série de eventos no epitélio dos TCP, que incluem desde a perda de polaridade do citoesqueleto à necrose e apoptose, agravando a lesão renal (Santos, 2011).

Em todos os grupos experimentais, foram avaliados os fenómenos pré-apoptóticos através do citocromo c e fenómenos apoptóticos, através do M30 e do TUNEL.

Os aspetos que caracterizam a apoptose celular encontram-se divididos em

morfológicos e moleculares. Entre os aspetos moleculares encontra-se a libertação do citocromo c da mitocôndria e a ativação das caspases, as quais clivam diversos substratos celulares levando à morte celular (Luchs *et al.*, 2010).

Na técnica do citocromo c, a imunorreacção moderada e intensa revelada pelos túbulos contornados e pela ansa de Henle, tanto no grupo LR como no grupo controlo, poderá dever-se ao elevado número de mitocôndrias presentes nessas estruturas. No entanto, a maior intensidade de reacção exibida pelas mesmas estruturas no HES poderá estar correlacionada com a libertação de citocromo c no citosol, após estímulos pré-apóptóticos em animais sujeitos a reposição do volume realizada recorrendo ao HES 130/0,4. Este achado é sugestivo de um maior grau de agressão às células presentes nas estruturas acima mencionadas em animais que receberam HES 130/0.4, quando comparados com os animais nos quais foi utilizada a solução RL. Além disso, a intensidade de coloração ligeiramente aumentada, presente no segmento fino da ansa de Henle, bem como o número de células levemente marcadas nos túbulos coletores, também favorecem esta hipótese noutras estruturas renais.

O método TUNEL é utilizado para deteção da fragmentação do ADN baseando-se na avaliação dos produtos endonucleossómicos resultantes da clivagem do ADN. A marcação enzimática é feita através da enzima TDT e da fragmentação de ADN decorrente do processo de apoptose (Garcia, 2013).

No TUNEL foram avaliados 6 animais de cada grupo, sendo que os resultados indicaram um possível efeito protetor da solução de LR nos túbulos renais, diminuindo o número de células apoptóticas.

Este método é uma técnica sensível que, por vezes, pode apresentar uma marcação inespecífica. Apesar da maioria dos animais se terem revelado negativos a esta técnica nos glomérulos, TCP, TCD, segmento fino e segmento grosso da ansa de Henle, existia fundo nas lâminas, sendo que este facto poderá dever-se ao facto de a enzima TDT reconhecer todos os grupos terminais 3' - OH, resultando em reacções inespecíficas (Paiva, 2014).

Neste método, as células que exibiram maior imunorreatividade positiva foram as células dos TC, tanto no grupo HES como no grupo RL. A intensidade de reacção de 100% nos TC, foi também idêntica nos dois grupos. Embora tanto o grupo RL como o grupo HES tenham evidenciado imunorreatividade positiva com a mesma intensidade de reacção, a intensidade de marcação do grupo RL nos TC foi avaliada com grau 1 em dois porcos, grau 2 também em dois porcos e grau 3 apenas num

porco, tendo o outro porco sido negativo (5 porcos marcados). No grupo HES, esta mesma estrutura exibiu intensidade de coloração de grau 2 em quatro porcos, grau 3 em dois porcos (6 porcos marcados). Pode-se justificar o facto de serem as células dos TC a exibir uma maior reatividade positiva, pelo facto, dos rins devido à sua função de reabsorção e secreção possuírem uma alta taxa metabólica, principalmente na região dos túbulos renais, tornando-os mais suscetíveis a episódios de hipovolémia/hipoperfusão (Bragato, 2015).

O grupo controlo foi o grupo com maior média Q-score. Este facto pode ser justificado pela TIVA, onde a redução do fluxo sanguíneo renal resulta em baixas concentração de O₂ que induzem lesões nas células do epitélio tubular. No caso de hipoperfusão aguda e prolongada, ocorre apoptose e necrose celular destas estruturas (Ortiz, 2015; Pinto, 2012).

Avaliando os Q-score finais de todas as estruturas e de todos os porcos de todos os grupos experimentais, podemos afirmar que, comparando com o grupo controlo, o RL comportou-se como o melhor fluido para repor a volémia a nível renal, visto que foi o grupo que revelou uma maior diferença (0,33), comparativamente ao grupo controlo que revelou 0.67.

