VANESSA MORAIS LIMA

**Efeitos da penicilina G na pelve renal de ratos Wistar
(*Rattus norvegicus albinus*) normais e diabéticos**

SÃO PAULO

2012

VANESSA MORAIS LIMA

Efeitos da penicilina G na pelve renal de ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) normais e diabéticos

SÃO PAULO

2012

VANESSA MORAIS LIMA

Efeitos da penicilina G na pelve renal de ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) normais e diabéticos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento: Cirurgia

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador: Prof. Dr. Renato Paulo Chopard

SÃO PAULO

2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2569
FMVZ

Lima, Vanessa Moraes
Efeitos da penicilina G na pelve renal de ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) normais e diabéticos / Vanessa Moraes Lima. -- 2012.
79 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Renato Paulo Chopard.

1. Penicilina G. 2. Pelve renal. 3. Fibras elásticas. 4. Fibras colágenas.
5. Fibras musculares lisas. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos da Penicilina G na pelve renal de ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*)", protocolado sob o nº 2165/2011, utilizando 60 (sessenta) ratos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Renato Paulo Chopard, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/6/2011.

We certify that the Research "Effects of penicillin G in the renal pelvis of Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*)", protocol number 2165/2011, utilizing 60 (sixty) rats, under the responsibility Prof. Dr. Renato Paulo Chopard, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 06/22/2011.

São Paulo, 5 de julho de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Efeitos da penicilina G na pelve renal de ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) normais e diabéticos

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LIMA, Vanessa Moraes

Título: Efeitos da penicilina G na pelve renal de ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) normais e diabéticos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais, minha base, meus amores!
Vocês são a razão dos meus sonhos tornarem-se realidade.
Amo vocês!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus, pela presença constante em minha vida, pela saúde perfeita e pela oportunidade de evoluir.

Aos meus pais, Reginaldo e Neusa, pelo imensurável amor e carinho que sempre me concederam. Pelo incentivo e apoio em todas as minhas decisões, e pela força que mesmo com essa distância vocês sempre me dão. Obrigada por compreenderem minha ausência e por acreditarem em minha capacidade de vencer desafios. É graças a vocês que cheguei até aqui!

Agradeço ao meu irmão, Lázaro Vinícius, por todos os nossos momentos, entre brigas e carinhos. Pelo amor inigualável! Você faz muita falta, com essa distância de cidades.

À toda minha família, tanto materna, quanto paterna, que sempre me incentivaram e me deram apoio. Em especial, à minha avó, Lolita, pelo amor e carinho a mim dedicados, e que mesmo me pedindo (sempre) para voltar pra casa, esteve orando e desejando que tudo desse certo para mim em São Paulo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Renato Paulo Chopard, agradeço imensamente pela oportunidade concedida e confiança em mim depositada. Muito obrigada pelos ensinamentos, conselhos e paciência. Com imenso respeito e admiração que tenho pelo senhor, sou eternamente grata por ter contribuído para o meu amadurecimento científico, humano e profissional.

Ao Prof. Dr. Kleber Fernando Pereira, por me apresentar a Anatomia desde quando aluna de graduação, até enquanto aluna da pós-graduação. Obrigada pela amizade, oportunidade e pelo aprendizado.

Aos meus colegas e amigos do LBCAF e demais por estarem presentes no dia-a-dia de trabalho: Ana Cláudia Barbosa, Ana Paula Takano, Caroline Lino, Caroline Emy, Cleyton Sobrinho, Cristina Basso, Diego Muniz, Felix Tavares, Glauco Constantino, Ivson Silva, Lázaro Wender, Marcelo Cavalli, Maria Brito, Marília Bianca Teixeira, Marina Fevereiro, Mary Oliveira, Miguel Lima, Milena Freitas, Priscilla Monteiro, Thiago Gouvea e Tiemy Moura. Obrigada pelo companheirismo, apoio na realização dos experimentos e amizade cativada durante esse período. Com os seus jeitos único e especial, vocês contribuíram muito para o meu crescimento. Pois a

colaboração de cada um de vocês foi fundamental para que essa dissertação pudesse ser concluída com êxito.

À Marta Maria da Silva Righetti, à Sônia Regina Yokomizo e ao Sebastião Aparecido Boleta, profissionais do Laboratório de Histologia do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela amizade, disponibilidade e competência demonstradas durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Rosana Duarte Prisco assistente administrativa do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, que me auxiliou na parte estatística dessa dissertação, muito obrigada pela ajuda, disponibilidade, competência e atenção a mim dedicadas.

À Rose Eli Grassi Rici do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Cirurgia, Setor de Anatomia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, pela ajuda desprendida.

Ao curso de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestre, em nome de sua coordenadora Prof. Dr^a Maria Angélica Miglino e a cada um dos professores.

Aos secretários da pós-graduação, Maicon e Jaqueline, pela atenção e disponibilidade em todos os momentos.

Aos funcionários do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas III da USP, pela ajuda e atenção de sempre. E aos animais de experimentação, disponibilizados pelo biotério central do ICBIII/USP, que permitiram a concretização deste estudo, dando sua vida em favor do saber científico.

Aos demais pós-graduandos, funcionários e professores do Departamento de Anatomia do ICBIII e do Setor de Anatomia da FMVZ, pelo convívio e momentos compartilhados, que contribuíram de alguma forma para a realização desta pesquisa. Em especial ao chefe do departamento, Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti, pelos ensinamentos em técnicas anatômicas e pela força demonstrada.

A todos os que me auxiliaram neste trabalho cujos nomes, por ventura, foram omitidos, os meus sinceros agradecimentos.

Às instituições de fomento, CAPES e especialmente à FAPESP, por terem nos concedido auxílio financeiro, o qual permitiu o desenvolvimento deste estudo e diversos projetos do nosso laboratório.

“Penso no que faço, com Fé.
Faço o que devo fazer com Amor.
Eu me esforço para ser cada dia melhor, pois bondade também se aprende.
Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou
ficar, desistir ou lutar; porque descobri no caminho incerto da vida que o mais
importante é o Decidir.”

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

[Cora Coralina]

RESUMO

LIMA, V. M. **Efeitos da penicilina G na pelve renal de ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) normais e diabéticos.** [Effects of penicillin G in the renal pelvis of normal and diabetes Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*)]. 2012. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A penicilina G é um dos antibióticos mais importantes. Além de possuir um baixo preço e comprovada eficácia de tratamento, mostra inúmeras possibilidades para a redução da morbidade e mortalidade por doenças infecciosas em todo o mundo. Como eventualmente este medicamento causa sequelas no parênquima renal e estruturas associadas, e sendo que a secreção da rede tubular renal contribui para a excreção da penicilina G, onde cerca de 60% do antibiótico é eliminado pela urina, nos propomos a fazer um estudo das principais alterações que possam ocorrer na pelve renal de ratos normais e ratos induzidos à diabetes. Este projeto tem o propósito de descrever e analisar as fibras colágenas, musculares lisas e elásticas da pelve renal de ratos wistar observando alterações estruturais e ultraestruturais dos grupos experimentais quando comparados ao grupo controle com relação ao uso da penicilina G. Os ratos foram divididos em 4 grupos, ratos Wistar normais (N); ratos Wistar tratados com penicilina G (NP); ratos Wistar induzidos à diabetes (D); ratos Wistar diabéticos com penicilina G (DP). Os ratos dos grupos D e DP foram induzidos ao diabetes por aloxano. A região da pelve renal com representação das fibras foi coletada e reduzida em pequenos fragmentos. Os cortes obtidos foram utilizados para Microscopia Eletrônica de Transmissão e corados pelos seguintes métodos para Microscopia Óptica: Hematoxilina Férrica para evidenciação de fibras elásticas; Resorcina fucsina para evidenciação de fibras elásticas e elaunínicas; Resorcina fucsina após oxidação com solução aquosa a 1% de oxona para evidenciação de fibras elásticas, elaunínicas e oxitalânicas; Azan para evidenciação do componente colágeno e muscular lisa; Picrosírius para observação do componente colágeno (especificamente tipo I e III); e Hematoxilina e Eosina, para evidenciação do componente celular. A análise microscópica e a histomorfometria mostraram que a Penicilina G altera os componentes fibrosos da pelve renal, fazendo com que as áreas de fibras musculares lisas e de colágeno tipo III fossem aumentadas e as fibras elásticas maduras diminuídas (neste caso, apenas entre N e

NP). O *Diabetes mellitus* mostrou-se como uma doença metabólica também capaz de alterar a morfologia da pelve, fazendo com que a área de fibras musculares lisas aumentasse, a área de colágeno tipo I e a quantidade de fibras elásticas maduras e elaunínicas diminuísse e as oxitalânicas aumentassem, além de um notável aumento na quantidade de mitocôndrias. Podemos inferir que a antibioticoterapia feita pela penicilina G e o diabetes, provocam diferenças estruturais e ultraestruturais na pelve renal dos ratos Wistar, principalmente na organização dos componentes fibrosos elástico, muscular e colágeno.

Palavras-chave: Penicilina G. Pelve renal. Fibras elásticas. Fibras colágenas. Fibras musculares lisas.

ABSTRACT

LIMA, V. M. **Effects of penicillin G in the renal pelvis of normal and diabetes Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*)**. [Efeitos da penicilina G na pelve renal de ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) normais e diabéticos]. 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Penicillin G is the most important antibiotics. Besides having a low cost and proven effectiveness of treatment, it shows great possibilities for reducing morbidity and mortality from infectious diseases worldwide. As this medicine may cause sequelae in the renal parenchyma and associated structures, and since the net renal tubular secretion contributes to the excretion of penicillin G, where about 60% of the antibiotic is eliminated in urine, this study aims to investigate the main structural and ultrastructural changes occurring in the kidney of normal and diabetes rats. Thus, this project aims to describe and analyze the collagen fibers, smooth muscle and elastic fibers of the renal pelvis of Wistar rats, comparing control and penicillin G-treated animals. The animals were divided into 4 groups, normal rats (N), Wistar rats treated with penicillin G (NP); rats induced diabetes (D), diabetic Wistar rats with penicillin G (DP). The diabetes was induced in groups D and DP by alloxan. The fibrotic region of the renal pelvis was collected and reduced into small fragments. The sections were used for the transmission electron microscopy and stained by the following methods for optic microscopic: Iron Hematoxylin for disclosure of elastic fibers; Resorcin fuchsin for disclosure of elastic and elauninic fibers; Resorcin fuchsin after oxidation with 1% aqueous solution of oxone for disclosure of elastic, elauninic and oxytalan fibers; Azan evidencing the collagen and smooth muscle components; Picrosirius for observation of the collagen component (specifically type I and III); and Hematoxylin and Eosin, to show the cellular component. Microscopic and histomorphometry analysis showed that penicillin G alters the fibrous components of the renal pelvis, increasing areas of smooth muscle fibers and collagen type III deposition and decreasing mature elastic fibers (in this case, only between N and NP). Diabetes mellitus proved to be a metabolic disease also able to alter the morphology of the pelvis, leading to the augmentation of smooth muscle fiber area. Moreover, the area of type I collagen and the amount of mature elastic and elauninic fibers were diminished, while oxytalan fibers increased, together with a remarkable increase in

the number of mitochondria. We can infer that the antibiotic therapy made by penicillin G and the diabetes, cause structural and ultrastructural differences in the renal pelvis of rats, mainly in the organization of elastic fiber, muscular and collagen components.

