DÉBORAH SERRA SOUSA BUI

**Papel da N-acetilcisteína, como agente protetor da membrana
peritoneal na lesão provocada por solução de diálise
hipertônica**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Nefrologia
Orientador: Prof. Dr. Hugo Abensur

São Paulo
2007

DÉBORAH SERRA SOUSA BUI

**Papel da N-acetilcisteína, como agente protetor da membrana
peritoneal na lesão provocada por solução de diálise
hipertônica**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Nefrologia
Orientador: Prof. Dr. Hugo Abensur

São Paulo
2007

AGRADECIMENTOS

Antes e acima de tudo, agradeço a Deus, meu constante guia e protetor.

Ao Prof. Dr. Hugo Abensur, meu orientador, pelo incentivo e persistência neste projeto. Seu conhecimento foi imprescindível em todos os momentos. Chegamos ao fim após termos trilhado, juntos, uma longa caminhada. A ele, minha eterna admiração.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Seguro, que forneceu a ferramenta principal, o conhecimento dos modelos experimentais, ao qual fui iniciada no LIM-12. Obrigada pelos primeiros passos.

À Dra. Maria Heloisa Shimizu – Helô -, por me ter ensinado o necessário de forma carinhosa e paciente. Agradeço-lhe principalmente pelo grande ensinamento: a ciência requer persistência.

A toda a equipe do LIM-12, com especial menção à Heloá, ao Nivaldo e à Ciça, sempre tão pacientes e incentivadores.

À minha família - meu pai, minha mãe e meus irmãos -, que tem sido um forte pilar em minha vida. Obrigada, desde o começo desta jornada. Sem seu precioso apoio, nada disso seria realidade hoje.

A meu esposo, Jelson Bui Júnior, cujo apoio recebi antes de todos. Foi ele quem sofreu o maior reflexo de minhas ausências, foi nele que encontrei o maior incentivo, não só como esposo, mas também como amigo e como médico. A vida confirma e abençoa nossas escolhas.

À Prof^a. Maria Socorro Amorim e ao Prof. Fernando Frattini Neto, colegas mestres, nefrologistas e incentivadores desta pesquisa. A confiança de ambos possibilitou minhas horas ausentes de Jundiaí.

Agradeço ao Dr. Dino Martino Filho por sua participação, que engrandeceu este projeto.

*“Não se iluda com a fábula do talento,
pois na ciência não há lugar para príncipes.
Lembre-se sempre de que gênio é trabalho”*

Vinícius Bittencourt

Normalização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise Carneiro Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Sousa Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

SUMÁRIO

Lista de ilustrações

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	16
MEMBRANA PERITONEAL.....	17
INFLAMAÇÃO.....	23
GLICOSE E PROCESSO OXIDATIVO	24
ANTIOXIDANTES E N-ACETILCISTEÍNA	27
MARCADORES DO PROCESSO OXIDATIVO.....	28
MODELOS EXPERIMENTAIS DE DIÁLISE PERITONEAL.....	29
OBJETIVOS.....	37
<i>OBJETIVOS PRINCIPAIS</i>	<i>37</i>
<i>OBJETIVOS SECUNDÁRIOS</i>	<i>37</i>
2 MATERIAL E MÉTODO.....	38
ESTUDO.....	38
ANIMAIS	38
GRUPOS DE ESTUDO.....	39
CRONOGRAMA DE SEIS SEMANAS DE ESTUDO	39
INFUSÃO PERITONEAL DE SOLUÇÃO HIPERTÔNICA.	41
GAIOLEIRO METABÓLICO.....	42
TESTE FUNCIONAL DA MEMBRANA.....	42
BIÓPSIA PERITONEAL	43
TESTES LABORATORIAIS	45
DOSAGEM DE URÉIA E GLICOSE	46
CITOLOGIA E CULTURA DA AMOSTRA DA SOLUÇÃO DE DIÁLISE.	46
SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS	46
ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	47
3 RESULTADOS.....	48
AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA MEMBRANA PERITONEAL.....	49
SUBSTÂNCIAS REATIVAS COM ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) URINÁRIO	53
HISTOLOGIA PERITONEAL:.....	55
4 DISCUSSÃO.....	57
5 CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	64

