



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Rômulo Ferreira de Assunção

**Análise estereológica renal em ratos *wistar* submetidos à
obstrução ureteral unilateral**

Rio de Janeiro

2018

Rômulo Ferreira de Assunção

**Análise estereológica renal em ratos *wistar* submetidos à obstrução ureteral
unilateral**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema Urogenital

Orientador: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza
Coorientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Sampaio

Rio de Janeiro
2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

A851 Assunção, Rômulo Ferreira de.
Análise estereológica renal em ratos Wistar submetidos à
obstrução ureteral unilateral / Rômulo Ferreira de Assunção. –
2018.
43 f.
Orientador: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza
Coorientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Sampaio
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Programa
de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.
1. Ureteres – Doença – Tratamento. 2. Aparelho urinário –
Cálculo – Teses. 3. Uretra – Obstrução – Tese. 4. Nefropatia –
Teses. 5. Ratos Wistar. I. Souza, Diogo Benchimol de. II.
Sampaio, Marco Aurélio Pereira. III. Universidade do Estado do Rio
de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV.
Título.
CDU 616.613-003.7

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira - CRB7/ 5302

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial
desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Rômulo Ferreira de Assunção

Análise estereológica renal em ratos *wistar* submetidos à obstrução ureteral unilateral

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema Urogenital.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Sampaio

Universidade Federal Fluminense

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Marcelo Abidu Figueiredo

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Edmundo Jorge Abílio

Universidade Estadual do Norte Fluminense

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Dedico à minha família
Sem vocês não seria possível.

AGRADECIMENTOS

Aos amigos que fiz durante o curso, Aline Souza, Edilaine Alves, Fabiana Oliveira, Marcelo Henrique e Priscila Fernandes, que me apoiaram e me ajudaram a realizar este trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza, ao meu Co-orientador Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Sampaio, ao Coordenador Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio e também aos demais professores da Unidade Urogenital, pela oportunidade, paciência, por todo auxílio e dedicação.

À CAPES pelo apoio a pesquisa e auxílio durante todo nosso trabalho.

À UERJ pela oportunidade e por proporcionar à estrutura que permitiu a conclusão do meu trabalho.

RESUMO

ASSUMÇÃO, Rômulo Ferreira de. *Análise estereológica renal em ratos Wistar submetidos à obstrução ureteral unilateral*. 2018. 43 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

A obstrução ureteral é frequentemente observada na prática médica e, muitas vezes leva à disfunção renal. Comumente pacientes com obstrução ureteral unilateral se apresentam com alterações na função renal, mesmo tendo um rim contralateral normal (não obstruído). Uma explicação teórica para esta observação seria a influência de um rim sobre o outro como uma forma de reflexo renorenal. O objetivo deste estudo foi investigar, através da análise estereológica, o impacto que um rim obstruído causa no rim contralateral.

Foram estudados 40 ratos machos de três meses de idade, divididos em quatro grupos com dez animais em cada. No grupo SHAM (S), os animais foram submetidos ao tempo anestésico e cirúrgico similar aos outros grupos, com abertura da cavidade abdominal sem nenhuma intervenção no trato urinário. No grupo controle (N) os animais foram submetidos à nefrectomia total unilateral, simulando um grupo de animais com um rim somente. No grupo tratado (HN) os animais foram submetidos à obstrução ureteral por ligadura da porção distal do ureter do rim esquerdo no dia 0; no dia seguinte foi realizada nefrectomia total do rim esquerdo, simulando um grupo que sofre a obstrução e em seguida é tratado através da retirada do rim obstruído. No grupo não tratado (H) os animais foram submetidos à obstrução ureteral por ligadura da porção distal do ureter do rim esquerdo sem qualquer tratamento. Todos os animais foram submetidos à eutanásia 30 dias após a cirurgia, e os rins direitos foram coletados para análise estereológica. Os dados foram comparados usando teste One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, considerando $p < 0,05$ como significativo.

O volume renal, o peso renal e o volume cortical foram aumentados nos grupos HN e N, em comparação com o grupo S. Os rins do grupo H mostraram apenas um aumento intermediário no peso do rim, com uma redução na proporção cortico-medular, em comparação com o grupo S. Não foram observadas diferenças na densidade volumétrica glomerular, volume glomerular médio ponderado e número de glomérulos nos rins direitos dos grupos estudados.

Como conclusão, confirmamos a hipótese de que um rim / uréter obstruído é mais prejudicial à morfologia do rim contralateral do que um rim ausente.

Palavras chave: Calculo ureteral. Nefropatia obstrutiva. Reflexo Renorenal .Rim.

ABSTRACT

ASSUMÇÃO, Rômulo Ferreira de. *Renal stereological analysis in Wistar rats submitted to unilateral ureteral obstruction*. 2018. 43 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Ureteral obstruction is often observed and frequently leads to renal dysfunction. Commonly patients with unilateral ureteral obstruction present with alterations in renal function, even though they have a normal contralateral (unobstructed) kidney. A theoretical explanation for this observation would be the influence of one kidney on the other, as a form of renorenal reflex. The objective of this study was to investigate, through stereological analysis, the impact that an obstructed kidney causes in the contralateral kidney.

Forty male rats of three months old were studied, divided in four groups with ten animals in each. In group SHAM (S), the animals were submitted to anesthetic and surgical time similar to the other groups, with abdominal cavity opening without any intervention in the urinary tract. In control group (N) the animals were submitted to unilateral total nephrectomy, simulating a control group of animals with one kidney only. In the treated group (HN) the animals were submitted to ureteral obstruction by ligation of the distal portion of the left kidney ureter at day 0; on the following day unilateral total nephrectomy was performed, simulating a group that is obstructed and then treated by removal of the obstructed kidney. In no-treated group (H) the animals were submitted to ureteral obstruction by ligation of the distal portion of the ureter of the left kidney, without any treatment. All animals were euthanased 30 days after surgery, and the right kidneys were collected for stereological analysis. Data were compared using One-way ANOVA with Bonferroni post-test, considering $p < 0.05$ as significant.

The kidney volume, weight, and cortical volume were augmented in groups HN and N, compared to group S. Kidneys from group H showed only a moderate augmentation in kidney weight, with a reduction in the cortical-medullary ratio, compared to group S. No differences in the glomerular volumetric density, volume-weighted glomerular volume, and number of glomeruli were observed among the right kidneys of the studied groups. In conclusion, we confirm the hypothesis that an obstructed kidney / ureter is more detrimental to contralateral kidney morphology than an absent kidney.

Keywords: Ureteral obstruction; Hydronephrosis; Kidney; Animal models.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Procedimento de ligadura do ureter esquerdo.....	18
Figura 2 –	Mensuração de peso e volume dos rins.....	19
Figura 3 –	Mensuração da relação cortico-medular.....	21
Figura 4 –	Fotomicrografia exemplificando a quantificação do Vv[glom].....	22
Figura 5 –	Fotomicrografia exemplificando a quantificação do VWGV.....	23
Figura 6 –	Rim esquerdo em corte transversal dos grupos H e HN.....	25
Figura 7 –	Gráfico do peso do rim direito entre grupos	26
Figura 8 –	Gráfico do volume do rim direito entre grupos.....	26
Figura 9 –	Gráfico da relação cortico-medular do rim direito entre grupos...	27
Figura 10	Gráfico do volume cortical do rim direito dos grupos.....	28
Figura 11	Gráfico do numero de glomérulos do rim direito dos grupos.....	29
Tabela 1	Dados morfométricos dos rins direitos dos ratos submetidos à nephrectomia ou à obstrução ureteral do rim esquerdo	30
Figura 12	Fotomicrografias dos rins direito dos animais dos Grupos S e N.	31
Figura 13	Fotomicrografias dos rins direito dos animais dos Grupos H e HN.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OUU	Obstrução Ureteral Unilateral
CEUA	Comissão de Ética para Cuidado e Uso de Animais Experimentais
HE	Hematoxilina/Eosina.
Vv[glom]	Densidade Volumétrica Glomerular
VWGV	Volume Glomerular Médio Ponderado
N[Glom]	Número de glomérulos
RCM	Relação córtico-medular
VR	Volume Renal

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1	OBJETIVOS	14
2	MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1	Delineamento experimental	15
2.2	Procedimento anestésico	16
2.3	Técnica cirúrgica	16
2.3.1	<u>Ligadura Ureteral (Grupos H e HN)</u>	16
2.3.2	<u>Nefrectomia total unilateral (Grupos N e HN)</u>	17
2.3.3	<u>Grupo controle (Grupo S)</u>	17
2.3.4	<u>Pós-operatório</u>	18
2.4	Eutanásia e coleta de material	19
2.5	Procedimentos histológicos	20
2.5.1	<u>Relação cortico-medular</u>	20
2.5.2	<u>Densidade volumétrica glomerular (Vv[glom])</u>	22
2.5.3	<u>Volume glomerular médio ponderado (VWGV)</u>	23
2.5.4	<u>Numero de glomérulos</u>	23
2.5.5	<u>Volume cortical</u>	24
2.6	Análise estatística	24
3	RESULTADOS	25
4	DISCUSSÃO	33
	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS	38
	APÊNDICE - Does a Ureteral Obstruction Affect the Contralateral Kidney Morphology? A Stereological Analysis in a Rodent Model (Artigo publicado)	43
	ANEXO - Certificado de aceite da comissão de ética para o cuidado e uso de animais experimentais	44

INTRODUÇÃO

A obstrução ureteral (OU) é uma condição comum na prática clínica, com uma incidência de cerca de 1/1.000 (QUINLAN et al, 2008), se apresenta em 2,6% (UCHINO et al, 2005) dos pacientes com insuficiência renal e pode ocorrer devido à obstrução por urolitíase, trauma, malignidade ou endometriose (PICOZZI et al, 2011; SINGH et al, 2012). Quando a obstrução não é rapidamente resolvida, torna-se uma condição mais grave que pode levar à lesão e insuficiência renais (KLAHR et al, 2002; SMITH et al, 2007).

A obstrução ureteral impede ou diminui o fluxo de urina pelo ureter. Pode ser parcial ou completa, unilateral ou bilateral e ocorre mais comumente na junção ureteropelvica, na porção ureteral que se relaciona com os vasos ilíacos e na porção intramural do ureter, onde seu diâmetro é diminuído (KOSEHAN et al, 2013). O termo mais amplo, uropatia obstrutiva, pode ser usado para indicar qualquer obstrução ao fluxo urinário ocorrendo entre a pelve renal e a uretra, o que pode provocar o desenvolvimento de hidronefrose e comprometimento renal associado. Estenoses ureterais e hiperplasia prostática benigna são exemplos de causas dessas obstruções (DOCHERTY et al, 2006).