Keywords: Penicillin G. Renal pelvis. Elastic fibers. Collagen fibers. Smooth muscle fibers.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Sistema-teste (gratículo) de 117 pontos, com 11 retas paralelas na vertical, 9 na horizontal e área total (At) de $117000 \mu\text{m}^2$. A distância (L) entre os pontos é de $10 \mu\text{m}$ 38
- Figura 2 - Corte histológico longitudinal de $5\mu\text{m}$ da pelve renal. Hematoxilina e Eosina, 400x. Evidenciando o epitélio de transição (E) com seus núcleos, tecido conjuntivo (C) com fibroblastos (seta) e a camada muscular (M) com fibras musculares 44
- Figura 3 - Corte histológico longitudinal de $5\mu\text{m}$ da pelve renal. Azan, 400x. Evidenciando as duas camadas de fibras colágenas (azul) e entre elas, as fibras musculares (rosa) 45
- Figura 4 - Corte histológico longitudinal de $5\mu\text{m}$ da pelve renal. Picrosírius, 400x. Evidenciando as fibras colágenas do tipo I (vermelho) e tipo III (verde) sob luz polarizada 46
- Figura 5 - Corte histológico longitudinal de $5\mu\text{m}$ da pelve renal. Verhoeff, 1000x, em imersão. Evidenciando as fibras elásticas (setas) maduras 47
- Figura 6 - Corte histológico longitudinal de $5\mu\text{m}$ da pelve renal. Weigert, 1000x, em imersão. Evidenciando as fibras elásticas (setas) maduras e elaunínicas..... 48
- Figura 7 - Corte histológico longitudinal de $5\mu\text{m}$ da pelve renal. Weigert-Oxona, 1000x, em imersão. Evidenciando as fibras elásticas (setas) maduras, elaunínicas e oxitalânicas 49
- Figura 8 - Micrografia eletrônica de transmissão da pelve renal do grupo N de ratos normais. (A) Notamos o epitélio de transição (E) com a camada subepitelial de tecido conjuntivo (C) e a camada muscular (M). (B)

Observamos ainda a camada muscular (M) e a camada adventícia externa (AE) 50

Figura 9 - Micrografia eletrônica de transmissão da pelve renal do grupo NP de ratos normais com penicilina G. (A) Observamos o epitélio de transição (E) com núcleos em evidência (N) e membrana luminal recortada (seta). (B) Notamos as células musculares lisas com seus núcleos (N) na camada muscular (M) da pelve 51

Figura 10 - Micrografia eletrônica de transmissão da pelve renal do grupo D de ratos diabéticos. (A) Observamos o epitélio de transição (E) com núcleos em evidência (N) e membrana luminal recortada. (B) Notamos as células musculares lisas na camada muscular (M) da pelve. (C) Evidenciamos a grande presença organelas como mitocôndrias (Mt) e aparelho de Golgi (g) e microvilosidades na membrana luminal (seta) 52

Figura 11 - Micrografia eletrônica de transmissão da pelve renal do grupo DP de ratos diabéticos com penicilina G. (A) Observamos o epitélio de transição (E) com núcleos em evidência (N). (B) Notamos as células musculares lisas com seus núcleos (N) na camada muscular (M) da pelve renal 53

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Gráfico da média e desvio padrão da área total dada em μm^2 . Não foi observado efeito de interação Grupo e Tratamento ($p=0.543$). Existe diferença significativa entre Diabético e Controle, $p<0.001$ (*). Não foi detectada diferença significativa entre com e sem Penicilina G, $p=0.603$ 54
- Gráfico 2 - Gráfico da média e desvio padrão da área das fibras musculares dada em μm^2 . Não foi observado efeito de interação Grupo e Tratamento ($p=0.281$). Existe diferença significativa entre Diabético e Controle, $p=0.006$ (*) e também entre com e sem Penicilina G, $p=0.011$ (#) 55
- Gráfico 3 - Gráfico da média e desvio padrão da área da porcentagem de área fibras musculares (A_m) pela área total (A_t). Não foi detectado efeito de interação Grupo e Tratamento ($p=0.379$). Não existe diferença significativa entre Diabético e Controle, ($p=0.546$) e existe diferença significativa entre com e sem Penicilina G, $p=0.002$ (*) 56
- Gráfico 4 - Gráfico da média e desvio padrão da área de colágeno tipo I dada em μm^2 . Não foi observado efeito de interação Grupo e Tratamento ($p=0.429$). Existe diferença significativa entre Diabético e Controle, $p=0.010$ (*). Não foi detectada diferença significativa entre com e sem Penicilina G, $p=0.215$ 57
- Gráfico 5 - Gráfico da média e desvio padrão da área de colágeno tipo III dada em μm^2 . Não foi observado efeito de interação Grupo e Tratamento ($p=0.136$). Não existe diferença significativa entre Diabético e Controle, $p=0.070$. Foi detectada diferença significativa entre com e sem Penicilina G, $p=0.036$ (*) 58
- Gráfico 6 - Gráfico da média e desvio padrão da densidade linear (L_d) de fibras elásticas na coloração de Verhoeff. Onde foi observado efeito de

interação Grupo e Tratamento ($p=0.007$). Existe diferença significativa entre Diabético e Controle sem penicilina, $p<0.05$ (*). Foi detectada diferença significativa entre com e sem Penicilina G no grupo controle, $p<0.05$ (#) 60

Gráfico 7 - Gráfico da média e desvio padrão da densidade linear (Ld) de fibras elásticas na coloração de Weigert. Onde foi observado efeito de interação Grupo e Tratamento ($p=0.009$). Existe diferença significativa entre Diabético e Controle sem penicilina, $p<0.05$ (*). Não foi detectada diferença significativa entre com e sem Penicilina G, $p=0.8581$ 61

Gráfico 8 - Gráfico da média e desvio padrão da densidade linear (Ld) de fibras elásticas na coloração de Weigert-Oxona. Não foi detectado efeito de interação Grupo e Tratamento ($p=0.661$). Existe diferença significativa entre Diabético e Controle, $p<0.001$ (*). Não foi detectada diferença significativa entre com e sem Penicilina G, $p=0.455$ 62

Gráfico 9 - Gráfico da média e desvio padrão das fibras elásticas, elaunínicas e oxitalânicas da pelve renal de ratos normais (N), normais com penicilina G (NP), diabéticos (D) e diabéticos com penicilina G (DP). A maior densidade linear de fibras elásticas foi observada na coloração Weigert Oxona 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados estatísticos da área total das Fibras Musculares	54
Tabela 2 - Dados estatísticos da área de Fibras Musculares	55
Tabela 3 - Dados estatísticos da porcentagem de área de Fibras Musculares sobre área total	56
Tabela 4 - Dados estatísticos da área de Fibras Colágenas Tipo I	58
Tabela 5 - Dados estatísticos da área de Fibras Colágenas Tipo III	59
Tabela 6 - Dados estatísticos da densidade linear das Fibras Elásticas com coloração de Verhoeff	60
Tabela 7 - Dados estatísticos da densidade linear das Fibras Elásticas com coloração de Weigert	61
Tabela 8 - Dados estatísticos da densidade linear das Fibras Elásticas com coloração de Weigert-Oxona	62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 PENICILINA G	24
2.2 PELVE RENAL	25
2.3 FIBRAS ELÁSTICAS, MUSCULARES E COLÁGENAS	26
2.4 DIABETES MELLITUS	29
3 PROPOSIÇÃO	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 MATERIAIS	34
4.2 MÉTODOS	34
4.2.1 Indução ao diabetes	34
4.2.2 Tratamento com Penicilina G	35
4.2.3 Microscopia de luz	35
4.2.3.1 Histologia	35
4.2.3.2 Morfometria	37
4.2.4 Microscopia eletrônica de transmissão	39
4.2.5 Estatística	41
5 RESULTADOS	43
5.1 ANÁLISE QUALITATIVA	43
5.2 ANÁLISE QUANTITATIVA	53
5.2.1 Fibras Musculares	53
5.2.2 Fibras Colágenas	57
5.2.3 Fibras Elásticas	59
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

Fármacos como a Penicilina G têm sido usados com parcimônia em tratamento e na prevenção de determinadas infecções e suas complicações, sendo uma opção terapêutica útil. Além de possuir um baixo preço e comprovada eficácia de tratamento, já assinalou inúmeras possibilidades para a redução da morbidade e mortalidade por doenças infecciosas em todo o mundo, em meio ao paradigma da epidemiologia (SUSSER; SUSSER, 1998). Na realidade, trata-se do grupo de antimicrobianos com a maior experiência de uso, tanto em gestantes e crianças, quanto na população em geral (CETINKAYA; CAG, 2004; THETHI; DELLEN, 2004).

Como eventualmente este medicamento causa sequelas no parênquima renal e estruturas associadas (TOMA et al., 2009), e sendo que a secreção da rede tubular renal contribui para a excreção da penicilina G, onde cerca de 60% do antibiótico é eliminado pela urina (BERGERON, 1975), nos propomos a fazer um estudo das principais alterações que possam ocorrer na pelve renal de ratos normais e ratos induzidos à diabetes, com relação ao uso da Penicilina G.

A pelve renal faz parte de um sistema de tubos condutores de urina, o qual é chamado de vias urinárias, que são compostas por: pelve renal, ureteres, bexiga urinária e uretra. A urina produzida pelos rins é o veículo no qual este aparelho controla a eliminação de água, sais minerais, íons, resíduos metabólicos, enfim, substâncias que em excesso causam um desequilíbrio fisiológico em nosso organismo. (GARDNER; GRAY; O'RAHILLY, 1988; DI DIO, 1999; DÂNGELO; FATTINI, 2002; MOORE; DALLEY, 2007). Inclusive, segundo Eagle et al. (1947) o fator que mais limita a eficácia terapêutica da penicilina é a sua rápida excreção urinária.

O sistema renal também é alvo em doenças como a diabetes. Diabetes é uma condição que ocorre quando o corpo não fabrica insulina suficiente ou quando não consegue utilizar quantidades normais de insulina de forma adequada. Sendo esse hormônio responsável pela regulação de açúcar no sangue. Um alto nível de açúcar no sangue pode causar problemas em muitas partes do corpo. Hiperglicêmicos apresentam-se com grande volume urinário (poliúria) e hiperglicosúria. Esta situação aumenta muito o trabalho do rim e acarreta, como consequência, um aumento do tamanho renal (BELL; HYE, 1983).

Na literatura encontra-se a cada ano uma gama de novas pesquisas, entretanto, muitos aspectos desta patologia ainda permanecem obscuros. Por esse motivo, verifica-se que além dos estudos realizados em humanos, muitas são as pesquisas experimentais em animais. O rato é um dos animais mais utilizados em experimentação científica por apresentar muitas características do diabetes melito humano.

O objetivo é contribuir para o estudo das consequências do uso do fármaco em questão. Tendo como propósito, descrever e analisar qualitativa e quantitativamente as fibras colágenas, musculares lisas e elásticas da pelve renal de ratos wistar analisando alterações estruturais dos grupos experimentais quando comparados ao grupo controle. As análises dos dados permitiram, com base na literatura corrente, interpretar os resultados possibilitando obter conclusões a respeito da penicilina G e seus efeitos na pelve renal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PENICILINA G

A penicilina é um dos antibióticos mais importantes. Embora descoberta por puro acaso. Em 1928 Fleming desenvolvia pesquisas sobre estafilococos, quando descobriu a penicilina. A descoberta da penicilina deu-se em condições peculiares, graças a uma sequência de acontecimentos imprevistos e surpreendentes. Fleming observou que uma placa de cultura, na qual estavam sendo cultivados estafilococos, fora contaminada com um fungo do gênero *Penicillium*, e que ocorreu inibição do crescimento bacteriano na vizinhança do fungo, causando a lise das bactérias ao seu redor (GOODMAN et al., 1973; REZENDE, 2000; SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2006; RANG et al., 2007).

Ele isolou o fungo e demonstrou que ele produzia uma substância antibacteriana, que chamou de penicilina. Mais tarde pesquisadores liderados por Florey aperfeiçoaram a penicilina como agente terapêutico. Segundo Spinosa; Górnik e Bernardi (2006) as modificações na molécula do ácido 6-amino-penicilânico e o espectro de ação das penicilinas permitem classificá-las em vários grupos. Um dos grupos são as penicilinas naturais que são obtidas a partir de variedade do fungo *Penicillium*, sendo denominadas com letras maiúsculas do alfabeto, como, penicilina K, F, G e X; dentre estas, a mais potente é a penicilina G, única usada como agente terapêutico.

As penicilinas são antibióticos bactericidas que atuam impedindo a síntese da parede celular bacteriana ao atuarem na transpeptidação e exerce sua ação bactericida durante o estágio de multiplicação ativa dos microrganismos sensíveis. Atuam por inibição da biossíntese do mucopeptídeo da parede celular. Distribuem-se amplamente pelos vários tecidos do organismo. Os níveis mais elevados são encontrados nos rins, e em menores concentrações no fígado, pele e intestinos. São inativadas pelo pH ácido do estômago, razão pela qual são usadas por via parenteral (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2006; RANG et al., 2007), apenas a penicilina G cristalina pode ser aplicada por via intravenosa (IV). Como todos os

outros agentes antimicrobianos, possuem a capacidade de provocar diversos efeitos indesejáveis. A cistite hemorrágica é uma complicação rara da penicilina G, mas ocasionalmente provoca lesão renal (TOMA et al., 2009).

O conhecimento das penicilinas em relação ao sistema urinário é grandemente baseado em estudos das taxas de depuração da droga pelo rim. As penicilinas se distribuem por vários tecidos, tendo dificuldade de atravessar a barreira hemato-encefálica, não são biotransformadas no organismo, sendo eliminadas pelos rins, 90% por secreção tubular e 10% por filtração glomerular (GOODMAN et al., 1973; BERGERON, 1975; SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2006; RANG et al., 2007).

2.2 *PELVE RENAL*

O sistema urinário, encarregado da produção, coleta e eliminação da urina está localizado no espaço retroperitônio, de cada lado da coluna vertebral dorsolumbar. É constituído pelos rins direito e esquerdo, e o sistema pielo-calicial, que recebe os coletores de urina do parênquima renal, os ureteres, a bexiga e a uretra (SOUZA; ELIAS, 2006). O túbulo coletor acumula a urina proveniente de vários néfrons e se lança na pelve renal.

A pelve renal é o espaço coletor de urina formado pela união de 8-10 cálices renais, a sua forma é individualmente diferenciada, em funil, que se afila à medida que passa ínfimo-medialmente, atravessando o hilo renal para se tornar contínua com o ureter (WILLIAMS et al., 1995; MOORE; DALLEY, 2007; FRITSCH et al., 2008). Sheehan e Davis (1959) definem a pelve como sendo formada pela extremidade expandida superior do ureter. A maior parte da pelve renal está oculta no seio renal.