O anticorpo M30 interagiu com neoepítipo que se formou após a clivagem da citoqueratina 18 por parte da caspase durante o processo de apoptose, pelo que é considerado o marcador mais específico, que deteta a apoptose numa fase inicial. Além disso este anticorpo não marca nem células necróticas nem células viváveis. Isto deve-se ao facto de, na necrose não se verificar integridade da membrana plasmática, existindo por isso libertação dos constituintes celulares para o meio extracelular, e nas células viáveis, o neoepítipo de citoqueratina 18 não é detetável num citoesqueleto intacto. Deste modo, as células viáveis ou necróticas vão ser negativas ao teste M30 (Robison *et al.*, 2001; Pina, 2014; Nardelli *et al.*, 2007).

Na técnica M30, a reação predominantemente moderada presente nos TCP do grupo 1 poderá ser justificada pelo efeito de hipoperfusão ou até mesmo pelo conjunto anestesia/hipoperfusão comparando estes com a reação predominantemente negativa apresentada pelo grupo controlo. Contudo, a intensidade mais elevada foi exibida pelas mesmas estruturas no grupo pertencente ao grupo 2, que por sua vez, indica maior gravidade em animais tratados com este fluido. Também o aumento da intensidade da reação presente no segmento grosso da ansa de Henle, bem como o aumento ligeiro do número de células marcadas nos

TC confirmaram esse facto.

Os resultados obtidos com M30 apresentaram alta especificidade em eventos apoptóticos, detetando maior apoptose no grupo HES, comparando com o grupo RL e controlo.

5. CONCLUSÃO

Apesar de todos os estudos efetuados sobre a melhor forma de repor fluidos em caso de hipoperfusão, existe ainda uma grande controvérsia sobre o assunto, sendo que o rápido e assertivo exame físico e a fluidoterapia podem fazer a diferença entre a sobrevivência ou a morte do paciente.

No presente trabalho, procurou-se detetar qual dos solutos, HES ou RL, melhor preserva o tecido renal, tendo sido verificado que os animais que receberam RL apresentaram um menor grau de insulto pré-apoptótico e apoptótico, quando comparados com os que receberam HES 130/0,4. Deste modo, para uma substituição de volume após hipovolémia grave, durante uma TIVA com propofol e remifentanil, deverá ser utilizado o LR visto que, a utilização a curto prazo do HES 130/0,4 provocará um significativo aumento do grau de lesão a nível renal.

Com base nos resultados obtidos, podemos afirmar que o uso de LR, um cristalóide, será a melhor opção a utilizar no restabelecimento da perfusão, apresentando um maior grau de proteção a nível renal. Assim, estes resultados deverão ser seriamente levados em conta na escolha do fluido a administrar neste tipo de pacientes.

Podemos também concluir com este estudo que, os resultados obtidos neste estudo experimental, poderão variar consoante as doses de propofol e remifentanil utilizadas na TIVA, aumentando (com maiores concentrações a nível plasmático) ou diminuindo (com menores concentrações a nível plasmático) o grau de lesão renal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu GFS (2012). Alterações cardiovasculares e acidobásicas no choque hemorrágico, em suínos tratados sem reposição volêmica, com solução salina exclusiva e associada a concentrado de hemáceas. Universidade Federal de Pernambuco. Recipe. 6;9.

Alves R, Cunha MFX, Pratas J, Pessa P, Mota Alfredo, Campos M (2004). Estudo da apoptose na transplantação renal. Revista Portuguesa de Nefrologia e Hipertensão. 167-177.

Anazetti MC, Melo PS (2005). Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. Metrocamp Pesquisa, V. 1, n. 1. 38; 39.

Anónimo (2013). Morte celular programada: Apoptose. <http://profjaborritmo.blogspot.com/2013/07/morte-celular-programada-apoptose.html>. Consultado em 15/05/2018.

Anónimo (s/d). Aplastic Anemia (Bone Marrow Failure - Toxicity) in Dogs. Com. <https://www.vetarena.org/dogs-health-care-articles/627/aplastic-anemia-bone-marrow-failure-toxicity-dogs.html>. Consultado em 16/01/2018.