Os cálculos ureterais são a causa mais comum dessas obstruções ureterais. A origem desses urólitos é multifatorial (ROBERTSON et al, 1978; KNOLL et al, 2010). Além de fatores físico-químicos e fatores clínicos de risco concomitantes, como o grau de saturação de urina e o nível da atividade inibitória da cristalização (ROBERTSON et al, 1983; MOE et al, 2006), estudos mostraram numerosos fatores epidemiológicos e demográficos como dieta, obesidade e estilo de vida, que supostamente influenciam no risco da formação de urólitos (CURHAN et al, 2007; SCALES et al, 2012). Esses urólitos que se formam no rim podem estar localizados no parênquima renal, cálice, pelve, ou no ureter. O tamanho e a localização têm a maior efeito nos sintomas (ANDERSON et al, 2012; SCALES et al, 2012; SHOAG et al, 2015; PFAU et al, 2016). A probabilidade da passagem do urólito depende da localização, tamanho e forma. A obstrução aguda apresenta tipicamente uma cólica renal como maior sintoma (DOCHERTY et al, 2006).

A obstrução ureteral em ratos é amplamente utilizada como modelo de estudo da nefropatia obstrutiva (HOU et al, 2015). Diversos estudos demonstraram que a

obstrução ureteral unilateral (OUU) provoca uma isquemia glomerular sustentada, associada à ativação do sistema renina angiotensina (DAL CANTON et al, 1977; DAL CANTON et al, 1979; DAL CANTON et al, 1980).

A duração da OUU e a extensão da perda celular desempenham um papel central na recuperação da taxa de filtração glomerular e posterior remodelamento e reparação renal. A OUU de curto prazo em ratos parece ser completamente reversível (BANDER et al, 1985). Por outro lado, a OUU por 72 horas neste mesmo modelo, pode levar a alterações fibróticas e apoptóticas renais culminando em uma diminuição permanente da taxa de filtração glomerular (ITO et al, 2004). Chevalier e colaboradores (CHEVALIER et al, 1999) demonstraram recuperação da estrutura renal em ratos neonatais com OUU, quando foi feita desobstrução em 2 a 5 dias.

Ekinci e colaboradores (2003), utilizando um modelo de coelho, comprovaram que durante a OUU completa ou parcial ocorrem alterações progressivas como edema glomerular, congestão de vasos sanguíneos, dilatação tubular e sinais de apoptose e necrose no epitélio do rim contralateral (EKINCI et al, 2003).

Em um estudo de tomografia computadorizada foram feitas imagens para avaliações anatômicas e funcionais renais em modelo de OUU em ratos. As alterações predominantes foram alterações na hemodinâmica do sistema vascular renal após obstrução ureteral por 24 horas ou mais. O parênquima renal foi significativamente reduzido após uma semana, e as características das alterações histológicas apoiaram os achados das imagens de tomografia computadorizada. Nos rins contralaterais desobstruídos, as imagens apresentaram estrutura e função normais e a histopatologia revelou uma histoarquitetura sem alteração (REGAZZONI et al, 1998). Em 2016, Ehling e colaboradores também em um trabalho de tomografia computadorizada mostraram que após 14 dias de OUU, houve aumento do fluxo sanguíneo e do volume renal, sugerindo um crescimento compensatório desses rins contralaterais (EHLING et al, 2016).

Sabe-se que um único rim saudável (com morfologia e fisiologia normais) é suficiente para realizar todas as funções renais necessárias (REGAZZONI et al, 1998). Apesar disso, não é pequeno o número de pacientes nesta condição e que apresentam testes anormais de função renal. Pouco se sabe sobre os fatores que agravam a insuficiência renal nesses indivíduos (AL-Ani et al, 2015).

Não se sabe por que os pacientes com OUU apresentam sinais de comprometimento da função renal, mesmo com um rim contralateral normal.

Acredita-se que o órgão contralateral pode ser lesado pela obstrução ureteral unilateral. Assim, a nossa hipótese é que um rim/ureter obstruído pode ser mais prejudicial à morfologia do rim contralateral do que um rim ausente.

1. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi investigar em um modelo de ratos *Wistar*, a influência de um rim/ureter obstruído na morfologia do rim contralateral.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado na Unidade de Pesquisa Urogenital da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Foi aprovado pela Comissão de Ética para Cuidado e Uso de Animais Experimentais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEUA/UERJ) sob o numero de registro 042/2017.

2.1 Delineamento Experimental

Para realização do estudo, foram utilizados 40 ratos *Wistar* com três meses de idade pesando entre 356,5 e 438 gramas (desvio padrão=31,1).

Os animais foram confinados em ambiente com temperatura e umidade controladas, em caixas com dois indivíduos cada, nas dependências da Unidade de Pesquisa Urogenital e receberam ração padrão e água *ad libitum*.

Estes animais foram divididos em quatro grupos com dez animais em cada. No grupo SHAM (S), os animais foram submetidos ao tempo anestésico e cirúrgico similar aos outros grupos com abertura da cavidade abdominal sem nenhuma intervenção no trato urinário. No grupo controle (N) os animais foram submetidos à nefrectomia total unilateral do rim esquerdo no dia 0. Este grupo representa indivíduos com rim único, sem OUU. No grupo tratado (HN), os animais foram submetidos ao procedimento de ligadura da porção distal do ureter do rim esquerdo, e após 24 horas, foram submetidos à nefrectomia unilateral do rim esquerdo. Este grupo representa indivíduos com OUU tratada por nefrectomia após 24 horas de obstrução. No grupo não tratado (H), que mimetiza obstrução crônica sem desobstrução, os animais foram submetidos ao procedimento de ligadura da porção distal do ureter esquerdo sem qualquer outro tratamento. Todos os grupos foram submetidos à eutanásia após 30 dias, quando completaram quatro meses de vida, não recebendo nenhum outro tratamento, exceto pelo tratamento descrito no item 2.2.

2.2 Procedimento anestésico

A indução anestésica foi realizada por meio de câmara de gás com Isoflurano 2% (Forane, Abbott, Itatiaia, Brasil) (dose efeito). Após a indução, os animais foram posicionados em decúbito dorsal com uma máscara adaptada a sua face. A máscara foi conectada ao aparelho de anestesia (Colibri, BRASMED, Brasil) inalatória em circuito circular valvular, com fluxo corrente de 0,2 litro/min, em oxigênio a 100%, iniciando-se a manutenção anestésica com isoflurano (dose efeito), cuja administração foi realizada por meio de vaporizador universal. A analgesia transoperatória foi realizada por meio da administração intraperitoneal de cloridrato de tramadol (Tramal, Pfizer, Guarulhos, Brasil), “em bolus”, na dose de 5mg/kg, em dose única.

Foi administrado cloridrato de tramadol na dose de 1mg/kg intraperitoneal, a cada 24 horas, durante três dias consecutivos de pós-operatório. O procedimento cirúrgico foi iniciado na observação da frequência respiratória (< 60/min) e do reflexo não responsivo durante o pinçamento do dedo do membro posterior.

2.3 Técnica cirúrgica

Os animais foram operados sob técnica asséptica com o animal já em plano anestésico. Foi realizada celiotomia permitindo acesso à cavidade abdominal e em seguida eram realizados os seguintes procedimentos:

2.3.1 Ligadura ureteral (Grupos H e HN)

Após a localização do ureter esquerdo, foi realizada ligadura em seu terço distal com fio de seda de calibre 5-0 (Procare, Barueri, Brasil) (Figura 1). Em seguida foi realizada sutura contínua simples com fio de nylon de calibre 4-0 (Technofio,

Goiânia, Brasil) para fechamento da cavidade abdominal e o mesmo padrão de sutura e fio para fechamento da pele.

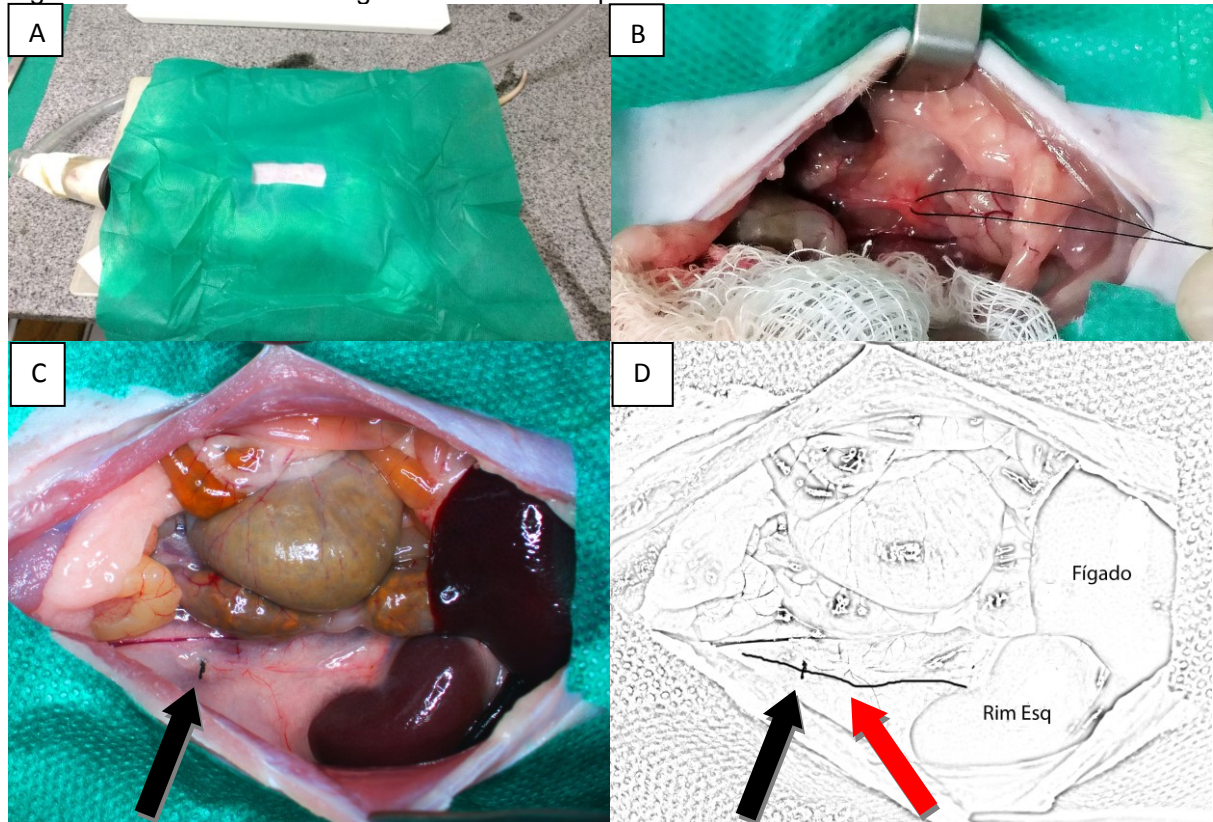
2.3.2 Nefrectomia total unilateral (Grupo N e HN)

O ureter, a veia e a artéria renais esquerdas foram ligados com fio de seda de calibre 5-0 (Procare, Barueri, Brasil). Em seguida o rim esquerdo foi retirado e armazenado em formalina tamponada. Em seguida foi realizada sutura contínua simples com fio de nylon de calibre 4-0 (Technofio, Goiânia, Brasil) para fechamento da cavidade abdominal e o mesmo padrão de sutura e fio para fechamento da pele.