Segundo Junqueira e Carneiro (1999) e Standring (2010), em sua microestrutura da parede, a pelve renal é composta de três camadas, uma adventícia externa de tecido conjuntivo, uma camada intermediária de músculo liso e uma mucosa interna formada por um epitélio de transição e por uma lâmina própria de tecido conjuntivo.

O septo que cobre a parte externa da pelve é formado quase inteiramente por tecido gorduroso contendo vasos, nervos e linfáticos. Os vasos da pelve renal se originam dos vasos renais, e a drenagem linfática é correspondente. A pelve renal é innervada sensitivamente, isto é, sua distensão é dolorosa.

De acordo com Schmidt-Nielsen (1987) a pelve dos mamíferos possibilita o contato da urina com o tecido epitelial da medula renal e as contrações peristálticas da parede da pelve renal exercem um bombeamento rítmico na papila renal. O significado funcional desses dois aspectos da pelve renal tornou-se o foco da atenção de alguns fisiologistas renais. Embora pareça claro que o papel da pelve renal esteja associado ao mecanismo de concentração urinária, os dados disponíveis não são suficientes para a formação de uma hipótese que proporcione o significado funcional desta estrutura.

É preciso conhecer a maneira como se processa o desenvolvimento de unidades renais normais, sem o que seria impossível caracterizar e comparar situações anômalas, como por exemplo, na utilização de fármacos como a Penicilina G ou mesmo as alterações causadas pelo Diabetes.

2.3 FIBRAS ELÁSTICAS, MUSCULARES E COLÁGENAS

O sistema de fibras elásticas do tecido conjuntivo é o principal responsável pela elasticidade existente em diferentes órgãos. Sua especial concentração, como componente estrutural da parede dos grandes vasos, especialmente artérias, da derme, do parênquima pulmonar, da cartilagem elástica, das fáscias musculares e das cápsulas de vários órgãos, entre outros, testemunham sua atuação no desempenho deste papel (ROSS, 1973). Os sistemas elásticos têm sido estudados em seus diversos aspectos quer em membranas fibro-elásticas ou em estruturas tubulares, como estudados por autores como Rodrigues Jr. (1988); Weibel (1963); Niewoehner e Kleinerman (1977); Chopard et al. (1998); Chopard e Gerhard (2000) e Rodrigues Jr. et al. (2002).

A partir da década de 50, iniciou-se uma preocupação com o estudo do sistema fibroso elástico quanto a sua estrutura e propriedades morfoquímicas.

Assim, os achados bioquímicos com a purificação das ligações cruzadas específicas de elastina (PARTRIDGE; DAVIS; ADAIR, 1955) bem como o isolamento e descrição do seu componente glicoprotéico (ROSS; BORNSTEIN, 1969) foram de grande importância para o conhecimento do sistema fibro-elástico.

Estruturalmente, as fibras elásticas estão constituídas por dois componentes distintos, a elastina e as microfibrilas (SMITH, 1976). Uma síntese controlada e uma interação balanceada destes componentes são essenciais para uma fibrilogênese normal. As microfibrilas são lançadas ao meio extracelular por fibroblastos e células mesenquimais. Com a sua agregação subsequente, formam uma estrutura de sustentação de fibra elástica, onde a elastina é depositada. Esta estrutura básica é que indica a forma e a direção da futura fibra elástica (ROSS; BORNSTEIN, 1969; ROSS, 1973; ROSS; FIALKOW; ALTMAN, 1977). A proporção relativa destes componentes é variável e, desta forma, pode-se identificar três tipos de fibras elásticas, cada uma com características morfológicas e funcionais específicas. As fibras oxitalânicas consistem de um único componente, as microfibrilas, comumente arranjadas em feixes paralelos. As fibras elaunínicas são constituídas por componente microfibrilar e pequenos grumos de substância amorfa, a elastina. A fibra elástica “madura” é formada pelo aumento progressivo da elastina sobre a fibra pré-madura até atingir um conteúdo de aproximadamente 90% da fibra (PANIAGUA et al., 1983).

De acordo com Silva e Velasco (2007) a elastina é responsável pela propriedade elástica e as microfibrilas são inextensíveis, sendo assim, as fibras do sistema elástico possuem propriedades mecânicas distintas, onde as fibras elásticas, por possuírem maior quantidade de elastina, são capazes de se distenderem, as fibras elaunínicas possuem um grau intermediário de elasticidade e as oxitalânicas são praticamente inextensíveis.

Ao microscópio de luz, as fibras elásticas são fibras espessas reconhecidas seletivamente pelo método de hematoxilina férrica (VERHOEFF, 1908). As fibras elaunínicas, menos espessas do que as primeiras, são reconhecidas pelas colorações de aldeído-fucsina, resorcina-fucsina (WEIGERT, 1898) ou orceína (Unna-Tanzer). Com a oxidação pela oxona, antes da aplicação dos três últimos corantes, puderam ser detectadas fibras mais finas do que as elaunínicas, as fibras oxitalânicas (FULLMER, 1957; GAWLIK, 1965; BRISSIE; SPICER; THOMPSON,

1974; COTTA-PEREIRA; GUERRA-RODRIGO; DAVID-FERREIRA; 1976; COTTA-PEREIRA; GUERRA-RODRIGO; BITTENCOURT-SAMPAIO, 1976).

As fibras musculares lisas têm importante papel na condução da urina através do sistema pielo-calicial e ureter. Seu processo de contração quando comparado às fibras musculares estriadas esqueléticas é lento, mas no caso específico é contínuo, pois é regulado pelo denominado marca-passo renal, que independente da inervação visceral mantém constante o chamado peristaltismo ureteral com início indutor na pelve renal (SCHMIDT-NIELSEN, 1987).

As fibras musculares lisas observadas na microscopia eletrônica de transmissão apresentam diâmetros variáveis conforme sua secção e vesículas de pinocitose (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Segundo Junqueira e Carneiro (1999), a célula muscular lisa além de sua propriedade inerente pode participar da sintetização de colágeno tipo III, fibras elásticas e proteoglicanas.

Outro componente fundamental da matriz extracelular é o colágeno, sendo a proteína mais prevalente nos vertebrados, constitui aproximadamente um quarto do total destas no corpo dos organismos adultos e corresponde a um grupo de proteínas com repetidas sequências de GLy-X-Y, onde GLy é o aminoácido glicina, e X e Y correspondem a outros aminoácidos, frequentemente prolinas e hidroxiprolinas (JENSEN; HOST, 1997). Essas formam um agregado de suporte para macromoléculas.

O colágeno atua como um arcabouço estrutural e possui um papel importante na resistência a distensões excessivas dos vasos, conferindo rigidez aos vasos e também limitando a extensibilidade (CATTELL; ANDERSON; HASLETON, 1996). Existem ao menos 28 tipos de colágenos, porém predominam os tipos I e III. O colágeno tipo I está presente em muitos tecidos, sendo a mais abundante proteína do corpo humano, forma fibras grossas e está presente no tecido conjuntivo propriamente dito. O tipo III é o segundo mais abundante e encontrado em associação com o tipo I, é denominado também de fibra reticular mais delgada. O colágeno tipo III está associado em particular com a extensibilidade da parede do vaso enquanto o tipo I confere a rigidez. Além disso, o colágeno também fornece uma ancoragem para as células e exerce uma importante influência na função celular através de seu contato com receptores (BARNES; FARNDAL, 1999).

2.4 DIABETES MELLITUS

Cahill (1985), numa revisão histórica, refere que no antigo "Papiro de Ebers" (1500 AC) há a descrição de uma doença associada à perda de grande quantidade de urina, à qual Aretaeus (250 AC), renomado médico grego, deu o nome de "diabetes", referindo-se a ela como "uma desagregação da carne e membros através da urina". Ainda segundo Cahill (1985), foi Susruta (5 DC) quem descreveu a "urina de mel", de onde, séculos depois, surgiu o nome "mellitus".

O *Diabetes mellitus* é uma doença metabólica caracterizada por um aumento anormal de glicose no sangue, pois o organismo não libera ou não utiliza a insulina de modo adequado, sendo considerado um dos principais problemas de ordem mundial. Segundo Vieira (2007) o método de diagnóstico recomendado em humanos é a dosagem da glicemia em jejum, e o teste oral de tolerância à glicose em algumas circunstâncias, sendo o limite máximo da normalidade da glicemia de jejum 99 mg/dL, sendo que a glicemia de jejum inapropriada, ou seja, o pré-diabetes, está definida entre 100 e 125 mg/dL. Onde, nestes casos, é indicada a realização do teste oral de tolerância à glicose. Uma glicemia de jejum de 126 mg/dL ou mais confirma o diagnóstico de diabetes mellitus.

A insulina, hormônio produzido e liberado pelo pâncreas, é a principal substância responsável pela manutenção da concentração sérica de glicose, permitindo que a mesma seja transportada para o interior das células, para produzir energia ou ser armazenada até sua utilização.

Dois tipos de diabetes assumem maior importância clínica: o Diabetes tipo 1 que é uma doença auto-imune específica e resulta da falha do pâncreas em produzir insulina, por causa da destruição das células beta-pancreáticas, produtoras deste hormônio, nas ilhotas de Langerhans; e o Diabetes tipo 2 também conhecida como doença da maturidade, pois a prevalência aumenta com o passar dos anos e caracteriza-se pela diminuição da secreção de insulina e da sensibilidade tecidual a esse hormônio (EXPERT COMMITTEE, 2002), as causas mais prováveis para este tipo são obesidade, alta concentração de corticosteroides, medicamentos e venenos que interferem nos efeitos da insulina. Os dois tipos levam ao aumento da concentração sérica de glicose.

Embora os dois tipos de diabetes tenham etiologias diferentes, compartilham de sintomas comuns e complicações similares, decorrentes da hiperglicemia. As complicações específicas para diabetes foram definidas como retinopatia, nefropatia e neuropatia.

Segundo Rodriguez-de-Velasquez et al. (1995) é uma doença multissistêmica muito comum e que possui sérios efeitos no sistema geniturinário. A disfunção renal relacionada ao diabetes resulta da interação de diversos fatores, tais como, genéticos, ambientais, metabólicos e hemodinâmicos, que, atuando em conjunto, promovem o enfraquecimento da membrana basal glomerular, expansão da matriz mesangial, diminuição do número de podócitos, glomeruloesclerose, fibrose tubulointersticial, entre outros.

O quadro diabético no animal inclui redução no peso, polifagia, polidipsia e alterações no sistema imunológico. Os modelos de diabetes experimental em animais de laboratório têm sido amplamente utilizados para simular o *Diabetes mellitus* da população. Podendo ser induzido por hormônios ou substâncias químicas como o aloxano ou estreptozotocina, que provocam lesões irreversíveis nas células betas pancreáticas, as quais deixam de produzir a insulina, tornando o organismo diabético (BELL; HYE, 1983).

O estado diabético, induzido pela injeção do aloxano é caracterizado pelo diabetes tipo 1. Segundo Grankvist; Marklund; Täljedal (1981) e Bell e Hye (1983) a ação diabetogênica do aloxano se dá pela produção de radicais livres que são tóxicos para as células beta-pancreáticas, levando a morte das mesmas. Essa citotoxicidade seletiva do aloxano é condicionada pela grande capacidade da célula β em acumular a droga, aliada ao fato desta célula demonstrar uma maior sensibilidade aos radicais peróxidos, quando comparada a outros tecidos (JÖRNS et al., 1999).

Lukens (1948) fez uma revisão da literatura, analisando a ação do aloxano sobre animais de várias espécies, podendo notar que o índice de mortalidade relacionado ao uso da droga pode variar de 33% a 100% na mesma espécie. O que pode estar ligado a múltiplos fatores capazes de modificar os efeitos da droga e a sensibilidade do hospedeiro, envolvendo a via de administração, a velocidade de infusão, o tempo de jejum, o peso do animal, entre outros.

3 PROPOSIÇÃO

A presente pesquisa teve como objetivo estudar as alterações estruturais dos grupos experimentais quando comparados ao grupo controle, ocorridas na pelve renal, com relação ao uso da Penicilina G.

Tendo como objetivos específicos:

- Descrever a morfologia da pelve renal em ratos de diferentes grupos, pelo método de microscopia de luz.
- Analisar os componentes fibrocelulares da pelve renal de ratos, através de microscopia eletrônica de transmissão.
- Quantificar o componente muscular liso, elástico e colágeno na pelve renal.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa é qualitativa e quantitativa, dispondo-se a observar, analisar e correlacionar fenômenos ocorridos na pelve renal durante a administração de penicilina G, sem manipular as variáveis, procurando descobrir, com maior precisão possível, a frequência com que os fenômenos ocorreram. Será estabelecida a relação e a conexão dos fatos observados entre si. Além do que será feita a análise dos resultados obtidos com a literatura para fins de comparação.