Anónimo (2014). Exame físico geral. Com. http://semiologiadepequenosanimais.blogspot.pt/2014/08/segue-os-principais-parametros-para_25.html. Consultado em 16/07/2018.

Araraki JMM (2003). Insuficiencia renal aguda. Tema de Revisão. Ver. Med. Hered. V. 14 (1). 36-39.

Basile DP, Anderson MD, Sutton TA (2012). Pathophysiology of acute kidney injury. Compr Physiol. April. V. 2(2): 1303-1353. Doi:10.1002/cphy.c110041. 5-38.

Barros JMP (2009). Efeitos na expansão volêmica e na oxigenação sistêmica e gastrointestinal após reposição com hidroxietilamido, associado ou não á solução salina hipertônica, e Ringer de lactato em cães submetidos a choque hemorrágico. Faculdade de medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista. 15.

Benetone MZ (2005). Apoptose e proliferação na placenta de búfalas. Dissertação. Pós – Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica da Universidade de São Paulo. 70; 91.

Bergantini AP, Castro FA, Souza AM, Conte ACF (2005). Chronic myeloide leukemia and the Fas-FasL system. Revista brasileira hematol. Hemoter. V.27 (2). 121 e 122.

Bonventre JV, Yang L (2011). Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. The journal of clinical investigation. V.121 (11). 4210-4221.

Botteon PTL (2012). Lactato na medicina veterinária – Atualização conceitual.v Revista brasileira de Medicina Veterinária, (34) 4. 283

Boudier HAS (2007). From macrocirculation to microcirculation: Benefits of Preterax. American Journal of Hypertension, Ltd. Published by Elsevier Inc. 15-18.

Bragato N, Fioranti MCS, Braga LG, Reis DC, Borges NC (2015). Lesão renal tubular aguda em cães e gatos: fisiopatogenia e diagnóstico ultrassonográfico. Enciclopédia Biosfera, centro científico conhecer – Goiânia, V.11, n.22. 2092 – 2095.

Brant JMC (2008). Apoptose na resposta inflamatória e nas lesões epiteliais no líquen plano bucal dos tipos reticular e erosivo. Dissertação. Faculdade de Medicina. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 29;30.

Caetano DRG (2009). Cuidados de enfermagem em animais de companhia. Instituto politécnico de Castelo Branco. Escola superior Agrária. 13.

Charpiot IMMF (2011). Efeito da Metilprednisolona na lesão de isquemia e reperfusão renal. Tese de mestrado. Faculdade de medicina de São José do Rio Preto. Pós-Graduação em Ciências da Saúde. 3-13.

Correia FRG (2015). Estudo de lesões decorrentes de atropelamentos em cães. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa. 6.

Corrêa TD, Rocha LL, Pessoa CMSP, Silva E, Assunção MSC (2015). Fluid therapy for septic shock resuscitation: which fluid should be used. Artigo revisão. Hospital Israelita Albert Einstein. São Paulo. Brasil. 464 – 466.

Costa SAB (2014). Maneio do paciente politraumatizado na clínica de animais de companhia. Faculdade de Medicina veterinária. Universidade de Lisboa. 13;23;28.

Costa JAC, Vieira-Neto OM, Neto MM (2003). Insuficiência renal aguda. Simpósio: Urgências e emergências nefrológicas. Capítulo 1. Medicina, Ribeirão preto. V.36. abril/dezembro. 307-309.

Detre S, Jotti GS, Dowsett M (1995). A “quickscore” method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. Journal of Clinical Pathology. 48: 876-878.

Dias FS (2002). Choque. 1ª Edição. Editografia Ltda. Porto Alegre. 43;44.

Dourado AJS (2010). Estudo de variações de gasometria venosa e indicadores de perfusão em canídeos em síndrome de choque. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa. 8;34.

Elmore S (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. NIEHS, Laboratory of experimental pathology, research Triangle Park, North Carolina 27709. USA. Toxicologic pathology. V.35. 495, 501, 502, 503, 504, 505.