2.3.3 Grupo SHAM (Grupo S)

Os animais desse grupo foram submetidos à laparotomia até atingir o mesmo tempo cirúrgico dos demais grupos. Em seguida foi realizada sutura contínua simples com fio de nylon de calibre 4-0 (Technofio, Goiânia, Brasil) para fechamento da cavidade abdominal e o mesmo padrão de sutura e fio para fechamento da pele.

Figura 1 – Procedimento de ligadura do ureter esquerdo.



Legenda: Sequencia do procedimento cirúrgico desde posicionamento do animal até a ligadura do ureter esquerdo. A, posicionamento do animal em decúbito dorsal e acoplado a máscara do aparelho de anestesia inalatória. B, logo após laparotomia o isolamento e ligadura do terço distal ureter esquerdo com fio de seda de calibre 5-0 (Procare, Brasil), causando a obstrução ureteral unilateral esquerda. C, ligadura em ureter esquerdo apontado com a seta preta. D, ureter (linha preta contínua apontado pela seta vermelha) ligado em seu terço distal, apontado com a seta preta.

Fonte: O autor, 2018

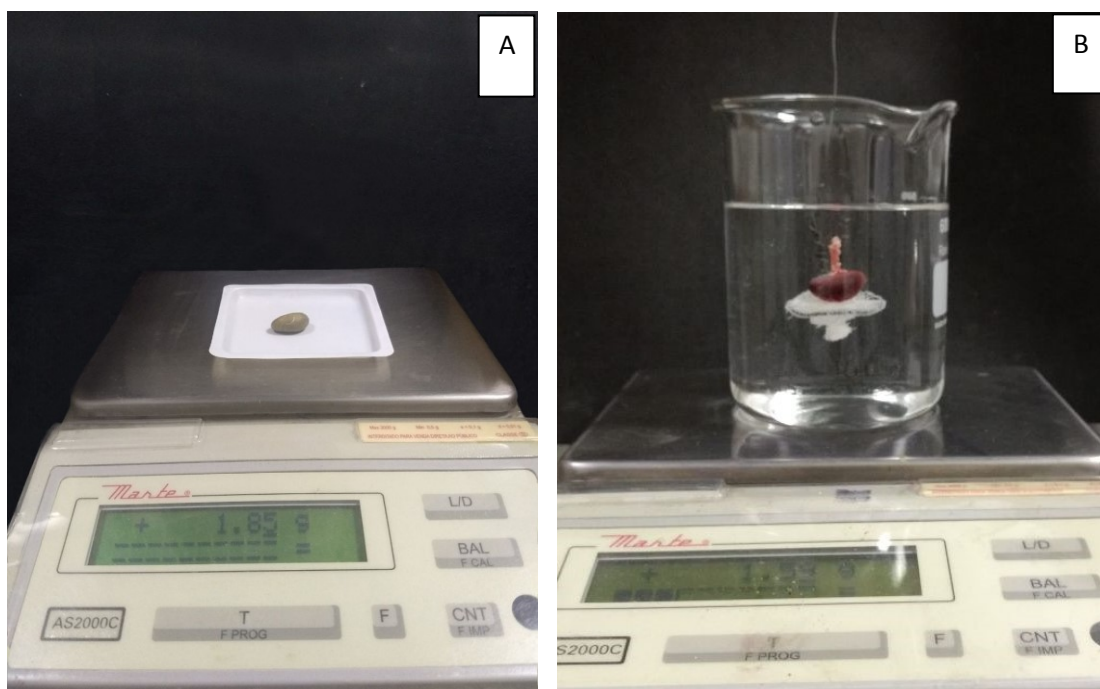
2.3.4 Pós-Operatório

Após a rafia da parede abdominal, os animais foram desacoplados do aparelho de anestesia, acondicionados novamente em suas respectivas caixas e observados até que retornassem do plano anestésico. Os parâmetros avaliados diariamente foram: integridade da ferida, presença de alterações neurológicas e sinais de dor (frequência respiratória, mobilidade e apetite).

2.4 Eutanásia e coleta de material

Após a anestesia do animal (item 3.2), foi realizada a coleta do sangue por punção cardíaca. Assim foi realizada exanguinação e eutanásia dos animais. Em seguida os rins foram coletados, pesados e seu volume aferido pelo método de Scherle (figura 2). Um método utilizado para determinar o volume de corpos com superfície irregular baseado no princípio de Arquimedes, isto é, um corpo total ou parcialmente imerso em um fluido sofre um empuxo que é igual ao peso do volume do fluido deslocado pelo corpo (SCHERLE, 1970). Finalmente os rins foram clivados em um corte transversal em seu terço médio e acondicionados em formaldeído 4% por dois dias.

Figura 2 – Mensuração de peso e volume dos rins.



Legenda: A, pesagem dos rins utilizando uma balança de precisão; B, utilização da balança para mensurar o volume renal através do método de Scherle.

Fonte: O autor, 2018.

2.5 Procedimentos histológicos

Após o período de 24-48 horas de fixação dos rins, estes foram clivados em cortes transversais de 1mm de espessura por toda sua extensão o que resultou em 8 cortes na maioria dos órgãos. Cada um destes cortes foi fotografado sob magnificação de cinco vezes, com câmera digital Axiocam 506 color (Carl Zeiss Microscopy, LLC, Jena, Alemanha) acoplada ao estereomicroscópio Stereo Discovery.V8 (Carl Zeiss).

Após as fotografias os fragmentos foram selecionados aleatoriamente e submetidos a técnicas histológicas de rotina: desidratadas em álcool e clarificadas em xilol na processadora Leica TP 1020 (Solms, Alemanha), para posterior inclusão em parafina no aparelho Leica EG 1150 H (Solms, Alemanha). Após a inclusão, foram realizados cortes histológicos com 5 µm de espessura no micrótomo Leica RM2125 RT (Solms, Alemanha). Para as análises histológicas foi utilizada a coloração Hematoxilina/Eosina (HE).

As análises foram realizadas utilizando-se fotomicrografias obtidas com resolução de 2040x1536 pixels, em um microscópio (Olympus BX51, Tóquio, Japão) equipado com uma câmera digital (Olympus DP71, Tóquio, Japão). Para cada análise, as fotomicrografias foram capturadas e salvas sob as mesmas condições.

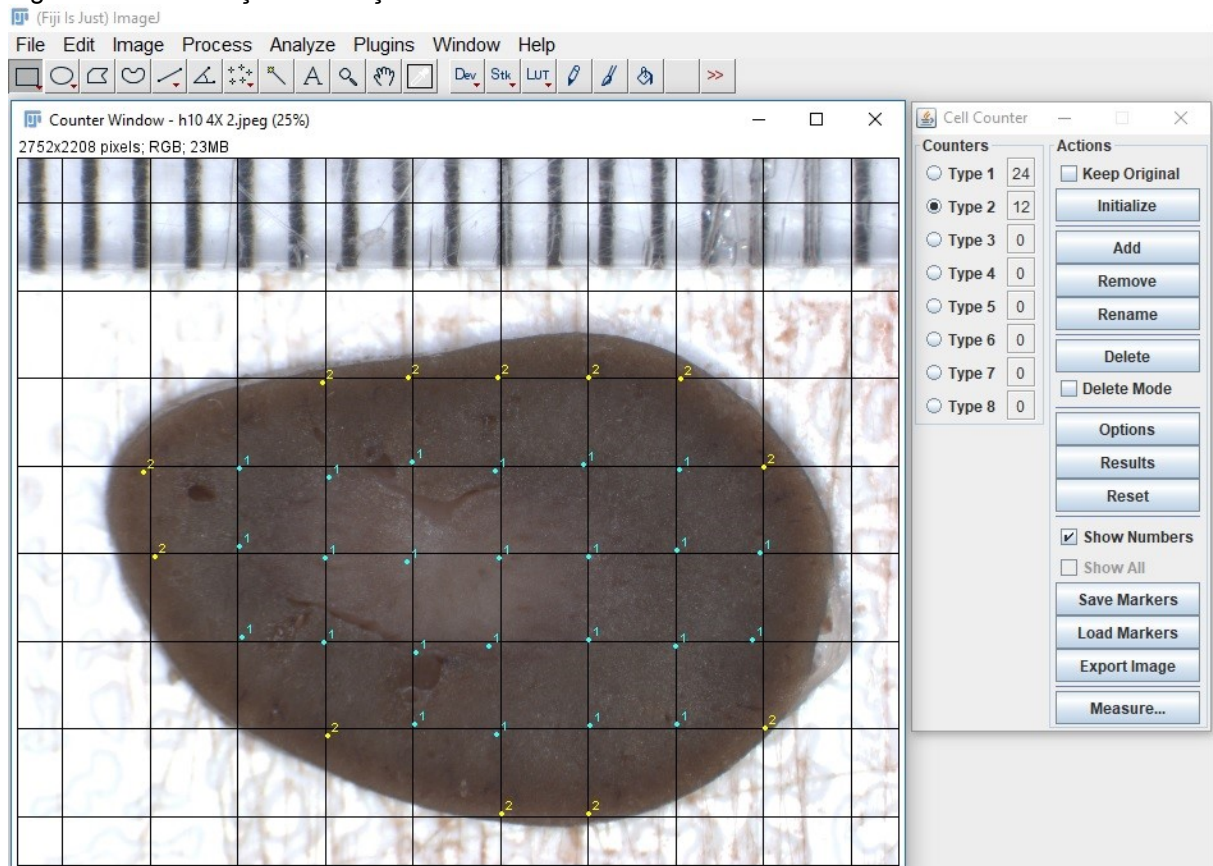
As análises morfométricas foram realizadas com o aumento de 200x. Para cada rim foram observados e fotografados 25 campos aleatórios. As mensurações foram realizadas com o software ImageJ ® (versão 1.47t, Image Processing and Analysis in Java, NIH, Bethesda, EUA). Todas as análises foram realizadas por um único avaliador.

2.5.1 Relação córtico-medular

A relação córtico-medular foi realizada utilizando o princípio de Cavalieri (SOUZA et al, 2013; ABREU et al, 2017). A análise morfométrica da área cortico-medular do rim foi realizada através de fotomicrografias dos cortes transversais no

software imageJ. Utilizando a ferramenta “Grid”, do software imageJ, foi sobreposto à fotomicrografia uma grade de cem pontos. Após, com a ferramenta “Cell Counter” foram marcados somente pontos onde as linhas horizontais e verticais da grade se encontram nas regiões de córtex e posteriormente na região de não córtex (Figura 3). A razão da quantidade de pontos entre as regiões definem a relação córtico-medular de cada rim.

Figura 3 – Mensuração da relação córtico-medular.