4.1 MATERIAIS

Foram utilizados 60 ratos machos, adultos, linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), divididos em 4 grupos diferentes:

- Grupo N: 15 ratos Wistar normais;
- Grupo NP: 15 ratos Wistar normais tratados com penicilina G;
- Grupo D: 15 ratos Wistar induzidos à diabetes;
- Grupo DP: 15 ratos Wistar diabéticos com penicilina G.

Os ratos foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e mantidos durante o experimento em gaiolas no Biotério do Departamento de Anatomia do mesmo Instituto.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Indução ao diabetes

Os ratos dos grupos D e DP foram induzidos ao diabetes por Aloxano Monoidratado (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Na primeira fase, os animais

passaram por um período de jejum alimentar de 24 horas, ao término do qual, foi administrado 40mg/kg de Aloxano diluído em solução fisiológica de Cloreto de Sódio 2%, sendo 135mg Aloxano em 6ml salina, que foi então injetado 0,18ml dessa solução para cada 100g de peso do animal. Essa injeção é feita pela veia peniana, com o animal anestesiado (cada 100g de peso, 0,10ml Quetamina e 0,033ml Xilazina).

Nas 4 horas subsequentes à administração de Aloxano, os animais permaneceram em jejum, receberam em seguida água glicosada (30%) e ração à vontade, durante 24 horas. Depois desse tempo, a água glicosada foi retirada e tiveram acesso à alimentação e água normalmente.

Após 7 dias do experimento, foi realizada a dosagem de glicose sanguínea para confirmação da hiperglicemia, sendo considerados diabéticos os ratos com glicemia igual ou superior a 200mg/dL, tendo como base os autores Carvalho; Carvalho e Ferreira (2003); Diniz (2007); Lerco et al. (2003).

4.2.2 Tratamento com Penicilina G

A antibioticoterapia, iniciada após 30 dias da confirmação do diabetes, com dosagem da glicemia, foi com a Penicilina G sódica, cristalina (Amresco, Solon, Ohio) dissolvida em água ultra pura (Milli-Q) no dia do experimento, sendo que as injeções foram intravenosas (IV), na veia caudal do rato, na proporção de 50.000U/Kg/dia, durante 7 dias. No 8º dia os animais eram sacrificados.

4.2.3 Microscopia de luz:

4.2.3.1 Histologia

Utilizamos para o processamento histológico, ratos correspondendo respectivamente aos grupos N, NP, D e DP. A região da pelve renal que continha

representação das fibras foi coletada e reduzida em pequenos fragmentos, lavada em água destilada, desidratada em série ascendente de alcoóis, diafanizadas com xilol e incluídas em parafina para realização de cortes histológicos longitudinais de 5 μm .

Os cortes obtidos foram corados pelos seguintes métodos:

1 – Hematoxilina Férrica (VERHOEFF, 1908): para evidenciação de fibras elásticas (BITTENCOURT-SAMPAIO; COTTA-PEREIRA, 1971; COTTA-PEREIRA; GUERRA-RODRIGO; DAVID-FERREIRA, 1976; COTTA-PEREIRA; GUERRA-RODRIGO; BITTENCOURT-SAMPAIO, 1976).

2 – Resorcina fucsina (WEIGERT, 1898): para evidenciação de fibras elásticas e elaunínicas (BITTENCOURT-SAMPAIO; COTTA-PEREIRA; GUERRA-RODRIGO, 1971; COTTA-PEREIRA; GUERRA-RODRIGO; DAVID-FERREIRA, 1976; COTTA-PEREIRA; GUERRA-RODRIGO; BITTENCOURT-SAMPAIO, 1976).

3 – Resorcina fucsina (WEIGERT, 1898) após oxidação com solução aquosa a 1% de oxona: para evidenciação de fibras elásticas, elaunínicas e oxitalânicas (BITTENCOURT-SAMPAIO; COTTA-PEREIRA; GUERRA-RODRIGO, 1971; COTTA-PEREIRA; GUERRA-RODRIGO; DAVID-FERREIRA, 1976; COTTA-PEREIRA; GUERRA-RODRIGO; BITTENCOURT-SAMPAIO, 1976; FULLMER; LILIE, 1958; FULLMER, 1960).

4 – Azan para evidenciação do componente colágeno e muscular lisa (BERTOLINI; PRATES; MIRANDA-NETO, 1999).

5 – Picrosírius (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999) para observação do componente colágeno, especificamente os colágenos tipo I e III.

6 - Hematoxilina e Eosina, para evidenciação do componente celular.

Após as técnicas de coloração, os cortes foram desidratados, diafanizados e montados entre lâmina e lamínula, analisados e documentados em fotomicroscópio Nikon Eclipse E600/ NIS – Elements AR (Processo FAPESP 07/50015-3) do Laboratório de Biologia Celular e Anatomia Funcional Instituto de Ciências Biomédicas III.

4.2.3.2 Morfometria

Fibras elásticas

O estudo histomorfométrico dos sistemas de fibras elásticas foi realizado através do cálculo da densidade linear (LD), que é mensurado em micrômetros quadrados. O comprimento estimado das fibras do sistema elástico foi realizado utilizando a fórmula básica $L=2Q \times EV$, onde L é o comprimento de fibras por unidades de volume; Q= número de intersecções de fibras elásticas numa secção plana e EV é a unidade de volume.

O comprimento total das fibras é diretamente proporcional ao número de intersecções das fibras com a secção da área (WEIBEL, 1963; NIEWOEHNER; KLEINERMAN, 1977; CHOPARD et al., 1998; CHOPARD; GERHARD, 2000; RODRIGUES JR. et al., 2002).

As secções histológicas da pelve renal foram analisadas ao microscópio de luz com objetiva de 100x, em imersão e ocular de compensação Kf 10x/22, com graticulo de integração de 117 pontos, exibindo 11 retas paralelas na vertical e 9 na horizontal. A distância (l) entre os pontos neste sistema é de 10 μ m.

A densidade linear (LD) das fibras elásticas foi usada para estimar o comprimento total das fibras elásticas do tecido. Este é o ponto básico fundamental da análise histomorfométrica aplicada aos sistemas fibrosos (NIEWOEHNER; KLEINERMAN, 1977).

Para obter a fração de volume do sistema de fibras na pelve renal, o sistema-teste utilizado foi um graticulo do programa Imaging Software NIS – Elements AR 3.1 – FAPESP 10/50107-8, sobre a imagem projetada da câmera do microscópio para a tela do computador, permitindo contar o número de pontos que incidem sobre o sistema de fibras (P_i) e o número total de pontos no sistema-teste (P_u). A densidade de volume (V_{vi}) ocupada pelo sistema fibroso em secções histológicas longitudinais da pelve será dada pela equação: $V_{vi} = P_i/P_u$. A medida da densidade de volume (V_{vi}) é semelhante ao fator de correção (f) que permite analisar a densidade linear de secções histológicas não homogêneas (MANDARIM DE LACERDA, 1995).

Para estimativa do erro de 5%, 10 campos foram analisados, usando o sistema-teste de 117 pontos.

A estimativa da densidade linear (LD) é obtida pela seguinte fórmula: $LD = 2 \times C/A$, para ser obtida são utilizadas as seguintes relações: $At = 1 \times d \times p \times m$; $f = Pu/p \times m$; $A = At \times f$. Onde: A = área total examinada em n campos; At = área total do sistema-teste; l = comprimento do segmento de reta do sistema teste; d = distância entre as retas do sistema-teste; p = número de pontos no sistema-teste; m = número de campos estudados; f = fator de correção para amostras não homogêneas. O fator de correção é calculado pela divisão do número de pontos incidentes (Pi) na pelve renal pelo número total de pontos utilizados (Pu) que correspondem ao número total de pontos do sistema-teste, que coincide com o sistema de fibras elásticas. C corresponde ao número de intersecções das fibras com retas paralelas do sistema-teste.

A seguir, a figura 1, ilustra o sistema-teste utilizado.

Figura 1 - Sistema-teste (gratículo) de 117 pontos, com 11 retas paralelas na vertical 9 na horizontal e área total (At) de $117000 \mu m^2$. A distância (L) entre os pontos é de $10 \mu m$

Fibras Colágenas

O estudo do sistema de fibras colágenas, coradas por Picrosírius, foi realizado através da captura de 5 campos aleatórios, por meio do programa Imaging Software NIS – Elements AR 3.1. Foram feitos cortes longitudinais na pelve renal dos ratos e de cada lâmina foi capturado um campo em objetiva de 40x. Nestes, foi

quantificada a densidade de fibras colágenas do tipo I (vermelho) e do tipo III (verde), com uma ferramenta do programa que reconhece a variação de cor na imagem usando os canais de cor vermelho, verde e azul (RGB), permitindo identificar uma cor por vez, dando a intensidade média da cor na área determinada, sendo a área de cada campo equivalente a $75384,53\mu\text{m}^2$. As fibras colágenas foram analisadas sob luz polarizada.

Fibras Musculares

As lâminas histológicas obtidas para análise das fibras musculares lisas foram coradas pelo método de Azan. Utilizou-se também o Imaging Software NIS – Elements AR 3.1 para quantificação destas fibras, através da captura de 5 campos de cada lâmina. Calculando, em cada campo, a área total e área de fibras musculares, sendo feita a porcentagem entre as duas áreas. A área total foi calculada utilizando uma ferramenta do programa de análise de imagens, onde é possível desenhar o contorno da camada média e então obter a área total da mesma. Já área de fibras musculares foi calculada usando a ferramenta do programa que reconhece uma variação de cor na imagem usando os canais de cor vermelho, verde e azul. Na imagem era selecionado o tom de vermelho e o próprio programa reconhece aquele tom no resto da imagem e dá uma área total dessa coloração.

4.2.4 Microscopia eletrônica de transmissão

Os animais após prévia anestesia foram perfundidos com solução salina e de glutaraldeído. Como a concentração deste é de 25%, o glutaraldeído foi diluído em solução tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,3), deixando a 2,5%. Após a perfusão, foram coletadas amostras pequenas da pelve renal com aproximadamente 1 mm^3 , esses cortes ainda permaneceram por aproximadamente 2 horas no fixador de glutaraldeído a 2,5%.

Realizou-se a seguir a pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio a 2% por 2 horas a 4°C . Procederam dois banhos de solução tampão fosfato de sódio

durante 15 minutos. Então, o material foi colocado em acetato de uranila a 5% overnight para contraste. No dia seguinte, prosseguiu a desidratação da seguinte maneira, em série crescente de alcoóis: 70% por 15 minutos; 80% por 15 minutos; 90% por 15 minutos; 95% por 15 minutos; 100% por 15 minutos, por 4 vezes, e, óxido de propileno por 15 minutos por 2 vezes.

Depois da passagem em óxido de propileno, o material foi colocado em uma mistura de resina e óxido de propileno na proporção 1:1. A infiltração foi feita agitando-se o material em rotação ($\frac{1}{2}$ r.p.m.), num suporte com 45° de inclinação em relação ao solo, acoplado a um eixo de motor elétrico, durante 4 horas. A mistura foi trocada por resina pura do tipo SPURR, levando-se então, as peças em estufa a 37° C por 1 hora.

As resinas empregadas para microscopia eletrônica de transmissão apresentam alta viscosidade, devendo-se a infiltração nos tecidos ocorrer de forma progressiva, através de diluições gradativas realizadas no solvente intermediário, o óxido de propileno.

Feita a inclusão dos espécimes em moldes rasos de silicone, estes permaneceram em estufa a 60°C por um período entre 36 e 48 horas para polimerização da resina. Assim, os blocos foram submetidos à trimagem.

Cortes semifinos, de 1 a 3 micrômetros de espessura, foram feitos em ultramicrotomo (Leica UltraCut UCT, Reichert & Jung, Germany), coletados em lâminas de vidro, corados com azul de toluidina a 4% e lavadas em água destilada, para observação ao microscópio de luz e delimitação das áreas de interesse.

Cortes de aproximadamente 70 nm de espessura foram realizados e coletados em tela de cobre de 200 *mesh*. Os cortes foram contrastados com acetato de uranila alcoólica (WATSON, 1958) e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) por 3 a 4 minutos.

Após a contrastação, faz-se uma lavagem com álcool, finalmente lavando-se em água destilada para observação ao Microscópio Eletrônico de Transmissão Morgagni 268 D, do Departamento de Cirurgia, Setor de Anatomia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.2.5 Estatística

Com a finalidade de comparar componentes fibrosos elásticos, colágenos e musculares da pelve renal entre os diferentes ratos, foi utilizado ANOVA two-way, por existir duas variáveis, a variável Grupo (Controle e Diabético) e a variável Tratamento (Com Penicilina G e Sem Penicilina G). A seguir, empregaram-se comparações múltiplas pelo método de Tukey. O nível de significância adotado para os testes foi de 5%.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram analisados de acordo com cada técnica proposta no método. A análise microscópica e a histomorfometria possibilitaram o entendimento das alterações ocorridas na pelve renal dos ratos em estudo, permitindo tecer comparações entre o grupo controle e os grupos experimentais. O foco primário da atenção em geral está relacionado às diferenças causadas pela penicilina G nos ratos experimentais.