Engelhardt WV, Breves G (2005). *Fisiologia veterinária*. Editorial Acribia,S.A., Zaragoza (Espanha): 181 - 199.

Figueira ERR (2007). Efeito da solução salina hipertônica nas lesões resultantes da isquémia/reperfusão hepática: estudo experimental em ratos. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo: 20-21.

Feitosa EAN, Taha MO, Fagundes DJ, Takiya CM, Cardoso LR, Campos DM (2005). Study of renal morphology after infrarenal aortic cross-clamping in rats. Estudo da morfologia renal. V. 32. Nº4, Julho/Agosto. 178-180.

Felice CD, Susin CF, Costabeber AM, Rodrigues AT, Beck MO, Hertz E (2011). Shock: emergency diagnosis and treatment. Revista de AMRIGS, Porto Alegre, 55 (2). Abril-Junho. Porto Alegre. 181.

Fernandes DS (2012). Estado da Arte: Métodos de determinação do balanço hídrico intra-operatório. Universidade do porto. 13.

Fernandes RSO (2014). Índice de choque como indicador de pronóstico em animais de companhia. Relatório de estágio em clínica médica e cirúrgica de animais de companhia. Escola de ciências e tecnologia. Departamento de medicina veterinária. Universidade de Évora. 29;30;31;37;38;57;58;61;62;76.

Ferreira ABML (2015). Reposição volémica em vítimas de trauma no pré-hospitalar e pronto-socorro. Universidade de Brasília. Brasília. 22;27.

Ferreira CS, Maganhin CC, Simões RS, Girão MJBC, Baracat EC, Soares JM (2010). Melatonina: Modulador de morte celular. Artigo de revisão. Rev Assoc Med Bras. V. 56 (6). 716 e 717.

Ferro AB (2013). Imunohistoquímica. Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa. Instituto Politécnico de Lisboa. 77.

Flemming B, Seeliger E, Wronski T, Steer K, Arenz N, Persson PB (2000). Oxygen and renal hemodynamics in the conscious rat. Journal of the American Society of Nephrology, V. 11. 18 e 19.

França M (s/d). Exame físico. Com. <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAfHdQAH/exame-fisico?part=2>. Consultado em 16/01/2017.

Fuhrman & Zimmerman (2011). Pediatric Critical Care - Glomerulotubular Dysfunction and Acute Kidney Injury. Chapter 71. 4th Edition. 1016 – 1020.

Gaija LH (2004). Choque circulatório: Aspectos básicos de fidiopatologia e terapêutica. Seminário do programa de pós-graduação em Ciências veterinárias. Universidade Federal do Rio grande do Sul. 4;8;9.

Garcia CSP (2013). Avaliação da técnica imunohistoquímica como método de detecção da apoptose a nível celular. Escola Superior Agrária de Viseu, Viseu. 66; 67; 68.

Garcia M (s/d).Significado de la coloración de las mucosas de los perros. Com. <https://www.expertoanimal.com/significado-de-la-coloracion-de-las-mucosas-de-los-perros-22835.html>. Consultado em 16/01/2018.

Gattas DJ, Dan A, Myburgh J, Billot L, Lo S, Finfer S (2012). Fluid resuscitation with 6% hydroxyethyl starch (130/0.4) in acutely ill patients: an updated systematic review and meta-analysis. 159, 160, 161.

Gimenes AM (2005). Efeito cardiorrespiratório e analgésico da anestesia intravenosa contínua com propofol e remifentanil em cães após medicação pré-anestésica com acepromazina. Faculdade de medicina veterinária e zootécnia. Unversidade Estadual Paulista. Campus de Botucatu. Pag:17-18.

Grivicich I, Regner A, Rocha AB (2007). Revisão de literatura. Revista brasileira de cancerologia. V. 53(3). 336 – 339.

Guyton AC, Hall JE (1996). *Textbook of Medical Physiology* (9ªEdição). W.B Saunders Company. Philadelphia (Pensylvania): 161; 162; 163; 164; 169; 183; 184; 185; 186.