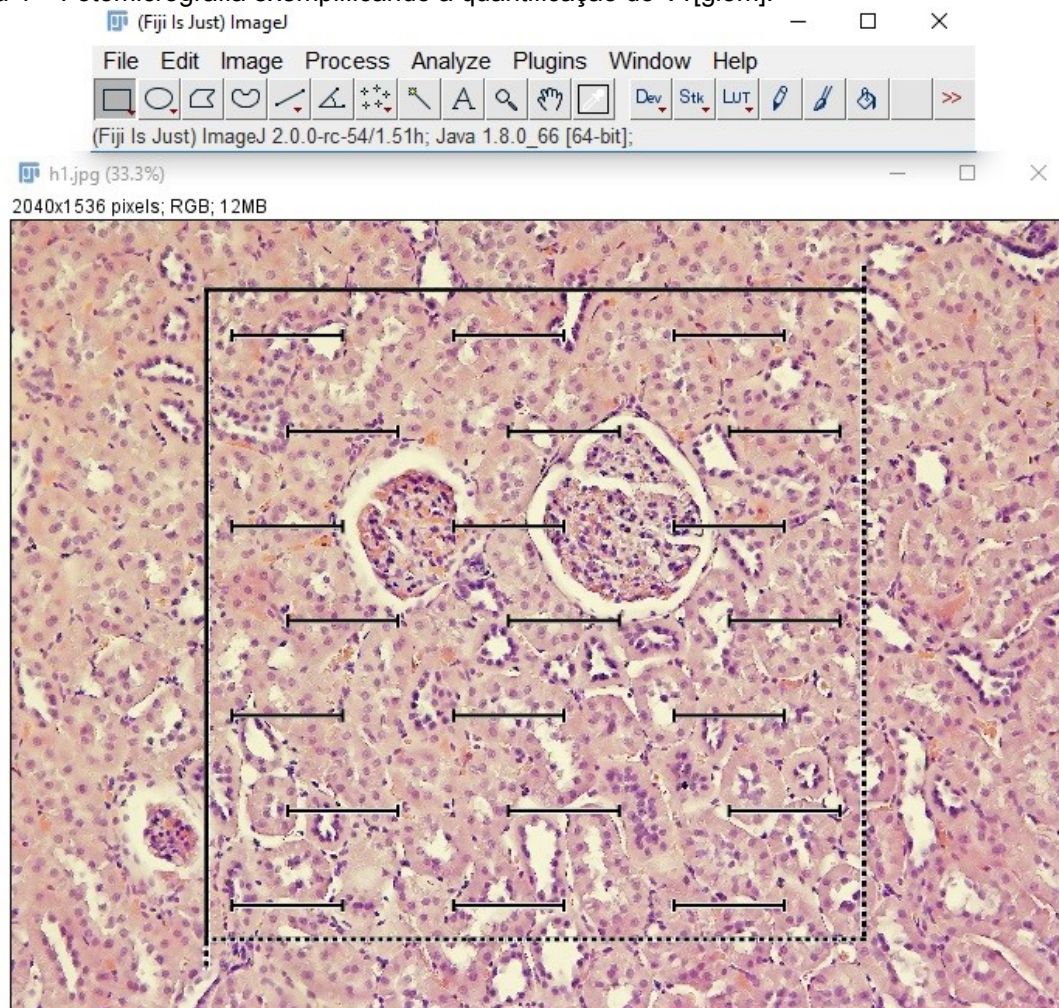
Legenda: A análise morfométrica da área córtico-medular do rim realizada através de fotomicrografias no software imageJ. Utilizando a ferramenta “Grid”, do software imageJ, foi sobreposto à fotomicrografia uma grade de cem pontos. Após, com a ferramenta “Cell Counter” foram marcados somente pontos onde as linhas horizontais e verticais da grade se encontram nas regiões de córtex e posteriormente na região de não córtex. A razão da quantidade de pontos entre as regiões definem a relação córtico-medular de cada rim.

Fonte: O autor, 2018.

2.5.2 Densidade volumétrica glomerular (Vv[glom])

A densidade volumétrica glomerular indica o volume relativo ocupado pelo glomérulo no córtex. Esta foi estimada através da metodologia de contagem de pontos com a grade M42, um sistema-teste composto por uma grade com 21 semi-retas e 42 pontos sobrepostos no campo histológico analisado (DE SOUZA et al, 2011). Quando o ponto sobrepõe um glomérulo na imagem é contabilizado. Se o ponto sobrepusesse o glomérulo que cruza a linha superior ou lateral esquerda da M42, este foi considerado. Porém se o glomérulo contado estivesse sobreposto à linha pontilhada inferior ou à lateral direita não foi considerado (Figura 4).

Figura 4 – Fotomicrografia exemplificando a quantificação do Vv[glom].



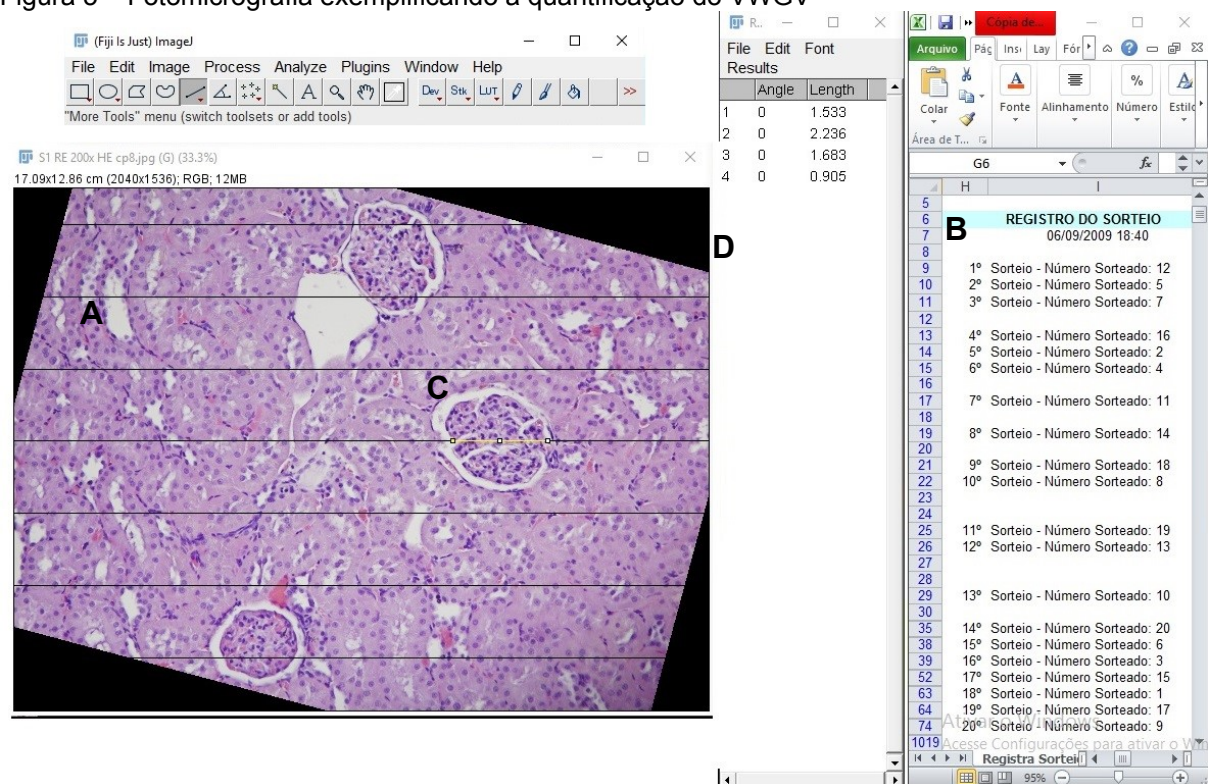
Legenda: Utilização da grade M42, sobreposta na imagem histológica da região cortical de rim direito de rato *Wistar*, utilizando o software imageJ para contagem de pontos que interceptam os glomérulos.

Fonte: O autor, 2018.

2.5.3 Volume glomerular médio ponderado (VWGV)

O volume glomerular médio ponderado, que estima o volume que um glomérulo ocupa no rim, foi calculado pelo método de pontos que interceptam glomérulos na fotomicrografia. Novamente com auxílio do software ImageJ, utilizando uma régua logarítmica de 32-mm composta por uma serie de 15 classes. Randomicamente foram medidos glomérulos que cruzaram a linha da grade onde foram analisados 50 glomérulos por animal. As imagens foram fotografadas com aumento de 200x. (Figura 5) (AGUILA et al, 2005; DE SOUZA et al, 2011).

Figura 5 – Fotomicrografia exemplificando a quantificação do VWGV



Legenda: A) Fotomicrografia rotacionada, com auxílio da angulação sorteada na tabela do excel (B), sobreposta com linhas do pluggin "Grid". C) Nota-se no glomérulo central sobreposto por uma linha amarela que esta acima da linha do "grid" onde foi realizada uma mensuração com a ferramenta "measure" gerando a medida em centímetros numa tabela (D).

Fonte: O autor, 2018.

2.5.4 Número de Glomérulos

O número de glomérulos, expresso como o número de glomérulos por rim, foi calculado utilizando-se a fórmula abaixo (SOUZA et al, 2013):

$$N[\text{Glom}] = (Vv[\text{Glom}] \times \text{RCM} \times \text{VR}) / \text{VWGV}$$

N[Glom] – Número de glomérulos

Vv[Glom] – Densidade volumétrica do glomérulo

RCM – Relação córtico-medular

VR – Volume renal

VWGV – Volume glomerular médio.

2.5.5 Volume Cortical

O volume do córtex renal foi calculado através da multiplicação da relação córtico-medular pelo volume renal.

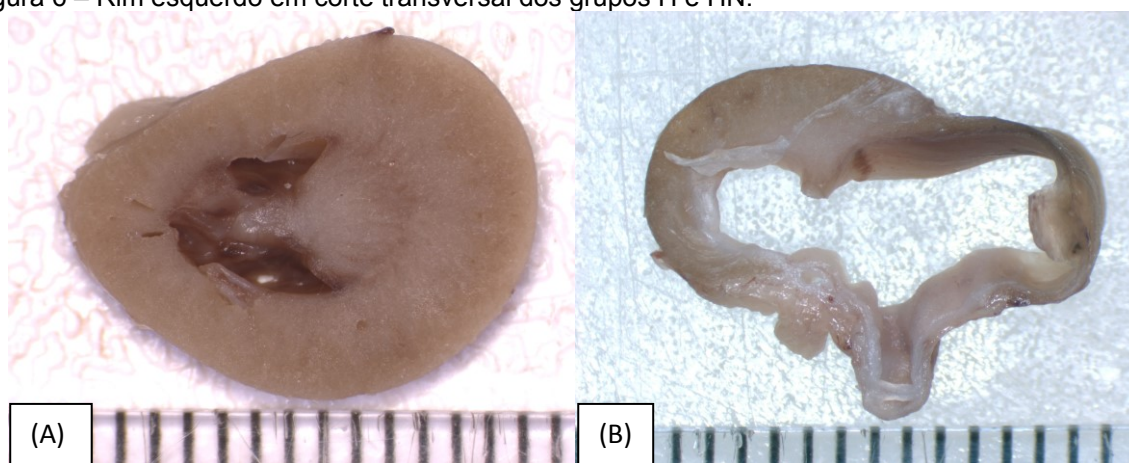
2.6 **Análise estatística**

A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prism 5. Para a análise entre grupos foi utilizado o teste One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Para todas as análises, p foi considerado significativo quando < 0,05 e os resultados foram expressos em média e desvio padrão.