5.1 ANÁLISE QUALITATIVA

Na observação dos cortes histológicos da pelve renal dos ratos nos diferentes grupos analisados, notam-se variações tanto na arquitetura quanto na quantidade dos componentes fibrosos do sistema de fibras elásticas, colágenas e musculares (explicitados na histomorfometria), com relação ao diabetes e com ou sem penicilina.

Em todos os grupos analisados notamos uma parede estruturada em três camadas distintas, sendo uma externa de tecido conjuntivo frouxo, uma média de músculo liso e uma interna formada por epitélio de transição com lâmina própria de tecido conjuntivo.

O epitélio de transição, da camada interna, no grupo de ratos normais é constituído por núcleos dispostos em camadas e separado, da camada muscular, por tecido conjuntivo com fibroblastos. A camada muscular possui fibras musculares dispostas obliquamente com feixes longos longitudinais (Figura 2, N). Já nos ratos normais com penicilina G os núcleos com forma ovoide estão dispostos em camadas irregulares no epitélio de transição, tal epitélio possui algumas projeções celulares para a luz da pelve renal. Nesse grupo, não é nítida a separação entre o epitélio de transição e a camada de fibras musculares, pois o conjuntivo é pouco espesso. A disposição muscular se dá predominantemente por fibras circulares. (Figura 2, NP)

O grupo dos ratos diabéticos possui núcleos dispostos irregularmente no epitélio de transição, tais núcleos são menores e possuem formas variadas, podendo ser ovóides e esféricos, ou alguns alongados. Também não observamos uma camada de conjuntivo muito nítida, separando o epitélio do plexo de fibras musculares que estão dispostas circularmente (Figura 2, D). Nos ratos diabéticos com penicilina G os núcleos são grandes e arredondados, estão dispostos em três camadas, apoiados em lâmina basal bem nítida, separando o revestimento epitelial do muscular, com tecido conjuntivo, que possui muitos fibroblastos. O plexo muscular possui predominância de feixes de fibras musculares (Figura 2, DP).

Figura 2 - Corte histológico longitudinal de 5µm da pelve renal. Hematoxilina e Eosina, 400x. Evidenciando o epitélio de transição (E) com seus núcleos, tecido conjuntivo (C) com fibroblastos (seta) e a camada muscular (M) com fibras musculares circulares e longitudinais

A análise da coloração Azan nos mostra que existem duas lâminas de colágeno, uma na submucosa e outra na adventícia, com fibras musculares entre

elas. Em observações não quantitativas podemos perceber que nos dois grupos que envolvem ratos diabéticos é visível a diminuição do peso e o aumento de tamanho do rim e pelve renal, em comparação aos dois grupos dos ratos normais. Com isso, quando olhamos a pelve renal no microscópio óptico notamos que a camada média é maior nos ratos diabéticos do que nos controles. Mas essa diferença é diminuída com a penicilina G, já que nos ratos com penicilina G também ocorre um aumento de tamanho na camada muscular (Figura 3).

Figura 3 - Corte histológico longitudinal de 5µm da pelve renal. Azan, 400x. Evidenciando as duas camadas de fibras colágenas (azul) e entre elas, as fibras musculares (rosa)

Evidenciou-se que o componente colágeno dos grupos, sob luz polarizada, está constituído de colágeno do tipo I em maior quantidade e tipo III em menor, variando entre os grupos. Sendo que, existe um predomínio de colágeno nas camadas externa de tecido conjuntivo frouxo e interna de epitélio de transição. E

quase inexistente na camada média, com menor quantidade de colágeno. Além disso, não foi visto diferença quanto à orientação das fibras colágenas entre os grupos, mas ao observarmos a pelve renal dos ratos diabéticos, foi possível notar uma desorganização na distribuição das fibras colágenas, assim como podemos ver na figura 4.

Figura 4 - Corte histológico longitudinal de 5µm da pelve renal. Picrosírius, 400x. Evidenciando as fibras colágenas do tipo I (vermelho) e tipo III (verde) sob luz polarizada

As fibras elásticas podem ser encontradas nas três camadas da pelve renal, inclusive junto com o colágeno, mas nós levamos em consideração apenas as fibras distribuídas na camada média da pelve. Essa análise com coloração de Hematoxilina Férrica (Verhoeff), que evidencia as fibras elásticas maduras, mostrou que no grupo dos ratos normais há predomínio desse tipo de fibras, sendo o grupo com maior quantidade em comparação com os demais. O diabetes parece afetar

essa quantidade de fibras, assim como a Penicilina G também, fazendo com que o número de fibras diminua (Figura 5).

Figura 5 - Corte histológico longitudinal de 5µm da pelve renal. Verhoeff, 1000x, em imersão. Evidenciando as fibras elásticas (setas) maduras

Na utilização da coloração Resorcina fucsina (Weigert) para evidenciação de fibras elásticas e elaunínicas, foi possível observar também uma predominância dessas fibras no grupo dos ratos normais, sendo que houve uma diferença na presença do diabetes, fazendo com que essas fibras diminuíssem (Figura 6).

Figura 6 - Corte histológico longitudinal de 5µm da pelve renal. Weigert, 1000x, em imersão. Evidenciando as fibras elásticas (setas) maduras e elaunínicas

A coloração de Resorcina fucsina (Weigert) após oxidação com solução aquosa a 1% de oxona, que evidencia as fibras elásticas, elaunínicas e oxitalânicas, mostrou que o grupo dos diabéticos possui um número maior dessas fibras, quando comparados com os ratos do grupo controle (Figura 7).

Figura 7 - Corte histológico longitudinal de 5µm da pelve renal. Weigert-Oxona, 1000x, em imersão. Evidenciando as fibras elásticas (setas) maduras, elaunínicas e oxitalânicas

O exame das microfotografias obtidas no microscópio eletrônico de transmissão, aqui representadas pela figura 8, mostra que o revestimento interno da pelve renal dos ratos wistar normais está composto por epitélio de transição com células basais e superficiais, sendo que os núcleos destas células não diferem muito. Na sua morfologia as células apresentam vesículas de forma oval ou circular. A membrana celular voltada para a luz da pelve renal tem aspecto recortado, e logo abaixo um sítio de vesículas discoides. Entre a camada muscular e o revestimento epitelial foram observadas mitocôndrias. As células da camada muscular estão às vezes dispersas na matriz extracelular, principalmente junto à lâmina basal da camada epitelial. Não foi difícil evidenciar a diferença entre as células e não notamos organelas bem diferenciadas, ainda que o citoplasma apresente material eletrodenso condensado de forma predominantemente circular. Na transição com a camada mais externa, presença de fibras colágenas e as células musculares lisas com grânulos

eletrodensos. No citoplasma das células musculares, que estão separadas entre si podemos observar conglomerados de filamentos de actina com algumas mitocôndrias presentes.

Figura 8 - Micrografia eletrônica de transmissão da pelve renal do grupo N de ratos normais. (A) Notamos o epitélio de transição (E) com a camada subepitelial de tecido conjuntivo (C) e a camada muscular (M). (B) Observamos ainda a camada muscular (M) e a camada adventícia externa (AE)

A observação sob microscopia de transmissão da região do epitélio da pelve renal dos ratos do grupo NP com uma visão panorâmica na figura 9 mostrando luz da membrana luminal recortada, núcleos das células do epitélio de transição, vesículas arredondadas, alguns núcleos evidenciando nucléolos. Na transição com a camada muscular observamos fibroblastos e capilares. Nos núcleos a cromatina nuclear está concentrada. Estão também presentes feixes de fibras colágenas em diversas direções. Na camada muscular as células possuem núcleos alongados com cromatina dispersa (figura 9, B). Notamos presença de algumas mitocôndrias. Esta camada apresenta em alguns locais limites celulares nítidos, presença de raras organelas. Entremeados pode-se observar grânulos citoplasmáticos. Algumas células são atípicas com núcleo situado em uma extremidade celular e cromatina densa, citoplasma preenchido por organelas, sugerindo mitocôndrias morfológicamente alteradas.

Figura 9 - Micrografia eletrônica de transmissão da pelve renal do grupo NP de ratos normais com penicilina G. (A) Observamos o epitélio de transição (E) com núcleos em evidência (N) e membrana luminal recortada (seta). (B) Notamos as células musculares lisas com seus núcleos (N) na camada muscular (M) da pelve

Foi observado nos animais diabéticos a nítida separação celular, presença de prolongamentos citoplasmáticos, aumento do número de mitocôndrias e a presença de outras organelas como aparelho de Golgi e retículo endoplasmático liso. Algumas poucas células apresentam em torno do núcleo, grande número de vacúolos tomando todo o citoplasma. A região do epitélio de transição que reveste internamente a pelve renal apresenta células superficiais, bem próximas da membrana luminal sendo esta extremamente recortada. Os núcleos epiteliais têm diferentes formas e tamanhos e a região apresenta capilarização mais nítida. Próximo à área da camada muscular, células basais estão agrupadas e nota-se a presença de cavéolas. As células da pelve renal na camada muscular apresentam-se com forma quadrangular, algumas com núcleos evidentes e outras com ausência de núcleos, a cromatina dos núcleos, quando presentes, estão junto à periferia do mesmo. Excepcionalmente a membrana luminal junto ao epitélio de transição da pelve renal de ratos diabéticos apresenta microvilosidades neste caso a membrana não é tão recortada como em ratos normais (Figura 10).

Figura 10 - Micrografia eletrônica de transmissão da pelve renal do grupo D de ratos diabéticos. (A) Observamos o epitélio de transição (E) com núcleos em evidência (N) e membrana luminal recortada. (B) Notamos as células musculares lisas na camada muscular (M) da pelve. (C) Evidenciamos a grande presença organelas como mitocôndrias (Mt) e aparelho de Golgi (g) e microvilosidades na membrana luminal (seta)

Examinando as microfotografias do grupo DP (Figura 11) foi verificado que o epitélio de transição as células basais, apresentam núcleos com cromatina junto à membrana celular, são ainda observadas vesículas fusiformes. Aqui foram encontradas outras organelas citoplasmáticas como aparelho de Golgi, e observamos também que a membrana luminal é recortada. Próximo à camada de fibras musculares lisas, os feixes colágenos estão presentes. As células musculares lisas são fusiformes, nucleadas ou não e não é definido um limite entre as células. A observação mostra que neste grupo, diabético com penicilina G, o número de organelas é mais visível, assim como verificado nos animais diabéticos.

Figura 11 - Micrografia eletrônica de transmissão da pelve renal do grupo DP de ratos diabéticos com penicilina G. (A) Observamos o epitélio de transição (E) com núcleos em evidência (N). (B) Notamos as células musculares lisas com seus núcleos (N) na camada muscular (M) da pelve renal

5.2 ANÁLISE QUANTITATIVA

5.2.1 Fibras Musculares

Verificamos na análise das fibras musculares, com coloração Azan, que quando observamos a área total da região dessas fibras, é notável o efeito do *Diabetes mellitus* sobre a pelve renal, pois foi detectada uma diferença significativa entre diabético e controle, ocorrendo um aumento dessa área nos diabéticos, sem diferença entre com e sem Penicilina G (Gráfico 1 e Tabela 1).

Gráfico 1 - Gráfico da média e desvio padrão da área total dada em μm^2 . Não foi observado efeito de interação Grupo e Tratamento ($p=0.543$). Existe diferença significativa entre Diabético e Controle, $p<0.001$ (*). Não foi detectada diferença significativa entre com e sem Penicilina G, $p=0.603$

Tabela 1 - Dados estatísticos da área total das Fibras Musculares

	n	Média (μm^2)	Desvio Padrão	Valor-p
Grupo				0.0000
Controle	30	32585.3		
Diabético	30	43100.5		
Tratamento				0.6027
c/ Penicilina G	30	38458.3		
s/ Penicilina G	30	37227.5		
Grupo por Tratamento				0.5427
Controle c/ Penicilina G	15	33920.8	11286.3	
Controle s/ Penicilina G	15	31249.8	7263.03	
Diabético c/ Penicilina G	15	42995.8	6792.03	
Diabético s/ Penicilina G	15	43205.2	10266.9	

n= número de animais analisados.

A análise por coloração, apenas das fibras musculares, continua mostrando que o diabetes tem efeito sobre a pelve renal, aumentando o número das fibras. E

que a Penicilina G também possui esse efeito, fazendo com que essa quantidade de fibras musculares aumente (Gráfico 2 e Tabela 2).

Gráfico 2 - Gráfico da média e desvio padrão da área das fibras musculares dada em μm^2 . Não foi observado efeito de interação Grupo e Tratamento ($p=0.281$). Existe diferença significativa entre Diabético e Controle, $p=0.006$ (*) e também entre com e sem Penicilina G, $p=0.011$ (#)

Tabela 2 - Dados estatísticos da área de Fibras Musculares

	n	Média (μm^2)	Desvio Padrão	Valor-p
Grupo				0.0059
Controle	30	3466.24		
Diabético	30	4426.63		
Tratamento				0.0111
c/ Penicilina G	30	4387.47		
s/ Penicilina G	30	3505.4		
Grupo por Tratamento				0.2808
Controle c/ Penicilina G	15	4090.08	1597.18	
Controle s/ Penicilina G	15	2842.4	843.595	
Diabético c/ Penicilina G	15	4684.86	921.884	
Diabético s/ Penicilina G	15	4168.4	1627.62	

n= número de animais analisados.