Hirano ES, Mantovani M, Morandin RC, Fontelles MJP (2003). Modelo experimental de choque hemorrágico. Acta Cirúrgica Brasileira. Vol 18, nº5. 465.

https://www.biooncology.com/content/dam/gene/biooncology/images/BIONP-56737_P-59_Fig_8.jpg. Consultado a 01/07/2018.

<http://www.dino.com.br/releases/inovacao-em-genetica-suina-combina-o-melhor-do-large-white-com-o-lado-bom-do--landrace-dino890120577131>). Consultado a 25/06/2018.

<http://www.yorkvetsupplies.co.uk/product/stresnil-40mg-ml-solution-for-injection-for-pigs-100ml>. Consultado a 15/01/2018.

Hughes J, Gobe G (2007). Methods in renal research - Identification and quantification of apoptosis in the kidney using morphology, biochemical and molecular markers. *Nephrology*. V.12. 452, 456 e 457.

Jamie M, Credon B, Harrold D (2012). Advanced monitoring and procedures for small animals. Emergency and critical care. 1º Edição. John Wiley & Sons.Inc, Capítulo 1. 1-10.

Júnior CAM, Souza LS (2014). Fisiopatologia do choque. HU Revista, Juiz de fora. Vol 40, nº1 e 2. 73-78.

Júnior JOCA, Costa LGV (s/d). Expansores de Plasma. Professor Titular da Disciplina de Anestesiologia da FMUSP. Diretor do Serviço de Anestesiologia do InCor HC FMUSP. Capítulo 43. 347 e 348.

Junqueira LC, Carneiro J (1996). *Histología Básica* (4ªEdição). Masson, S.A. Barcelona (Espanha). 353; 354.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in the tissue kinetics. *British Journal of cancer*. 1972 Au. V.26 (4). 139-257.

Lote CJ, Harper L, Savage COS (1996). Mechanisms of acute renal failure. *British journal of Anaesthesia*. V.77. 82-89.

Luchs A, Pantaleão C (2010). Apoptosis and in vivo models to study the molecules related to this phenomenon. *Revista Einstein*. Vol 8; 4ªparte. 495.

Kunzler KC (2014). Estruturação de um serviço de emergência veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de veterinária. 44; 46; 47.

Ferronato MG (2014). Marcadores de apoptose e inflamação em pacientes portadores de infecção crônica pelo vírus da hepatite C submetidos ou não a tratamento

antiviral. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Pós-Graduação. Ciências em gastroenterologia e Hepatologia. 13.

Marinho AD (2013). Efeitos renais e mecanismos de morte celular promovidos pelo veneno serpente *Bothropoides pauloensis*. Dissertação de mestrado. Faculdade de medicina. Pós – graduação em Farmacologia da universidade do Ceará. 23 - 26.

Marqueti PS (2008). Anestesia de suínos com azaperona, midazolam e propofol em associação com tramadol ou não. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita e Filho”. Faculdade de ciências agrárias e veterinárias. Campus Jaboticabal. 6;7.

Melanie A. Breshears MA; Confer AW (2015). The Urinary System. In Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 9th Edition; Philadelphia, Pennsylvania, Elsevier Saunders. ISBN: 978-1-4557-4876-1: 624 – 627.

Miranda MI, Caixeta DMI, Bouskela E (2013). Microcirculation in sepsis. Pathophysiological and diagnostic features. Revista HUPE. Vol. 12, nº 3, julho – setembro, Rio de Janeiro. 22.

Martelli A (2012). The influence of the renal system in the long-term control of blood pressure. Artigo de revisão. Faculdade de Mogiana do Estado de São Paulo, Brasil. 75.

Myburgh JA, Mythen MG (2013). The New England Journal of Medicine. Simon R. Funder, MD, Jean-Louis Vincent, MD, Ph.D., Editors. 1245; 1247;.1248.

Nardelli LM, Garcia CSNB, Pássaro CP, Rocco PRM (2007). Understanding the Mechanisms of Ventilator-induced Lung Injury. Artigo de revisão. Revista Brasileira de Terapia Intensiva. Vol. 19. N4. Outubro-Dezembro.

Neto AR, Rezende E, Mendes CL, David CM, Dias FS, Schettino G, Lobo SMA (2006). Brazilian Consensus of Monitoring and hemodynamic Support – part IV: Tissue Perfusion Evaluation. Revista de medicina intensiva brasileira. Vol 8, nº2. Abril-junho. 155; 156.