3. Resultados

Não houve alterações clínicas no pós-operatório ou óbito de animais durante o experimento. O modelo de OUU foi confirmado por visualização direta durante a eutanásia dos animais do grupo H e durante a nefrectomia dos animais do grupo HN. Nestes animais, um ureter dilatado foi facilmente observado cranial à ligadura aplicada. Em animais do grupo H, sinais macroscópicos de hidronefrose também foram evidentes durante a necropsia. No grupo S e N não foram notadas alterações macroscópicas durante a retirada dos rins, estes permaneceram sem alterações comparando ao primeiro procedimento e aos demais rins. Quando realizado corte transversal nos rins foi observada dilatação na pelve renal dos grupos H e HN (Figura 6).

Figura 6 – Rim esquerdo em corte transversal dos grupos H e HN.

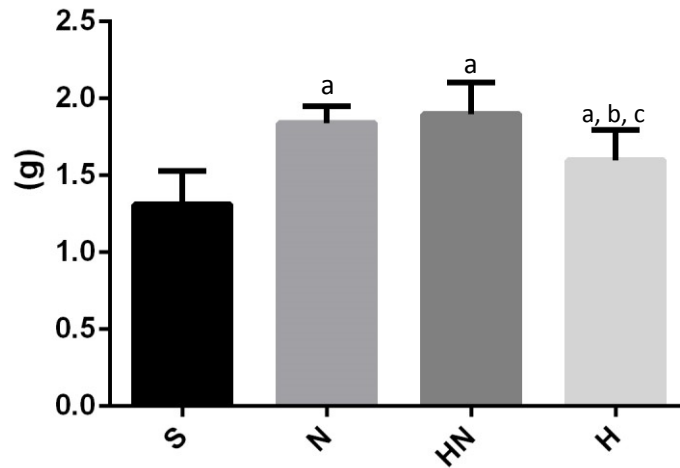


Legenda: Fotos evidenciando a lesão causada nos rins esquerdos submetidos à obstrução ureteral por 24 horas (A), com sinal de hidronefrose leve e por 30 dias (B), com hidronefrose grave com destruição do parênquima renal.

Fonte: O autor, 2018.

O peso dos rins direito dos grupos H, HN e N aumentou 21,4%, 44,3% e 40,4%, respectivamente, em comparação com o grupo S. Além disso, os rins direito dos animais dos grupos HN e N (grupos que foram submetidos à nefrectomia) pesaram 18,8% e 15,7% mais que os do grupo H (Figura 7).

Figura 7 – Gráfico do peso do rim direito entre grupos.

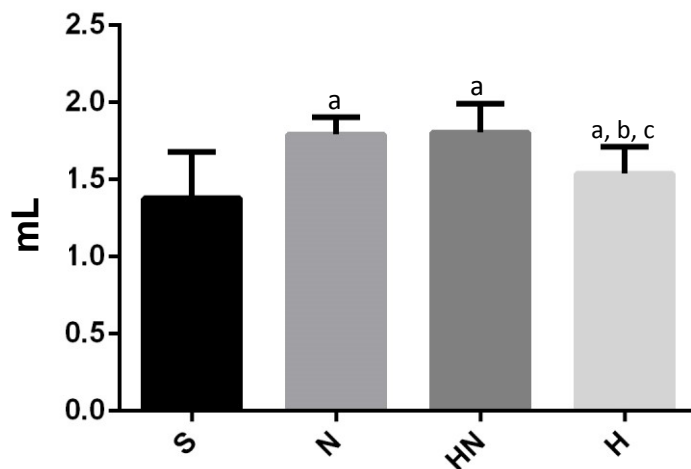


Legenda: Foi observada diferença no peso do rim direito entre os grupos, exceto entre o grupo N com o grupo HN ($p < 0,0001$). a: diferente do S; b: diferente do N; c: diferente do HN. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Fonte: O autor, 2018.

Os grupos HN e N também apresentaram volumes aumentados de rim (30,4% e 29,7%, respectivamente) em comparação com o grupo S (Figura 8).

Figura 8 – Gráfico do volume do rim direito entre grupos.

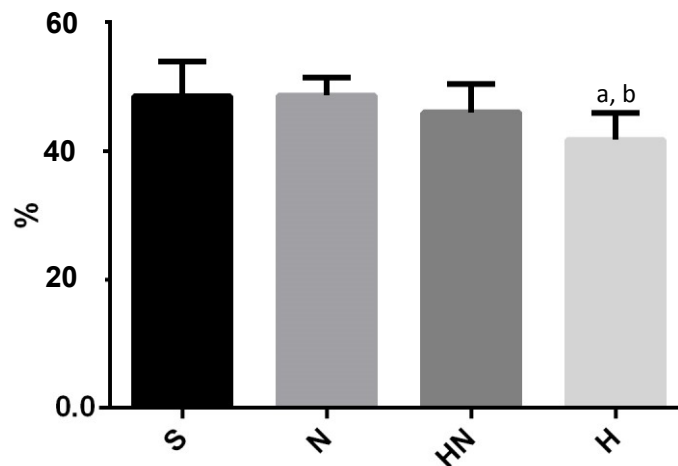


Legenda: Foi observada diferença no volume do rim direito entre o grupo S com os grupos N e HN ($p = 0,0002$). a: diferente do S; b: diferente do N; c: diferente do HN. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Fonte: O autor, 2018.

Na relação córtico-medular, o grupo H apresentou valores reduzidos em relação aos grupos S e N, com redução de 14,0% e 13,1%, respectivamente (Figura 9).

Figura 9 – Gráfico da relação córtico-medular do rim direito entre grupos

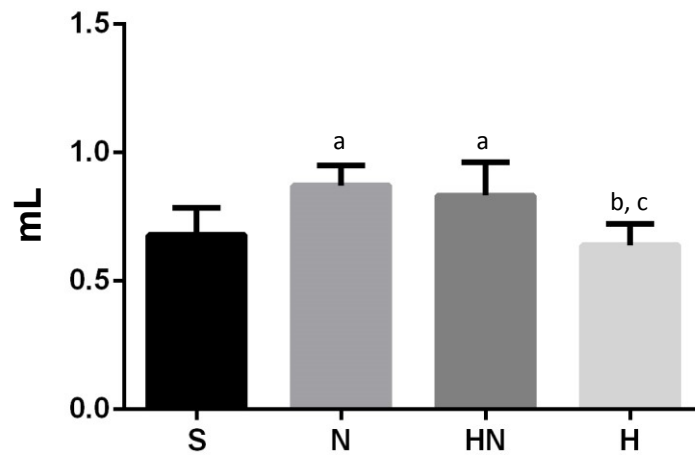


Legenda: No rim direito do grupo H foi observada diferença na relação córtico-medular comparado aos grupos N e S ($p=0,0001$). a: diferente do S; b: diferente do N; c: diferente do HN. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Fonte: O autor, 2018.

O volume cortical foi aumentado nos grupos N e HN em 28,4% e 22,7% em comparação com o grupo S; e em 36,2% e 30,1% em relação ao grupo H (Figura 10).

Figura 10 - Gráfico do volume cortical do rim direito dos grupos.

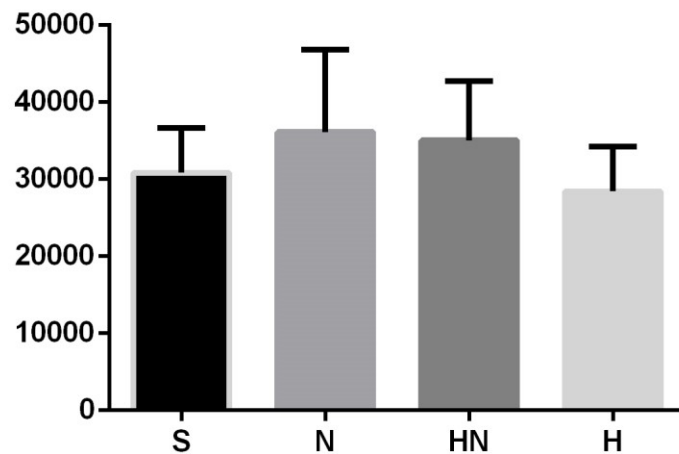


Legenda: Houve diferença entre o grupo S com os grupos HN e N e entre o grupo H com os grupos N e HN ($P < 0,0001$). a: diferente do S; b: diferente do N; c: diferente do HN. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Fonte: O autor, 2018.

Não foram observadas diferenças nos Vv [glom] e VWGV entre os rins direitos dos indivíduos. Finalmente, não houve diferença no número de glomérulos no rim direito (Figuras 11, 12 e 13). O Vv[glom] dos rins direito não apresentou diferença entre os grupos ($p=0,5762$). O VWGV do rim direito não apresentou diferença entre os grupos ($p=0,5278$) (Tabela 1).

Figura 11 - Gráfico do numero de glomérulos do rim direito dos grupos.



Legenda: Não houve diferença no numero de glomérulos por rim entre os grupos ($p=0,1311$). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Fonte: O autor, 2018.

Tabela 1. Dados morfométricos dos rins direitos dos ratos submetidos à nefrectomia ou à obstrução ureteral do rim esquerdo.