Quando fazemos a porcentagem da área de fibras musculares sobre a área total, conseguimos tirar o efeito esperado do *Diabetes mellitus* e observar, como principal, o efeito da Penicilina G sobre a quantidade das fibras musculares, percebendo assim, que essa antibioticoterapia causa um aumento das fibras musculares lisas da pelve renal nos ratos analisados (Gráfico 3 e Tabela 3).

Gráfico 3 - Gráfico da média e desvio padrão da área da porcentagem de área fibras musculares (Am) pela área total (At). Não foi detectado efeito de interação Grupo e Tratamento ($p=0.379$). Não existe diferença significativa entre Diabético e Controle, ($p=0.546$) e existe diferença significativa entre com e sem Penicilina G, $p=0.002$ (*)

Tabela 3 - Dados estatísticos da porcentagem de área de Fibras Musculares sobre área total

	n	Média (μm^2)	Desvio Padrão	Valor-p
Grupo				0.5460
Controle	30	18.9917		
Diabético	30	18.5871		
Tratamento				0.0017
c/ Penicilina G	30	19.8855		
s/ Penicilina G	30	17.6933		
Grupo por Tratamento				0.3787
Controle c/ Penicilina G	15	20.3833	3.50862	
Controle s/ Penicilina G	15	17.6001	2.8167	

Diabético c/ Penicilina G	15	19.3878	2.68368
Diabético s/ Penicilina G	15	17.7864	2.11708

n= número de animais analisados.

5.2.2 Fibras Colágenas

Na análise das fibras colágenas tipo I e III com coloração de Picrosírius, observamos que em todos os grupos existe uma maior prevalência das fibras do tipo I e menor do tipo III. Olhando apenas a do tipo I podemos notar uma diferença significativa entre diabético e controle, ocorrendo uma diminuição das fibras colágenas desse tipo no grupo dos diabéticos, assim como mostram o gráfico 4 e a tabela 4. Não sendo detectada diferença entre com e sem penicilina G.

Gráfico 4 - Gráfico da média e desvio padrão da área de colágeno tipo I dada em μm^2 . Não foi observado efeito de interação Grupo e Tratamento ($p=0.429$). Existe diferença significativa entre Diabético e Controle, $p=0.010$ (*). Não foi detectada diferença significativa entre com e sem Penicilina G, $p=0.215$

Tabela 4 - Dados estatísticos da área de Fibras Colágenas Tipo I

	n	Média (μm^2)	Desvio Padrão	Valor-p
Grupo				0.0100
Controle	30	16731.2		
Diabético	30	13675.5		
Tratamento				0.2145
c/ Penicilina G	30	15922.8		
s/ Penicilina G	30	14483.9		
Grupo por Tratamento				0.4288
Controle c/ Penicilina G	15	16993.9	3629.79	
Controle s/ Penicilina G	15	16468.4	1689.35	
Diabético c/ Penicilina G	15	14851.7	5076.53	
Diabético s/ Penicilina G	15	12499.3	6084.02	

n= número de animais analisados.

Quando observamos as fibras colágenas do tipo III, notamos o efeito da Penicilina G sobre a pele renal, fazendo com que aumente a quantidade dessas fibras (Gráfico 5 e Tabela 5).

Gráfico 5 - Gráfico da média e desvio padrão da área de colágeno tipo III dada em μm^2 . Não foi observado efeito de interação Grupo e Tratamento ($p=0.136$). Não existe diferença significativa entre Diabético e Controle, $p=0.070$. Foi detectada diferença significativa entre com e sem Penicilina G, $p=0.036$ (*)

Tabela 5 - Dados estatísticos da área de Fibras Colágenas Tipo III

	n	Média (μm^2)	Desvio Padrão	Valor-p
Grupo				0.0701
Controle	30	2448.52		
Diabético	30	2930.9		
Tratamento				0.0361
c/ Penicilina G	30	2970.15		
s/ Penicilina G	30	2409.27		
Grupo por Tratamento				0.1356
Controle c/ Penicilina G	15	2926.73	757.937	
Controle s/ Penicilina G	15	1970.31	974.714	
Diabético c/ Penicilina G	15	3013.56	1245.69	
Diabético s/ Penicilina G	15	2848.24	1009.34	

n= número de animais analisados.

5.2.3 Fibras Elásticas

Quanto ao tipo de fibras elásticas presentes na camada média dos diferentes grupos analisados foram realizados três tipos de colorações, Verhoeff para fibras elásticas maduras, Weigert para fibras elásticas maduras e elaunínicas e Weigert - Oxona para fibras elásticas oxitalânicas, maduras e elaunínicas, assim como mencionado anteriormente.

As análises estatísticas realizadas de cada uma das colorações em separado mostraram que em Verhoeff as fibras elásticas estiveram em maior quantidade no grupo controle do que nos demais grupos. Foi possível notar que tanto o diabetes quanto a penicilina G fizeram diminuir as fibras elásticas, quando comparados ao grupo de ratos normais (Gráfico 6 e Tabela 6).

Gráfico 6 - Gráfico da média e desvio padrão da densidade linear (Ld) de fibras elásticas na coloração de Verhoeff. Onde foi observado efeito de interação Grupo e Tratamento ($p=0.007$). Existe diferença significativa entre Diabético e Controle sem penicilina, $p<0.05$ (*). Foi detectada diferença significativa entre com e sem Penicilina G no grupo controle, $p<0.05$ (#)

Tabela 6 - Dados estatísticos da densidade linear das Fibras Elásticas com coloração de Verhoeff

	n	Média (1/μm ²)	Desvio Padrão	Valor-p
Grupo				0.0001
Controle	30	0.0160795		
Diabético	30	0.011793		
Tratamento				0.0002
c/ Penicilina G	30	0.0118486		
s/ Penicilina G	30	0.0160239		
Grupo por Tratamento				0.0069
Controle c/ Penicilina G	15	0.0125266	0.00202212	
Controle s/ Penicilina G	15	0.0196324	0.00749382	
Diabético c/ Penicilina G	15	0.0111705	0.00131561	
Diabético s/ Penicilina G	15	0.0124155	0.00185473	

n= número de animais analisados.

Observando as fibras elásticas na coloração de Weigert, podemos notar que existe diferença estatística entre os grupos dos ratos normais e dos ratos

diabéticos, sendo a quantidade de fibras elásticas maior no grupo N. Quando analisamos a utilização da penicilina G percebemos que esse resultado é invertido, ocorrendo interação entre grupo e tratamento, fazendo com que os dois grupos praticamente se igualem (Gráfico 7 e Tabela 7).

Gráfico 7 - Gráfico da média e desvio padrão da densidade linear (Ld) de fibras elásticas na coloração de Weigert. Onde foi observado efeito de interação Grupo e Tratamento ($p=0.009$). Existe diferença significativa entre Diabético e Controle sem penicilina, $p<0.05$ (*). Não foi detectada diferença significativa entre com e sem Penicilina G, $p=0.8581$

Tabela 7 - Dados estatísticos da densidade linear das Fibras Elásticas com coloração de Weigert

	n	Média (1/μm ²)	Desvio Padrão	Valor-p
Grupo				0.2574
Controle	30	0.0164882		
Diabético	30	0.01506631		
Tratamento				0.8581
c/ Penicilina G	30	0.0158875		
s/ Penicilina G	30	0.0156638		
Grupo por Tratamento				0.0092
Controle c/ Penicilina G	15	0.0149193	0.00202212	
Controle s/ Penicilina G	15	0.0180571	0.00580635	
Diabético c/ Penicilina G	15	0.0168557	0.00565922	

Diabético s/ Penicilina G	15	0.0132705	0.00490292
---------------------------	----	-----------	------------

n= número de animais analisados.

A coloração de Weigert-Oxona mostrou diferença estatística entre diabético e controle, onde podemos então observar que os ratos diabéticos possuem maior número de fibras oxitalânicas. Já o tratamento com a penicilina G não deu diferença estatística (Gráfico 8 e Tabela 8).

Gráfico 8 - Gráfico da média e desvio padrão da densidade linear (Ld) de fibras elásticas na coloração de Weigert-Oxona. Não foi detectado efeito de interação Grupo e Tratamento ($p=0.661$). Existe diferença significativa entre Diabético e Controle, $p<0.001$ (*). Não foi detectada diferença significativa entre com e sem Penicilina G, $p=0.455$

Tabela 8 - Dados estatísticos da densidade linear das Fibras Elásticas com coloração de Weigert-Oxona

	N	Média (1/μm ²)	Desvio Padrão	Valor-p
Grupo				0.0001
Controle	30	0.0223558		
Diabético	30	0.0288166		
Tratamento				0.4549
c/ Penicilina G	30	0.0261663		
s/ Penicilina G	30	0.0250061		
Grupo por Tratamento				0.6608

Controle c/ Penicilina G	15	0.023276	0.00696054
Controle s/ Penicilina G	15	0.0214356	0.00743076
Diabético c/ Penicilina G	15	0.0290566	0.00246215
Diabético s/ Penicilina G	15	0.0285766	0.00573462

n= número de animais analisados.

Os resultados demonstraram que a coloração de Weigert-Oxona, que evidencia fibras elásticas, elaunínicas e oxitalânicas, apresentou uma diferença estatisticamente maior de fibras quando comparados com as colorações de Weigert e Verhoeff, diferença essa demonstrada no gráfico 9.

Gráfico 9 - Gráfico da média e desvio padrão das fibras elásticas, elaunínicas e oxitalânicas da pelve renal de ratos normais (N), normais com penicilina G (NP), diabéticos (D) e diabéticos com penicilina G (DP). Existe diferença significativa entre as fibras, $p < 0.001$ (*). A maior densidade linear de fibras elásticas foi observada na coloração Weigert-Oxona. $WO \neq Verhoeff$, $p < 0.05$; $WO \neq Weigert$, $p < 0.05$

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho analisamos comparativamente alguns aspectos estruturais e morfométricos da pelve renal de ratos normais e diabéticos, com ou sem Penicilina G. Uma vez que, na literatura consultada, poucos são os relatos sobre a organização da pelve renal, principalmente de seus constituintes de resistência e tensão, que são os sistemas fibrosos.

Em todos os grupos analisados notamos que a pelve renal possui uma parede estruturada em três camadas descritas por Bargmann (1968) e Junqueira e Carneiro (1999): uma adventícia externa, composta de tecido conjuntivo frouxo; uma média com túnica longitudinal interna e circular externa de músculo liso; e uma interna formada por epitélio de transição com lâmina própria de tecido conjuntivo subepitelial. Percebemos isso tanto na microscopia de luz como na eletrônica de transmissão.

As fibras musculares lisas da pelve renal, assim como observado em nossos grupos experimentais, foram descritas por Finberg e Peart (1970) como sendo orientadas em um plano circular, que fica logo abaixo do epitélio e aparecem como um anel intacto. Na parte externa da faixa de fibras circulares, estão as fibras orientadas em planos longitudinais e oblíquos, essa disposição das fibras musculares lisas ficou bastante evidente na análise ultraestrutural da pelve renal, visto também por Dixon e Gosling (1982).

Em nossas observações sob microscopia de luz do componente muscular liso da pelve renal dos quatro grupos analisados, percebemos que a utilização da penicilina G e o diabetes fizeram com que o número das fibras musculares aumentasse. Esse aumento também foi observado por Rodrigues Jr et al. (2011) na uretra, e por Uvelius (1986); Liu e Daneshgari (2006) e Rodrigues Jr et al. (2011) na bexiga urinária de ratos diabéticos.

Embora estudos farmacológicos na pelve renal de animais e humanos têm sido realizados, inclusive efeitos de drogas sobre a região do seu marcapasso (DEL TACCA et al., 1974; LONGRIGG, 1975; DEL TACCA; CONSTANTINOU; BERNARDINI, 1981; VARGIU et al., 2004), estudos com a penicilina G e seus efeitos no trato urinário superior são raros, geralmente envolvem o transporte tubular

renal da penicilina G (BERGERON et al., 1975), ou ainda a depuração da droga em coelhos e no homem (EAGLE et al., 1947) e em crianças (BARNETT et al., 1949).

Em nosso estudo observamos que a Penicilina G altera os componentes fibrosos da pelve renal, onde notamos que a área de fibras musculares lisas é aumentada, a área do colágeno tipo III também aumenta e as fibras elásticas maduras estão diminuídas, neste caso apenas entre N e NP. Todos esses efeitos foram observados na presença desse antibiótico.