Norcus CL (2012). Small animal emergency and critical care. John Wiley & Sons, Ltd. UK. 32.

Nunes CS, Cinsa LA (2016). Princípios do processamento histológico de rotina. Monografia. Revista interdisciplinar de estudos experimentais, v.8, n. único. 36; 37.

Oliveira TC, Cabral APM, Endo VT, Mazzucatto BC (2015). Hypovolemic shock hemorrhagic in dogs – Literature Review. Revista de ciência veterinária e saúde pública. Vol 2, nº1: 55; 56; 57.

Ortiz ALCNO (2015). The influence of administering Ringer's Lactate solution or HES 130/0.4 on the integrity of the small intestinal mucosa in a pig model of controlled haemorrhage. Faculty of Veterinary Medicine Department of Veterinary Medicine, Surgery and Anatomy. University of León, León, Spain. 129 e 130.

Pina RFG (2014). Projeto de aplicação de cuidados anestésicos na monitorização precoce de situações clínicas de hipoperfusão orgânica. Escola Superior Agrária de Viseu, Viseu. 52; 53; 95.

Paiva DSR (2014). Aplicação de técnicas de deteção de apoptose versus proliferação celular no estudo do mastocitoma canino. Trabalho de projecto. Mestrado em Enfermagem Veterinária de Animais de Companhia. Escola Superior Agrária. Instituto Politécnico de Viseu. 86.

Paiva DSR (2014). Aplicação de técnicas de deteção de apoptose versus proliferação celular no estudo de mastocitoma canino. Tese de mestrado. Instituto politécnico de Viseu. Escola Superior Agrária de Viseu. 3, 6, 7 e 11.

Paiva MAM (2012). Anestesia em transplantação renal. Artigo de revisão. Coimbra. 47.

Pereira C, Souza AO, Pazin M, Dorta DJ (2012). Mitocôndria como alvo para avaliação da toxicidade de xenobiótico. Revista brasileira de toxicologia. V. 25. N 1-2. 4, 5 e 7.

Pimenta VSC, Prado YCL, Silva DR, Machado PA, Araújo EG (2013). Papel da proteína p53 na proliferação neoplásica. Enciclopédia Biosfera, Centro científico conhecedor – Goiânia, V 9 , Nº17. 1992 e 1993.

Pinheiro SP (2013). A organização e a monitorização diária das atividades de uma unidade de cuidados intensivos. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. 9; 10; 24;25;26;29;34.

Pinto CF, Watanabell M, Fonseca CD, Ogata CI, Vattimo MFFF (2012). The Sepsis as cause of acute kidney injury: an experimental model. Revista da escola de enfermagem da USP. Vol 46. São Paulo. 87; 88; 89.

Reifenrath j, Fedchenko N (2014). Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue – a review. Small Animal Clinic, University of Veterinary Medicine, Foundation, Bünteweg 9, 30559 Hannover, Germany and Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, SE. 6; 7.

Regalin D (2009). Efeitos cardiovasculares e metabólicos da reposição volêmica com solução salina hipertônica 7,5% associado ou não ao hidroxítiamido 130/0,4 em gatas com hipovolémia induzida. Universidade do Estado de St^a Catarina.Lages. 26; 30.

Ribeiro F, Alves AJ, Teixeira M, Ribeiro V, Duarte JÁ, Oliveira J (2008). Funcionalidade endotelial e aterosclerose: marcadores sanguíneos com utilidade clínica. Centro de investigação em atividade física saúde e lazer. Faculdade de Desporto da Universidade do Porto. 1127; 1128.

Robinson JMM, Hüttmann AEB, Purdie DM, Walsh MD, Simms LA, Biden KG, Young JP, Legget BA, Jass JR, Smith GLR. Tumour infiltrating lymphocytes and apoptosis are independent features in colorectal cancer stratified according to microsatellite instability status. Gastroenterology laboratory, Royal Brisbane Hospital foundation clinical research centre, Brisbane, Australia; Department of pathology, University of Queensland Medical School, Brisbane, Australia; Epidemiology Unit, Queensland institute of Medical research, Brisbane, Australia. 360; 361.