	S	N	HN	H	valor de p
Peso (g)	1,31 $\pm$ 0,21	1,84 $\pm$ 0,10 ^a	1,90 $\pm$ 0,20 ^a	1,60 $\pm$ 0,19 ^{a,b,c}	<0,0001
Volume (mL)	1,38 $\pm$ 0,30	1,79 $\pm$ 0,11 ^a	1,81 $\pm$ 0,18 ^a	1,54 $\pm$ 0,17	0,0002
Relação córticomedular (%)	48,5 $\pm$ 5,30	48,6 $\pm$ 2,70	46,0 $\pm$ 4,40	41,7 $\pm$ 4,20 ^{a,b}	0,0037
Volume Cortical (mL)	0,68 $\pm$ 0,10	0,87 $\pm$ 0,08 ^a	0,83 $\pm$ 0,13 ^a	0,64 $\pm$ 0,08 ^{b,c}	<0,0001
Vv[glom] (%)	4,31 $\pm$ 0,76	4,29 $\pm$ 1,00	4,01 $\pm$ 0,79	4,41 $\pm$ 1,22	0,8534
VWGV ($\mu\text{m}^3 \times 10^5$)	9,60 $\pm$ 2,06	10,57 $\pm$ 1,26	9,57 $\pm$ 1,49	10,63 $\pm$ 2,72	0,5278
Glomérulos por rim ($\times 10^3$)	30,8 $\pm$ 5,80	36,1 $\pm$ 10,70	35,1 $\pm$ 7,70	28,4 $\pm$ 5,80	0,1311

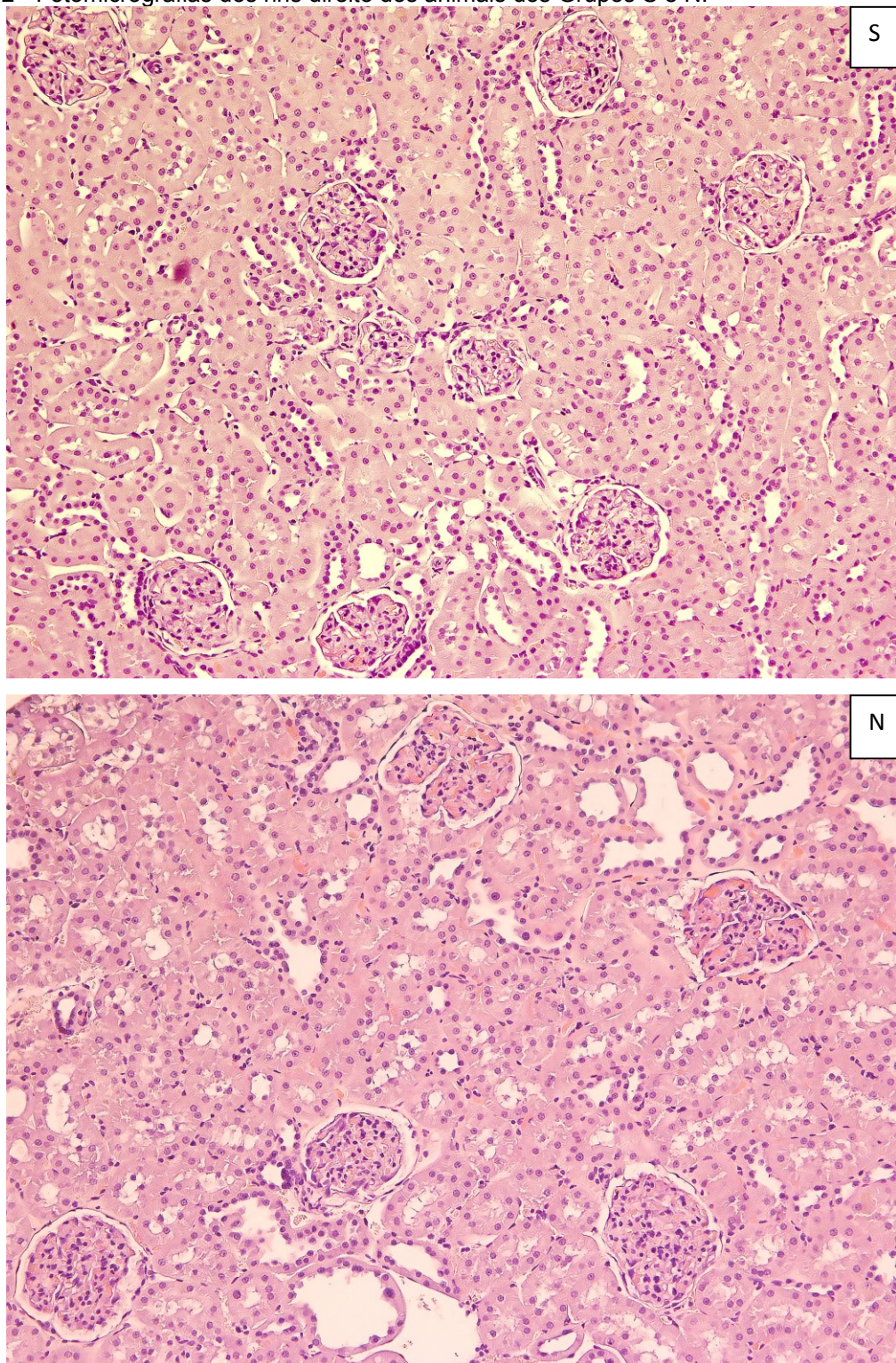
Legenda: Vv[glom]: Densidade Volumétrica glomerular; VWGV: Volume Glomerular médio ponderado; GS: Grupo dos animais sham; GN: Grupo dos animais submetidos à nefrectomia; GHN: Grupo dos animais submetidos à obstrução ureteral e tratados através da nefrectomia; GH: Grupo dos animais submetidos à obstrução ureteral unilateral não tratados.

a: diferença entre o GS; b: diferença entre o GN; c: diferença entre o GHN.

Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão

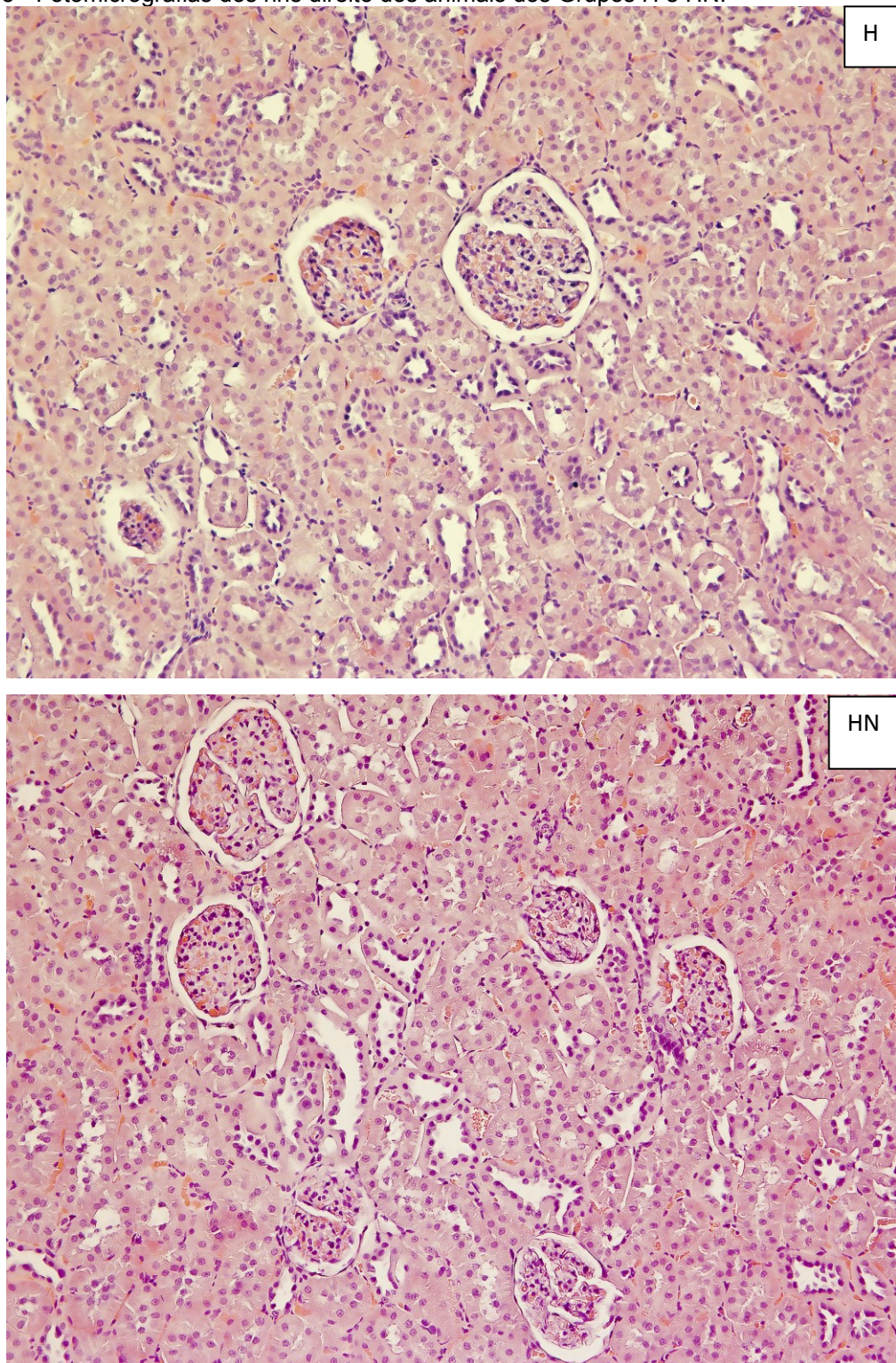
Fonte: O autor, 2018.

Figura 12 - Fotomicrografias dos rins direito dos animais dos Grupos S e N.



Legenda: Fotomicrografias dos rins direitos dos grupos S e N coradas em HE no aumento de 200x, mostrando glomérulos na região de córtex renal.
Fonte: O autor, 2018.

Figura 13 - Fotomicrografias dos rins direito dos animais dos Grupos H e HN.



Legenda: Fotomicrografias dos rins direitos dos grupos H e HN coradas em HE no aumento de 200x, mostrando glomérulos na região de córtex renal.
Fonte: O autor, 2018

4. DISCUSSÃO

O presente estudo agrega informações a um tópico que raramente é investigado: o rim contralateral de um indivíduo com obstrução ureteral. É clinicamente reconhecido que alguns pacientes com obstrução ureteral unilateral e um rim contralateral normal apresentam uma maior disfunção urinária do que os pacientes com um único rim (AL-ANI et al, 2015). Esta é uma condição que intriga muitos urologistas, pois é esperado que o rim contralateral saudável mantivesse filtração sanguínea adequada. Apesar desta resposta incomum da função renal, poucas pesquisas foram realizadas nesta área.

Os roedores submetidos à OU unilateral são amplamente utilizados para estudar fibrose intersticial renal e nefropatia obstrutiva no rim ipsilateral. Isso é muito adequado para entender o dano tubulointersticial, um processo que se assemelha bastante à deterioração da função renal na doença renal crônica humana (DENDOOVEN et al, 2011). O rim obstruído desenvolve uma hidronefrose grave com perda marcada do parênquima renal em 1-2 semanas (CHEVALIER et al, 2009). Esta alteração no rim ipsilateral foi confirmada (após quatro semanas) no presente estudo, no entanto, o foco do estudo foi a influência da OU unilateral no órgão contralateral.

Neste experimento, foi demonstrado que os rins direitos de animais submetidos à nefrectomia esquerda (em animais com ou sem obstrução ureteral esquerda) respondem ao órgão ausente com aumento de volume e peso. Além disso, nesses grupos (N e HN) a região cortical do rim foi a região aumentada. Esta hipertrofia renal contralateral após nefrectomia radical está bem documentada em modelos animais e humanos (HAYSLETT et al, 1968; CHOI et al, 2015; CHOI et al, 2017). O aumento proporcional observado nos grupos N e HN foi em conformidade com o encontrado em seres humanos, em que a hipertrofia contralateral foi relatada variando de 18,5% a 29,3% (PABICO et al, 1975; CHOI et al, 2015).