De acordo com Burlew e Weber (2000) a rede de tecido conjuntivo é constituída principalmente por colágeno tipo I e III e fibras elásticas. O componente colágeno do tipo I, segundo Montes (1996), forma fibras espessas e, consequentemente, quando analisados sob luz polarizada, apresenta uma intensa birrefringência que varia da cor amarela até o vermelho. Já o colágeno do tipo III forma fibras finas mostrando uma fraca birrefringência, sendo visualizada em cor verde. As lâminas coradas pelo método de picrosírius e sua concomitante análise sob luz polarizada mostraram que o colágeno tipo I (vermelho) da pelve renal apresentou-se diminuído nos ratos diabéticos quando comparados com o controle, isso também foi observado na uretra e na bexiga por alguns autores (UVELIUS, 1986; LIU; DANESHGARI, 2006; RODRIGUES JR et al., 2011).

No estudo realizado por Anderegg; Wilczek; Haustein (2000), sobre o efeito da penicilina G na derme, foi observado que o metabolismo de colágeno tipo I não se altera. Nós também não notamos alteração significativa no colágeno tipo I com a utilização da penicilina G.

Abreu-Silva et al. (2004) observando a pele de camundongos e Melo (2005) na pele de cães, os dois estudos com leishmaniose, demonstraram que houve substituição do colágeno do tipo I pelo tipo III com o decorrer da infecção. Assim como observado em nossos estudos com a pelve renal, onde o aumento do tipo III se deu nos ratos com diabetes e com utilização da penicilina G, o que parece ter substituição do colágeno tipo I pelo do tipo III. Esse aumento do colágeno tipo III também foi observado na uretra e na bexiga de ratos diabéticos, quando comparados aos ratos controles, por Rodrigues Jr et al. (2011).

Levando em consideração essa substituição de colágeno, se confirma que o colágeno do tipo I é constitutivo da arquitetura tecidual e que após agressão, causada ou pelo diabetes ou pela penicilina G, ele é modificado para o tipo III com a

finalidade de reconstrução tecidual. Standring (2010) diz que o colágeno tipo III é amplamente distribuído, particularmente em tecidos jovens em reparação. Podendo demonstrar também uma diminuição da rigidez da parede da pelve, que é feita pelo colágeno do tipo I e aumento da extensibilidade, dada pelo colágeno do tipo III. Conforme Junqueira e Carneiro (1999) citaram com relação aos tipos de fibras colágenas, as do tipo I estariam relacionadas à resistência às trações, enquanto as do tipo III realizariam a manutenção da estrutura de tecidos delicados e expansíveis e sustentação de órgãos e células, sendo frequente a substituição de fibras do tipo III pelas do tipo I.

Com relação às alterações do colágeno em vasos diabéticos, Andreassen; Seyer-Hansen; Oxlund (1981) descrevem que o colágeno aórtico sofre pouca influência pelo estado diabético, porém Tanno; Yoshinaga e Sato (1993) e Vranes; Cooper e Dilley (1999) descrevem aumento do colágeno total no vaso diabético, enquanto Andreassen e Oxlund (1987) descrevem uma diminuição do conteúdo do colágeno por μm^2 . Em nossas observações o *Diabetes mellitus* mostrou-se como uma doença metabólica capaz de alterar a morfologia da pelve renal, fazendo com que a área de fibras musculares lisas aumentasse, a área de colágeno tipo I diminuísse, a do tipo III tivesse uma tendência de aumento, a quantidade de fibras elásticas maduras e elaunínicas diminuíssem e as oxitalânicas aumentassem.

Spanheimer; Umpierrez e Stumpf (1988) relatam que muitas das complicações crônicas do *Diabetes mellitus* envolvem defeitos do tecido conjuntivo. Monnier; Kohn e Cerami (1984) e Airaksinen et al. (1993) descrevem que estes defeitos do tecido conjuntivo está relacionado, principalmente, com o colágeno e a elastina. Corroborando com o fato de que a análise estereológica da densidade de volume do componente elástico evidenciou diminuição das fibras com elastina nos ratos diabéticos, quando comparadas aos ratos controle.

Vários fatos mostram que os três tipos de fibras elásticas pertencem a uma ordem cronológica durante a histogênese, iniciando pelas fibras oxitalânicas, passando a fibras elaunínicas e tornando-se maduras como as fibras elásticas (MONTES, 1996). As fibras oxitalânicas dão resistência aos tecidos, enquanto que as fibras contendo elastina proporcionam elasticidade (GAWLIK, 1965). Como observamos que o diabetes aumenta as fibras oxitalânicas, então, ele está também

aumentando a resistência da pelve renal. Já os ratos controle possuem uma maior elasticidade, pois têm prevalência das fibras elásticas maduras e elaunínicas.

Sabe-se que as fibras oxitalânicas impedem o estiramento excessivo (LILLE; FULLMER, 1976; MONTES, 1992; COTTA-PEREIRA; RODRIGO; DAVID-FERREIRA, 1977), não se alongam com mecanismos de estresse/tensão (ROSS, 1973), que as fibras elaunínicas apresentam muitos fibrotúbulos e quantidade pequena de elastina, o que possibilita uma maior resistência à tração (MONTES, 1992). E que as fibras elásticas podem determinar resistência a tensões e absorver o atrito (CARVALHO-FILHO; CARVALHO; SOUZA, 1996). De acordo com Reisdorferer; Pereira e Chopard (2011) as fibras elásticas maduras (elastina), tornam-se responsáveis pela elasticidade e recuo elástico da junção vésicouretral, onde as fibras elaunínicas assumem o papel intermediário entre oxitalânicas e fibras maduras, proporcionando adaptação funcional.

Do ponto de vista ultraestrutural, vários trabalhos foram realizados com o intuito de descrever as estruturas da pelve renal, analisando a sua organização geral em hamsters (LACY; SCHIMIDT-NIELSEN, 1979), observações do epitélio da pelve nos ratos (SILVERBLATT, 1974) e da musculatura nos cálices, pelve e ureter superior de humanos (DIXON; GOSLING, 1982), além de obstrução funcional do ureter e pelve renal (GOSLING; DIXON, 1978).

Os achados neste estudo revelaram a presença de muitos fibroblastos e mitocôndrias, segundo Lacy e Schmidt-Nielsen (1979), mitocôndrias são moderadamente abundantes na pelve renal, porém notamos que a maior abundância foi na pelve dos ratos diabéticos, o que pode nos demonstrar que eles possuem um gasto de energia mais intenso. Pereira et al. (2010) descreveram que nas meninges dos ratos neonatos e adultos existem muitos fibroblastos e mitocôndrias, e poucos nos ratos velhos. Dixon e Gosling (1982) também descrevem organelas encontradas na pelve renal, dizendo que as mitocôndrias estão espalhadas aleatoriamente em todo o sarcoplasma, além de pequenas cisternas de retículo granular e ocasionais membranas de Golgi em ambos os polos nucleares, Lacy e Schmidt-Nielsen (1979) também descrevem a presença do complexo de Golgi na região perinuclear.

Dixon e Gosling (1982) descrevem ainda linhas de caveolas intercaladas com agregações de material eletrondenso no sarcolema de cada célula do músculo liso, nós também observamos a presença dessas caveolas.

Autores como Lacy e Schimdt-Nielsen (1979) e Silverblatt (1974) observaram microvilosidades projetadas na membrana luminal das células epiteliais da pelve, nós vimos essas vilosidades apenas nos diabéticos. Observamos também na microscopia eletrônica de transmissão, que a membrana luminal possui uma aparência recortada na pelve renal dos ratos analisados, isso foi relatado no estudo feito por Silverblatt (1974) como sendo um aspecto característico da membrana assimétrica encontrada em células de transição.

Baseado em todas essas observações podemos inferir que a Penicilina G provoca efeitos na pelve renal dos ratos analisados, e sendo um medicamento essencial, inclusive referendado pela Organização Mundial de Saúde, esse antibiótico deve entrar no contexto terapêutico com antimicrobianos, nas condições em que seu uso for indicado, porem com maior atenção sobre seus efeitos, tomando como justificativa os efeitos adversos, até porque se dá mais ênfase apenas no processo alérgico que ela pode desencadear e vimos que esses efeitos podem ir além da alergia, provocando modificações em partes do sistema urinário. A dificuldade de acesso aos antibióticos pela população em geral pode ter sido um fato importante para evitar o uso indiscriminado desses medicamentos.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

A partir da metodologia empregada e os resultados obtidos dos grupos experimentais e controle, podemos inferir que a antibioticoterapia feita pela penicilina G e a doença metabólica, o diabetes, provocam diferenças estruturais e ultraestruturais na pelve renal dos ratos Wistar, principalmente na organização dos componentes fibrosos elástico, muscular e colágeno.

Notamos que a Penicilina G:

- Aumenta a área de fibras musculares lisas;
- Aumenta a área do colágeno tipo III;
- E diminui as fibras elásticas maduras, neste caso apenas entre N e NP.

O *Diabetes mellitus* mostrou-se como uma doença capaz de:

- Aumentar a área de fibras musculares lisas;
- Diminuir a área de colágeno tipo I;
- Diminuir a quantidade de fibras elásticas maduras e elaunínicas e aumentar as oxitalânicas;
- Aumentar a quantidade de mitocôndrias.

REFERÊNCIAS

ABREU-SILVA, A. L.; CALABRESE, K. S.; MORTARA, R. A.; TEDESCO, R. C.; CARDOSO, F. O.; CARVALHO, L. O. P.; GONÇALVES DA COSTA, S. C. Extracellular matrix alterations in experimental murine *Leishmania (L.) amazonensis* infection. **Parasitology**, v. 128, p. 385-390, 2004.

AIRAKSINEN, K. E. J.; SALMELA, P. I.; LINNALOUTO, M. K.; IKÄHEIMO, M. J.; AHOLA, K.; RYHÄNEN, L. J. Diminished arterial elasticity in diabetes: association with fluorescent advanced glycosylation end products in collagen. **Cardiovascular Research**, v. 27, p. 942-945, 1993.

ANDEREGG, U.; WILCZEK, A.; HAUSTEIN, U. F. Penicillin G does not alter collagen type I metabolism of dermal fibroblasts in culture. **Dermatology**, v. 200, p. 111-114, 2000.

ANDREASSEN, T. T.; SEYER-HANSEN, K.; OXLUND, H. Biochemical changes in connective tissues induced by experimental diabetes. **Acta Endocrinologica**, v. 98, p. 432-436, 1981.

ANDREASSEN, T. T.; OXLUND, H. Changes in collagen and elastin of the rat aorta induced by experimental diabetes and food restriction. **Acta Endocrinologica**, v. 115, p. 338-344, 1987.

BARGMANN, W. **Histología y anatomia microscópica humana**. 3. ed. Calabria, Barcelona: Editorial Labor, 1968. 956 p.

BARNES, M. J.; FARNDAL, R. W. Collagens and atherosclerosis. **Experimental Gerontology**, v. 34, p. 513-525, 1999.

BARNETT, H.L.; MCNAMARA, H.; SHULTZ, S.; TOMPSETT, R. Renal clearances of sodium penicillin G, procaine penicillin G, and inulin in infants and children. **Pediatrics**, v. 3, n. 4, p. 418-422, 1949.

BELL, R.H.; HYE, R.J. Animal models of Diabetes mellitus: physiology and pathology. **Journal of surgical research**, v. 35, p. 433-460, 1983.

BERGERON, M. G.; GENNARI, F. J.; BARZA, M.; WEINSTEIN, L.; CORTELL, S. Renal tubular transport of Penicillin G and Carbenicillin in the rat. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 132, n. 4, p. 374-83, 1975.

BERTOLINI, S. M. M. G.; PRATES, N. E. V. B. e MIRANDA-NETO, M. H. Estudo microscópico das pontes de miocárdio sobre as veias cardíacas de suínos. **Acta Scientiarum**. v. 21, n. 2, p. 415-419, 1999.

BITTENCOURT-SAMPAIO, S.; COTTA-PEREIRA, G.; GUERRA-RODRIGO, F. Oxytalan, elaunin and elastic fibers in the human skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 66, p. 143-148, 1971.

BURLEW, B. S.; WEBER, K. T. Connective tissue and the heart functional significance and regulatory mechanism. **Cardiology Clinics**. v. 18, n. 3, p. 435-442, 2000.

BRISSIE, R. M.; SPICER, S. S.; THOMPSON, N. T. The variable fine structure of elastin visualized with verhoeff's iron hemotoxylin. **The Anatomical Record**, v. 181, p. 83-94, 1974.

CAHILL JR., G. F. Current concepts of diabetes. In: MARBLE, A.; KRALL, L. P.; BRADLEY, R. F.; CHRISTLIEB, A. R.; SOELDNER, J. S. **Joslin's diabetes mellitus**. Philadelphia: Lea & Fibiger, 1985. p. 1-11.

CARVALHO-FILHO, E. T.; CARVALHO, C. A. F.; SOUZA, R. R. Modificações das fibras do sistema elástico no envelhecimento. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 42, n. 1, p. 25-30, 1996.

CARVALHO, E. N.; CARVALHO, N. A. S.; FERREIRA, L. M. Experimental modelo f induction of *Diabetes mellitus* in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, p. 60-64, 2003.

CATTELL, M. A.; ANDERSON, J. C.; HASLETON, P. S. Age-related changes in amounts and concentrations of collagen and elastin in normotensive human aorta. **Clinica Chimica Acta**, v. 245, n. 1, p. 73-84, 1996.