Sakabe D, Chade MC, Mestieri LHM, Rodrigues JMS (2004). Reposição da volémia em pacientes politraumatizados. Revista Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba. Vol.6, nº1: 22; 23; 24; 25..

Salgado DR, Favory R, Backer DD (2010). Microcirculatory assessment in daily clinical practice – not yet ready but not too far. Revisão: 108.

Santos LM, Hajjar LA, Galas BRF, Júnior CJF, Júnior JOCA (2006). Renal Protection in a surgical Intensive Care Unit. Revisão Brasileira de Terapia Intensiva. Vol 18 nº3, julho-setembro. 283.

Santos PSS (2011). NGAL como marcador precoce de lesão renal em ratos submetidos à isquemia renal sob anestesia venosa total. Faculdade de medicina de Botucatu. UNESP. 17; 18.

Schor N, Santos OFF, Boim MA (2000). Insuficiência renal aguda. Guia prático de urologia. Capítulo 13. 65 e 66.

Shibuya CA (2006). Papel da heme-oxigenase na proteção pelas Estatinas na insuficiência renal aguda isquêmica em ratos. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. Escola de enfermagem. Pós – graduação em enfermagem na saúde do adulto. 9-12.

Silva E, Garrido AG, Assunção MSC (2001). Tissue perfusion assesment in shock. Simpósio de medicina intensiva 3ª parte capítulo 3. 27; 28; 29.

Soares AV (2008). Efeitos cardiovascular e metabólico da reposição volêmica com coloide em gatos com hipovolêmia induzida. Universidade do Estado de Stª Catarina. Lages. 25.

Soares AV, Oleskoviez N, Moraes NA, Flôres FN, Tamanho RB, Pacheco AD, Regalin D, Carneiro R, Armando AM (2009). Cardiovascular and metabbolic effects of volemic expansion with hydroxyethyl starch 130/0,4 in domestic cats with induced hypovolemia. Ciência Rural, Santa Maria. ISSN103.8478.Brasil.429.

Soares RZ, Vuolo F, Dall'Ígna DM, Michels M, Crippa JAS, Hallak JEC, Zuardi AW, Dal-Pizzol F (2015). Evaluation of the role of the cannabidiol system in a animal model of ischemia/reperfusion kidney injury. Revista brasileira de terapia intensive. V.27 (4). 383 e 384.

Souza PC (2018). Avaliação dos efeitos da melatonina associada à hipotermia tópica na lesão por isquemia e reperfusão renal em ratos. Tese de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas. 13-16.

Portela DPM (2014). Fluidoterapia e transfusão no choque hemorrágico. Faculdade de Medicina. Universidade do Porto. Porto. 14.

Quireze C, Montero EF, Leitão RM, Juliano Y, Fagundes DJ, Poli-de-Figueiredo LF (2006). Ischemic preconditioning prevents apoptotic cell death and necrosis in early and intermediate phases of liver ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Investigative Surgery*. 19 (4): 229-236.

Zavariz SMR, Leite CE, Pires MGS, Oliveira JR, Nunes FB (2006). Laboratory markers of the septic shock. Artigo de revisão. *Scientia Medica*, Porto Alegre: PUCRS, v. 16, n. 1. 31.

Vasconcelos BO (2016). Apoptose em placentônios bovinos de gestações de conceptos naturais e de transgênicos clonados. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – FCAT Campus de Dracena. 28.

Vicent WVA, Rodrigues AJ, Júnior JRS (2008). Circulatory shock. Simpósio: Fundamentos em clínica cirúrgica 2ª parte, capítulo II. 438; 439.

Wong MMM, Hwenández MMG, Ortega JMG, Mendoza OLL (2006). Fluidoterapia de reanimación en pacientes con trauma grave. *Revista Cubana Cir.vol 47 (3-4)*. 1; 2.

Zancan RG (2014). Fluidoterapia no choque hipovolêmico. Universidade Federal de Santa Maria. Centro de Ciências Rurais. Residência em área profissional da saúde/medicina veterinária. Brasil. 7; 18; 19.