No entanto, animais com um ureter esquerdo obstruído permanentemente não mostraram essa resposta hipertrófica, diferente da literatura anterior. Nesses animais, apesar de ter um rim esquerdo não filtrante, os rins direito não mostraram volumes renais ou corticais aumentados; com apenas um aumento moderado no

peso do rim, mas com uma proporção córticomedular reduzida. Como esperado, se um rim não está filtrando, o órgão contralateral deve se tornar hipertrofiado, de modo similar aos grupos submetidos à nefrectomia. No entanto, a presença deste rim obstruído de alguma forma impediu a resposta morfológica contralateral normal. Isso confirma, pelo menos parcialmente, a hipótese de que um rim/ureter obstruído pode ser mais prejudicial para a morfologia renal global do que um rim ausente.

Os motivos dessa resposta prejudicada permanecem desconhecidos, mas sugere-se que a presença de um rim (mesmo um não filtrando) é reconhecida pelo órgão contralateral. As evidências eletrofisiológicas e funcionais demonstram que um rim influencia a função do órgão contralateral (BARRY et al, 2015; DIBONA et al, 1982; KOPP et al, 1987). Por exemplo, a infusão de bradicinina em um rim promoveu uma antinatriurese dependente da inervação renal no rim contralateral (BARRY et al, 2015). Além disso, o aumento da pressão uretral em ratos resultou em aumento da atividade do nervo renal aferente ipsilateral e aumento do fluxo de urina contralateral e excreção urinária de sódio (KOPP et al, 1987). Essas respostas contralaterais são conhecidas como o reflexo renorrenal, pelo qual os rins ajustam suas funções "se comunicando" um com o outro através do sistema nervoso visceral (BARRY et al, 2015). Apesar do reflexo renorrenal não se mostrar nos modelos de OUU, pode fornecer uma explicação sobre como o reconhecimento do órgão contralateral prejudica a hipertrofia renal.

O sistema renina-angiotensina também contribui para a adaptação dos rins contralaterais após OUU em animais imaturos, sendo arbitrado como mecanismo de comunicação entre os rins (CHEVALIER et al, 1990). A OUU no rato neonato resultou em aumento do conteúdo de renina do rim ipsilateral e diminuição do conteúdo de renina do rim oposto intacto (CHEVALIER et al, 1990). No entanto, ao contrário da resposta renal para OUU durante o desenvolvimento inicial, o animal maduro não ativou a expressão do gene da renina nem alterou a distribuição da renina nos rins obstruídos (EI-DAHR et al, 1990). Uma vez que a renina nunca foi investigada em órgãos contralaterais, não se sabe se o sistema renina-angiotensina pode atuar como um sistema de comunicação em animais adultos, como observado em indivíduos imaturos.

A obstrução ureteral é uma das complicações urológicas mais comuns após o transplante renal, ocorrendo em 2 a 10% dos órgãos transplantados (BERGER et al, 1998; SANDHU et al, 2002). Mesmo assim, os efeitos adversos nos rins nativos de

pacientes transplantados com OU não foram relatados (KUMAR et al, 2014; GRECO et al, 2016). Isso pode ser explicado porque os rins nativos de pacientes transplantados já apresentam insuficiência crônica. Além disso, os órgãos transplantados são desnervados e, portanto, não podem estabelecer nenhum tipo de sistema de comunicação. Em estudos futuros seria importante utilizar modelo de animais transplantados, onde estes fossem obstruídos, como em nosso modelo atual, para entender o efeito dessa obstrução no rim contralateral já que não há comunicação no rim transplantado.

É geralmente relatado que pacientes com função renal anormal devido a OUU (mesmo com um rim contralateral normal) recuperam rapidamente a função renal normal após a colocação de um cateter ureteral restaurando o fluxo urinário. O uso de um modelo animal para estudar o ureter obstruído seguido de desobstrução poderia contribuir para o entendimento desse mecanismo. No entanto, isso não foi viável neste modelo de ratos. No presente estudo, um grupo de animais submetidos à OUU foi tratado com nefrectomia para simular um possível tratamento para esta condição. Estudos futuros usando porcos ou ovelhas, que provaram serem modelos animais efetivos para investigar o trato urinário superior (BUYS-GONÇALVES et al, 2016; DE SOUZA et al, 2016; SIMOES et al, 2016), são justificados.

Embora não tenham sido observadas diferenças no número de glomérulos entre os grupos, a volumetria do rim (e suas regiões) provou ser importante. Os resultados indicaram que os volumes dos túbulos renais foram aumentados, o que está de acordo com a literatura (HAYSLETT et al, 1968). Desde 1980, métodos estereológicos são realizados para obter informações quantitativas de estruturas bidimensionais ou tridimensionais de secções renais (EISENBRANDT et al, 1980). A vantagem desta avaliação é que pode fornecer informações quantitativas confiáveis sobre a estrutura de interesse mesmo não analisando esta por inteiro (NYENGAARD, 1999). Esse método tem sido utilizado para estudar o número de glomérulos em diferentes condições (SOUZA et al, 2013; BENCHIMOL et al, 2011; MIRANDA et al, 2015; BECHARA et al, 2016) e é considerado um método altamente sensível (FELIX-PATRÍCIO et al, 2015). Assim, pode-se pensar que o rim obstruído não promoveu alterações no número de glomérulos, mas na estrutura tubular do rim contralateral.

O presente estudo tem limitações na medida em que é um estudo experimental realizado em roedores, que pode ter uma resposta fisiológica diferente

em relação aos humanos. Além disso, o experimento foi conduzido sob condições controladas, o que não reflete um cenário clínico normal. Assim, estudos futuros são necessários antes de transpor esses resultados para a prática médica.

CONCLUSÃO

O rim contralateral de ratos submetidos à nefrectomia, com ou sem obstrução ureteral, demonstra uma resposta hipertrófica. No entanto, quando o rim / ureter obstruído não foi removido, essa resposta hipertrófica não ocorreu. Isso confirma a hipótese inicial de que um rim / ureter obstruído é mais prejudicial à morfologia contralateral renal do que um rim ausente.

REFERENCIAS

1. Abreu L, Damasceno-Ferreira JA, Costa WS, Pereira-Sampaio MA, Sampaio FJB, de Souza DB: Glomerular loss after renal radiofrequency ablation are comparable to 30 minutes of warm ischemia. *J Endourol*, v 31, p. 517-521, 2017.
2. Aguila MB, Pinheiro AR, Aquino JC, Gomes AP, Mandarim-de-Lacerda CA. Different edible oil beneficial effects (canola oil, fish oil, palm oil, olive oil, and soybean oil) on spontaneously hypertensive rat glomerular enlargement and glomeruli number. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, v 76, p. 74–85, 2005.
3. Al-Ani A, Al-Jalham K, Ibrahim T, Majzoub A, Al-Rayashi M, Hayati A, Mubarak W, Al-Rayahi J, Khairy AT. Factors determining renal impairment in unilateral ureteral colic secondary to calculi disease: a prospective study. *Int urology and nephrology*, v 47, p. 1085-1090, 2015.
4. Anderson JK, Cadeddu JA. Surgical anatomy of the retroperitoneum, adrenals, kidney and ureters. In: Wein AJ, Kavoussi LT, editors. *Campbell-Walsh Urology*. Elsevier, p. 3–32, 2012.
5. Bander SJ, Buerkert JE, Martin D, Klahr S. Long-term effects of 24-hr unilateral ureteral obstruction on renal function in the rat. *Kidney Int*, v 28 p. 614–620, 1985.
6. Barry EF, Johns EJ. Intrarenal bradykinin elicits reno-renal reflex sympatho-excitation and renal nerve-dependent fluid retention. *Acta Physiol*, v 213, p. 731-739, 2015.
7. Benchimol de Souza D, Silva D, Marinho Costa Silva C, Barcellos Sampaio FJ, Silva Costa W, Martins Cortez C. Effects of immobilization stress on kidneys of Wistar male rats: A morphometrical and stereological analysis. *Kidney Blood Press Res*, v 34, p. 424–429, 2011.
8. Berger PM, Diamond JR: Ureteral obstruction as a complication of renal transplantation: A review. *J Nephrol*, v 11, p. 20-23, 1998.
9. Buys-Goncalves GF, De Souza DB, Sampaio FJ, Pereira-Sampaio MA. Anatomical Relationship Between the Kidney Collecting System and the Intrarenal Arteries in the Sheep: Contribution for a New Urological Model. *Anat Rec (Hoboken)*, v 299, p. 405-411, 2016.
10. Chevalier RL. Counterbalance in functional adaptation to ureteral obstruction during development. *Pediatr Nephrol*, v 4, p. 442-444, 1990.
11. Chevalier RL, Kim A, Thornhill BA, Wolstenholme JT. Recovery following relief of unilateral ureteral obstruction in the neonatal rat. *Kidney Int*, v 55, p. 793–807, 1999.

12. Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int*, v 75, p. 1145-1152, 2009.
13. Choi KH, Lee SR, Hong YK, Park DS. Compensatory Structural and Functional Adaptation After Nephrectomy in Obese Patients According to Waist Circumference. *Urology*, v 104, p. 115-121, 2017.
14. Curhan GC. Epidemiology of stone disease. *Urologic Clin North Am*, v 34(3), p. 287–293, 2007
15. Dal Canton A, Stanziale R, Corradi A, Andreucci VE, Migone L. Effects of acute ureteral obstruction on glomerular hemodynamics in rat kidney. *Kidney Int*. v 12, p. 403–411, 1977.
16. Dal Canton A, Stanziale R, Corradi A, Maruccio G, Migone L. Effects of 24-hour unilateral ureteral obstruction on glomerular hemodynamics in rat kidney. *Kidney Int*. v 15, p. 457–462, 1979.
17. Dal Canton A, Stanziale R, Corradi A, Maruccio G, Migone L. Glomerular hemodynamics before and after release of 24-hour bilateral ureteral obstruction. *Kidney Int*. v 17, p. 491–496, 1980.
18. Dendooven A, Ishola DA, Jr., Nguyen TQ, Van der Giezen DM, Kok RJ, Goldschmeding R, Joles JA: Oxidative stress in obstructive nephropathy. *Int J Exp Pathol*, v 92, p. 202-210, 2011.
19. Dibona GF. The Functions of the Renal Nerves. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol*, v 94, p. 76-181, 1982.
20. De Souza DB, Costa WS, Damasceno-Ferreira JA, Nascimento Júnior A, Ascoli FO, Pereira-Sampaio MA, Sampaio FJ. The sheep as a model for healing studies after partial nephrectomy. *J Surg Res*, v 200, p. 387-391, 2016.
21. Docherty NG, O’Sullivan OE, Healy DA, Fitzpatrick JM, Watson RWG. Evidence that inhibition of tubular cell apoptosis protects against renal damage and development of fibrosis following ureteric obstruction. *Am J Physiol*, v 290, p. 4-13, 2006.
22. Ehling J, Ková JB, Gremse F, Klinkhammer BM, Baetke S, Knuechel R, Kiessling F, Floege J, Lammers T, Boor P. Quantitative micro-computed tomography imaging of vascular dysfunction in progressive kidney diseases. *J Am Soc Nephrol*, v 27(2), p. 520–532, 2016.
23. Eisenbrandt DL, Phemister RD. Counting renal corpuscles in tissue sections. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, v 32(2), p. 177-184, 1980.
24. Ekinci S, Ciftci AO, Atilla P, Muftuoglu S, Senocak ME, Buyukpamukcu N. Ureteropelvic junction obstruction causes histologic alterations in contralateral kidney. *J Pediatr Surg*, v 38, p. 1650-1655, 2003.