CETINKAYA, F.; CAG, Y. Penicillin sensitivity among children without a positive history for penicillin allergy. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 15, p. 178-80, 2004.

COTTA-PEREIRA, G.; GUERRA-RODRIGO, F.; BITTENCOURT-SAMPAIO, S. Oxytalan, elaunin and elastic fibers in the human skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 66, p. 143-148, 1976.

COTTA-PEREIRA, G.; GUERRA-RODRIGO, F.; DAVID-FERREIRA, F. The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic and elastic-related fibers. **Stain Technology**. v. 51, n.1, p. 07-11, 1976.

COTTA-PEREIRA, G.; RODRIGO, F. G.; DAVID-FERREIRA, J. F. The elastic system fibers. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 79, p. 19-30, 1977.

CHOPARD, R. P; LUCAS, G. A.; GERHARD, R.; LOURENÇO, M. G. A histomorphological study in age related change in the elastic fiber system of the basilar artery. **Journal of Anatomy and Embryology**, v. 103, n. 4, p. 157-175, 1998.

CHOPARD, R. P.; GERHARD, R. Histomorphometrical study of the elastic fiber system in the anterior cerebral artery of man. **Arquivos de Neuro - Psiquiatria**, v. 58, n. 4, p. 1040-1046, 2000.

DANGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. São Paulo: Editora Atheneu, 2002. p. 138-141.

DEL TACCA, M.; LECCHINI, S.; TONINI, M.; FRIGO, G.M.; MAZZANTI, L.; CREMA, A. Pharmacological studies of the rabbit and human renal pelvis. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 285, n. 3, p. 209-222, 1974.

DEL TACCA, M.; CONSTANTINOU, C. E.; BERNARDINI, C. The effects of drugs on pacemaker regions of isolated rabbit renal. **European Journal of Pharmacology**, v. 71, p. 43-51, 1981.

DI DIO, Liberato J. A. **Tratado de anatomia aplicada**. São Paulo: Pólus Editorial, v. 2. 1999.

DINIZ, S. F. **Influência do *Diabetes mellitus* no processo de reparação de fraturas. Estudo experimental em ratos**. 65p. Dissertação - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

DIXON, J. S.; GOSLING, J. A. The musculature of the human renal cálices, pelvis and upper ureter. **Journal of Anatomy**, v. 135, n. 1, p. 129-137, 1982.

EAGLE, H.; NEWMAN, E.; MUSSELMAN, A. D.; ROBINSON, M.; BIRMINGHAM, M. The renal clearance of penicillins F, G, K and X in rabbits and man. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 26, n. 5, p. 903-918, 1947.

EXPERT COMMITTEE on the Diagnosis and Classification of *Diabetes mellitus*. American Diabetes Association: clinical practice recommendations. **Diabetes Care**, v. 25, p. 1-147, 2002.

FINBERG, J. P. M.; PEART, W. S. Function of smooth muscle of the rat renal pelvis-response of the isolated pelvis muscle to angiotensin and some other substances. **British Journal of Pharmacology**, v. 39, p. 373-381, 1970.

FRITSCH, H.; KÜHNEL, W. **Anatomia esplanologia: texto e atlas**. 9ª ed. rev. ampl. Porto Alegre: Artmed, 2008. 464 p.

FULLMER, H. M. Differential staining of connective tissue fibers in areas of stress. **Science**, v. 127, p. 1240-1241, 1957.

FULLMER, H. M.; LILLIE, J. The oxytalan fiber: A previously undescribed connective tissue fiber. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 6, n. 6, p. 425-430, 1958.

GARDNER, E. D.; GRAY, D. J.; O'RAHILLY, R. **Anatomia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

GAWLIK, Z. Morphological and morphochemical properties of the elastic system in the motor organ of man. **Folia Histochemica et Cytochemica**, v. 3, p. 233-51, 1965.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973. p. 1110-1144.

GOSLING, J. A.; DIXON, J. S. Functional obstruction of the ureter and renal pelvis. A histological and electron microscopic study. **British Journal of Urology**, v. 50, p. 145-152, 1978.

GRANKVIST, K.; MARKLUND, S.; TÄLJEDAL, I. B. Superoxide dismutase is a prophylactic against alloxan diabetes. **Nature**, v. 294, n. 5837, p. 158-160, 1981.

JENSEN, L. T.; HOST, N. B. Collagen: scaffold for repair or execution. **Cardiovascular Research**, v. 33, p. 535-539, 1997.

JÖRNS, A.; TIEDGE, M.; LENZEN, S.; MUNDAY, R. Effect of superoxide dismutase, catalase, chelations agents, and free radical scavengers on the toxicity of alloxan to isolated pancreatic islets *in vitro*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1300-1304, 1999.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427 p.

LACY, E. R.; SCHMIDT-NIELSEN, B. Ultrastructural organization of the hamster renal pelvis. **Journal of Anatomy**, v. 155, p. 403-424, 1979.

LERCO, M. M.; SPADELLA, C. T.; MACHADO, J. L. M.; SCHELLINI, S. A.; PADOVANI, C. R. Caracterização de um modelo experimental de *Diabetes Mellitus*, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 132-142, 2003.

LILLIE, R. D.; FULLMER, H. M. **Histopathologic technic and practical histochemistry**. 4. ed. New York: Mc Graw-Hill, 1976. 942 p.

LIU, G.; DANESHGARI, F. Temporal diabetes- and diuresis-induced remodeling of the urinary bladder in the rat. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 291, p. 837-843, 2006.

LOGRIGG, N. In vitro studies on smooth muscle of the human renal pelvis. **European Journal of Pharmacology**, v. 34, p. 293, 1975.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. **Métodos quantitativos em morfologia**. Rio de Janeiro: EDUERJ, 1995.

MELO, F. A. **Alterações da matriz extracelular na pele de cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados**. 75f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

MONNIER, V. M.; KOHN, R. R.; CERAMI, A. Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 81, p. 583-587, 1984.

MONTES, G.S. Distribution of oxytalan, elaunin and elastic fibers in tissues. **Ciência & Cultura – Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 44, p. 224-233, 1992.

MONTES, G. S. Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic systems. **Cell Biology International**, v. 20, p. 15-27, 1996.

MOORE, K. L.; DALLEY, A. F. **Anatomia orientada para clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 287-288.

NIEWOEHRNER, D. E.; KLEINERMAN, J. Morphometric study of elastic fibers in normal and emphysematous human lungs. **American Review of Respiratory Disease**, v. 115, p. 15-21, 1977.

PANIAGUA, R.; REGADERA, J.; NISTAL, J.; SANTAMARIA, L. Elastic fibers of the human ductus deferens. **Journal of Anatomy**, v. 137, p. 467-76, 1983.

PARTRIDGE, S. M.; DAVIS, H. F.; ADAIR, G. S., The chemistry of connective tissue. **Biochemistry - Journals**, v. 61, p. 11-17, 1955.

PEREIRA, K. F.; LIMA, V. M.; CONEGERO, C. I.; CHOPARD, R. P. Histomorfometria das meninges encefálicas de ratos Wistar em diferentes faixas etárias. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 11, p. 996-1002, 2010.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 665-669.

REISDOERFERER, G.; PEREIRA, K. F.; CHOPARD, R. P. Fibroelastic components of the vesicourethral junction of rats in the aging process. **International Journal of Morphology**, v. 29, n. 1, p. 214-220, 2011.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 17, p. 208-213, 1963.

REZENDE, J. M. **Fleming, o acaso e a observação. Caminhos da medicina**. 2000.

RODRIGUES, Jr. A. A.; SUAID, H. J.; FAZAN, V. P.; REIS, R. B.; COLOGNA, A. J.; TUCCI, Jr. S.; CASSINI, M. F.; FOSS, M. C.; MARTINS, A. C. P. Histologic study of urethral extracellular matrix and collagen from aging and long-term alloxan-induced diabetic male rats. **Journal Urology**, v. 77, n. 2, p. 510e6-11, 2011.

RODRIGUES, JR. A. J. **Estudo morfofuncional do sistema de fibras elásticas da fáscia transversal na região inguinal no homem em várias idades**. 1988. 74 p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.

RODRIGUES, JR. A. J.; RODRIGUES, C. J.; DA CUNHA, A. C.; JIN, Y. Quantitative analysis of collagen and elastic fibers in the transversalis fascia in direct and indirect inguinal hernia. **Revista do Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 57, n. 6, p. 265-270, 2002.

RODRIGUEZ-DE-VELASQUEZ, A.; YODER, I. C.; VELASQUEZ, P. A.; PAPANICOLAOU, N. Imaging the effects of diabetes on the genitourinary system. **RadioGraphics**, v. 15, n. 5, p. 1051-1068, 1995.

ROSS, R.; BORNSTEIN, P. The elastic fiber – The separation and partial characterization of its macromolecular components. **The Journal of Cell Biology**, v. 40, p. 366-381, 1969.

ROSS, R. The elastic fiber. A review. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 21, n. 3, p. 199-208, 1973.

ROSS, R.; FIALKOW, P. J.; ALTMAN, L. K. The morphogenesis of elastic fibers. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 79, p. 7-17, 1977.

SCHMIDT-NIELSEN, B. The renal pelvis. **Kidney International**, v. 31, n. 2, p. 621-628, 1987.

SHEEHAN, H. L.; DAVIS, J. C. Anatomy of the pelvis in the rabbit kidney. **Journal of Anatomy**, v. 93, pt. 4, p. 499-502, 1959.

SILVA, F. P. da; VELASCO, I. T. **Sepse**. Barueri, SP: Manole, 2007.

SILVERBLATT, F. J. Ultrastructural of the renal pelvis epithelium of the rat. **Kidney International**, v. 5, p. 214-220, 1974.

SMITH, P. A comparasion of the orientation of elastin fibers in the elastic laminae of the pulmonary trunk and aorta of rabbits using the scanning electron microscopy. **Laboratory Investigation**, v. 35, n. 6, p. 525-529, 1976.

SOUZA, M. H. L.; ELIAS, D. O. **Fundamentos da circulação extracorpórea**. 2. ed. Rio de Janeiro: Centro Editora Alfa Rio, 2006. p. 90-102.

SPANHEIMER, R. G.; UMPIERREZ, G. E.; STUMPF, V. Decreased collagen production in diabetic rats. **Diabetes**, v. 37, p. 371-76, 1988.

SPINOSA, H. de S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 465-471.

STANDRING, S. **GRAY'S: Anatomia**. 40. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p. 1225-1243.

SUSSER, M; SUSSER, E. **Um futuro para a epidemiologia**. In: ALMEIDA FILHO, N.; BARRETO, M. L.; VERAS, R.,P.; BARATA, R. B. (org.). Teoria epidemiológica hoje: Interfaces e tendências. Rio de Janeiro: Fiocruz/Abrasco, 1998.

TANNO, T.; YOSHINAGA, K.; SATO, T. Alteration of elastin in aorta from diabetics. **Atherosclerosis**, v. 101, p. 129-134, 1993.

THETHI, A. K.; DELLEN, R. G. V. Dilemmas and controversies in penicillin allergy. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 24, p. 445-461, 2004.

TOMA, Y.; ISHIKI, T.; KAZUFUMI NAGAHAMA, K.; KOICHIRO OKUMURA, K.; KAMIYAMA, T.; KOHAGURA, K.; KAKIHANA, A.; TANA, T.; OHYA, Y.; TAKISHITA, S. Penicillin G-induced Hemorrhagic Cystitis with Hydronephrosis. **International Medical**, v. 48, p. 1667-1669, 2009.

UVELIUS, B. Detrusor smooth muscle in rats with alloxan-induced diabetes. **Journal Urology**, v. 136, n. 4, p. 949-952, 1986.

VARGIU, R.; USAI, P.; DE LISA, A.; ARGOLAS, A.; SCARPA, R. M.; GESSA, G. L.; USAI, E.; FRASCHINI, M.; MANCINELLI, R. Vasopressin excitatory action on smooth muscle from human renal calyx and pelvis. **Pharmacological Research**. v. 50, p. 617-622, 2004.

VERHOEFF, F. H. Some new staining methods of wide applicability including a rapid differential stain for elastic tissue. **Journal of the American Medical Association**, v. 50, p. 867-877, 1908.

VIEIRA, J. G. H. **Como fazer o diagnóstico do diabetes mellitus**. Fleury, Medicina e Saúde. 2007.

VRANES, D.; COOPER, M. E.; DILLEY, R. J. Cellular mechanisms of diabetic vascular hypertrophy. **Microvascular Research**, n. 57, p. 8-18, 1999.

WATSON, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals II. Applications of solutions containing lead and barium. **The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v. 4, p. 727-30, 1958.

WEIBEL, E. R. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. **Laboratory Investigation**, v. 12, p. 131-151, 1963

WEIGERT, C. Über eine methode zur Färbung elastischer Fasern. **Zentralbl. Allg. Pathological Anatomy**, v. 9, p. 289-292, 1898.

WILLIAMS, P. L.; WARWICK, R. DYSON, M.; BANNISTER, L. H. **GRAY: Anatomia**. 37. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. p. 1329-1331.