25. El-Dahr SS, Gomez RA, Khare G, Peach MJ, Carey RM, Chevalier RL: Expression of renin and its mrna in the adult rat kidney with chronic ureteral obstruction. *Am J Kidney Dis*, v 15, p. 575-582, 1990.
26. Felix-Patricio B, De Souza DB, Gregorio BM, Costa WS, Sampaio FJ. How to Quantify Penile Corpus Cavernosum Structures with Histomorphometry: Comparison of Two Methods. *Biomed Res Int*, v 2015, 2015.
27. Greco F, Alba S, Fornara P, Mirone V: Renal transplantation: Technical aspects, diagnosis and management of early and late urological complications. *Panminerva Med*, v 58, p. 294-303, 2016.
28. Hayslett JP, Kashgarian M, Epstein FH. Functional correlates of compensatory renal hypertrophy. *J Clin Invest*, v 47, p. 774-799, 1968.
29. Hou J, Fujino M, Cai S, Ding Q, Li X. Noninvasive Monitoring and Evaluation of the Renal Structure and Function in a Mouse Model of Unilateral Ureteral Occlusion Using Microcomputed Tomography. *Int Surg*, v 100, p. 1237-1243, 2015.
30. Ito K, Chen J, Vaughan ED jr, Seshan SV, Poppas DP, Felsen D. Dietary L-arginine supplementation improves the glomerular filtration rate a renal blood flow after 24 hours of unilateral ureteral obstruction in rats. *J Urol*, v 171, p. 926–930, 2004.
31. Klahr S, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, v 283(5), p. 861–875, 2002.
32. Knoll T. Epidemiology, pathogenesis, and pathophysiology of urolithiasis. *Eur Urol Suppl*, v 9(12), p. 802–806, 2010.
33. Kopp UC, Olson LA, Dibona GF. Renorenal reflex responses to mechano- and chemoreceptor stimulation in the dog and the rat. *Am J Physiol*, v 246, p. 67-77, 1984.
34. Kopp UC, Smith LA. Renorenal reflex responses to renal sensory receptor stimulation in normotension and hypertension. *Clin Exp Hypertens*, v 9, p. 113-125, 1987.
35. Kosehan D, Akin K, Topcu A, et al. Spontaneous urinary extravasation: Detection rate with 64-row multidetector computed tomography in patients presenting with acute abdomen. *Emerg Radiol*, v 20, p. 273-277, 2013.
36. Kumar S, Ameli-Renani S, Hakim A, Jeon JH, Shrivastava S, Patel U: Ureteral obstruction following renal transplantation: Causes, diagnosis and management. *Br J Radiol*, v 87, 2014.
37. Miranda FJ, Souza DB, Frazão-Teixeira E, Oliveira FC, Melo JC, Mariano CM, Albernaz AP, Carvalho EC, Oliveira FC, Souza Wd, DaMatta RA. Experimental infection with the *Toxoplasma gondii* ME-49 strain in the Brazilian BR-1 mini pig is a suitable animal model for human toxoplasmosis. *Mem Inst Oswaldo Cru*, v 110, p. 95-100, 2015.

38. Moe OW. Kidney stones: pathophysiology and medical management. *Lancet* v 367(9507), p. 333–344, 2006.
39. Nyengaard JR. Stereologic methods and their application in kidney, research. *J Am Soc Nephrol*, v 10(5), p. 1100-1123, 1999.
40. Pabico RC, McKenna BA, Freeman RB. Renal function before and after unilateral nephrectomy in renal donors. *Kidney Int*, v 8, p. 166-175, 1975.
41. Picozzi SC, Marengi C, Casellato S, Ricci C, Gaeta M, Carmignani L. Management of ureteral calculi and medical expulsive therapy in emergency departments. *J Emerg Trauma Shock*, v 4, p. 70-76, 2011.
42. Pfau A, Knauf F. Update on Nephrolithiasis: Core Curriculum 2016. *Am J Kidney Dis*, v 68(6), p. 973-985, 2016.
43. Quinlan MR, Docherty NG, Watson RW, Fitzpatrick JM. Exploring mechanisms involved in renal tubular sensing of mechanical stretch following ureteric obstruction. *American journal of physiology. Renal physiology*, v 295(1), p. 1-11, 2008.
44. Regazzoni BM, Genton N, Pelet J, Drukker A, Guignard JP. Long-term followup of renal functional reserve capacity after unilateral nephrectomy in childhood. *J Urol*, v 160, p. 844-848, 1998.
45. Robertson WG, Peacock M, Heyburn PJ, Marshall DH, Clark PB. Risk factors in calcium stone disease of the urinary tract. *BJ Urol*, v 50(7), p. 449–454, 1978.
46. Robertson WG, Peacock M. Review of risk factors in calcium oxalate urolithiasis. *World J Urol*, v 1(3), p. 114–118, 1983.
47. Sandhu C, Patel U: Renal transplantation dysfunction: The role of interventional radiology. *Clin Radio*, v 57, p. 772-783, 2002.
48. Scales CD, Smith AC, Hanley JM, Saigal CS. Urologic diseases in America project. Prevalence of kidney stones in the United States. *Eur Urol*, v 62(1), p. 160–165, 2012.
49. Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*, v 26(1), 1970.
50. Simoes M, de Souza DB, Gallo CB, Pereira-Sampaio MA, Costa WS, Sampaio FJ. Histomorphometric comparison of the human, swine, and ovine collecting systems. *Anat Rec*, v 299, p. 967-972, 2016.
51. Singh I, Strandhoy JW, Assimosis DG. Pathophysiology of Urinary Tract Obstruction. In: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, editors. *CAMPBELL-WALSH UROLOGY*. 10 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, p. 1087-1121, 2012

52. Smith JM, Stablein DM, Munoz R, Hebert D, McDonald RA. Contributions of the Transplant Registry: The 2006 Annual Report of the North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies. *Pediatr Transplant*, v 11, p. 366-373, 2007.
53. Souza DB, Costa WS, Cardoso LE, Benchimol M, Pereira-Sampaio MA, Sampaio FJ. Does prolonged pneumoperitoneum affect the kidney? Oxidative stress, stereological and electron microscopy study in a rat model. *Int Braz J Urol*, v. 39(1), p. 30-36, 2013.
54. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, Bouman C, Macedo E, Gibney N, Tolwani A, Ronco C. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA*, v 294, p. 813–818, 2005.

APÊNDICE – Does a Ureteral Obstruction Affect the Contralateral Kidney Morphology? A Stereological Analysis in a Rodent Model (Artigo Publicado)

Urologia
Internationalis

Original Paper

Urol Int
DOI: 10.1159/000486760

Received: November 9, 2017
Accepted: January 10, 2018
Published online: ■■■■

Does a Ureteral Obstruction Affect the Contralateral Kidney Morphology? A Stereological Analysis in a Rodent Model

Rômulo F. Assunção^a Marco A. Pereira-Sampaio^{a,b} Francisco J.B. Sampaio^a
Diogo B. de Souza^a

^aUrogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; ^bDepartment of Morphology, Fluminense Federal University, Niterói, Brazil

© S. Karger AG, Basel
PROOF Copy
for personal
use only
ANY DISTRIBUTION OF THIS
ARTICLE WITHOUT WRITTEN
CONSENT FROM S. KARGER
AG, BASEL IS A VIOLATION
OF THE COPYRIGHT.

Queries to the author 1. Please confirm that authors' names and initials have been identified correctly.
2. Please check the portion highlighted in green. Unclear precedence. Please check the author name: "Diogo B. de Souza" or "Diogo B. De Souza"

Keywords

Ureteral obstruction · Hydronephrosis · Kidney · Animal models

Abstract

Objective: To investigate, in a rodent model, the influence of an obstructed kidney/ureter on the contralateral organ morphology. **Methods:** Thirty-six rats were randomly assigned into the following groups: untreated ureteral obstruction group (UO-U, $n = 10$), submitted to a ligation of the ureter at day 0; UO group (at day 0) followed by nephrectomy after 24 h (UO-N, $n = 8$); nephrectomy group (N, $n = 9$), submitted to nephrectomy at day 0; and sham group (S, $n = 9$), submitted to simulated surgery at day 0. All these procedures were performed on the left kidney/ureter. All animals were euthanized 30 days after surgery, and the right kidneys were collected for stereological analysis. Data were compared using a one-way analysis of variance with Bonferroni's post test, considering $p < 0.05$ as significant. **Results:** The kidney volume, weight, and cortical volume were augmented in groups

UO-N and N, compared to group S. Kidneys from the UO-U group showed only a moderate augmentation in kidney weight, with a reduction in the cortical-medullary ratio, compared to the kidneys in group S. No differences in the glomerular volumetric density, volume-weighted glomerular volume, and number of glomeruli were observed among the right kidneys of the studied groups. **Conclusion:** An obstructed kidney/ureter is more prejudicial to the contralateral kidney morphology than an absent kidney.

© 2018 S. Karger AG, Basel

Introduction

Ureteral obstruction (UO) is a common condition seen in clinical practice, with a lifelong incidence of approximately 1 in 1,000 [1]. UO may lead to renal impairment due to the physical blockade of urine flow causing hydronephrosis [2]. Obstructive uropathy is the cause of renal failure in 2.6% of patients [3]. The ureter may become obstructed by various conditions, either benign or

KARGER.

© 2018 S. Karger AG, Basel

E-Mail: karger@karger.com
www.karger.com/doi

Diogo B. de Souza
Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro
Av. 28 de Setembro, 87
Rio de Janeiro, RJ 20551-030 (Brazil)
E-Mail: diogobenchimol@gmail.com

ANEXO – Certificado de aceite da comissão de ética para o cuidado e uso de animais experimentais



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)

ibrag Instituto
de Biologia
Roberto
Alcantara
Gomes

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada " **Estudo estereológico do rim de ratos Wistar submetido à hidronefrose por obstrução ureteral unilateral**", registrada com o nº 042/2017, sob a responsabilidade de **Diogo Benchimol de Souza** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes da UERJ, em reunião de 25/09/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	25/09/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar
Nº de animais	40
Peso/Idade	350 g / 3 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 26 de Setembro de 2017.

Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