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Diagrama de Trabalho.	41
Gráfico 1 - Resultados D/P uréia dos grupos	50
Gráfico 2 - Resultados D1/D0 dos grupos	50
Gráfico 3 - Resultados de TBARS urinário dos grupos.....	54
Gráfico 4 - Resultados do TBARS plasmático dos grupos.....	55
Gráfico 5 - Resultados da medida de espessamento peritoneal dos grupos	56
Figura 1 - Medidas da Espessura parietal nos quatro grupos.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média do peso inicial, final e ganho de peso dos grupos.....	48
Tabela 2 - D/P uréia, D1/D0 e avaliação citológica do líquido peritoneal.....	51
Tabela 3 - TBARS urinário e plasmático dos grupos	54

LISTA DE SIGLAS

DP	Diálise Peritoneal
IRC	Insuficiência Renal Crônica
DPAC	Diálise Peritoneal Ambulatorial Contínua
D/P Uréia	Dialisato/Plasmático de uréia
D/D0	Dialisato (tempo) - Dialisato (inicial)
ON	Óxido Nítrico
AGEs	Produtos Avançados de Glicosilação
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
O_2^-	Superóxido
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
$^{\cdot}OH$	Radicais Hidroxilas
RAGE	Receptores de AGEs
NAC	N-acetilcisteína
MDA	Malondialdeído
TBARS	Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico
GPx	Glutathione Peroxidase
TG	Glutathione Total
GSHRx	Glutathione Redutase
SOD	Superóxido Dismutase
LIM 12	Laboratório de Investigação Médica
RL	Ringer Lactato
SDH	Solução de Diálise Hipertônica
TCA	Ácido Tricloroacético
PET	Teste de Equilíbrio Peritoneal
SPAR	Standard Peritoneal Permeability Analysis in Rabbits
SPART	Standard Peritoneal Permeability Analysis in Rats

LISTA DE SÍMBOLOS

%	valor percentual
m ²	metros quadrados
Å	Angstrom
ml/min	mililitros por minuto
mg/dl	miligramas por decilitros
mOsm/L	miliosmol por litro
ml	mililitros
cm ²	centímetros quadrados
g	gramas
ml/g	mililitros por gramas
céls/mm ³	células por milímetros cúbicos
ml/Kg	mililitros por quilogramas
mg/L	miligramas por litros
C°	graus Celsius
mg/dia	miligramas por dia
cm	centímetros
µm	micrômetros
RPM	rotações por minuto
nm	nanômetros
mg/100g.Kg/dia	miligramas por cem gramas por quilo por dia
nmols/24h	nanomoles por 24 horas
nmols/ml	nanomoles por mililitros
>	maior que
<	menor que
p.ex.	por exemplo
pH	potencial hidrogeniônico
5/6	cinco sextos
®	marca registrada
G	Gauge

RESUMO

Bui DSS. N-acetilcisteína protetora da membrana peritoneal na lesão provocada por solução de diálise hipertônica [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Em 2006, a Diálise Peritoneal representou, no Brasil, o método de tratamento de 9,3% dos pacientes com Insuficiência Renal Crônica Terminal. A terapia dialítica provoca uma lesão na membrana peritoneal de característica inflamatória, com grave desbalanço do processo oxidativo. Associa alto transporte de solutos e perda da capacidade de ultrafiltração da membrana. Vários fatores contribuem para a lesão, tais como a bioincompatibilidade das soluções de diálise peritoneal e sua elevada concentração de glicose. O objetivo do presente estudo é avaliar o efeito protetor da N-acetilcisteína na lesão provocada pelo uso de solução dialítica hipertônica em modelo experimental de diálise peritoneal. Foram estudados 22 ratos Wistar, machos, não-urêmicos, divididos em quatro grupos, sendo: um grupo-controle, não submetido à infusão de SDP; o grupo RL, que recebeu infusão diária de solução ringer lactato; o grupo SDH, que recebeu infusão de SDP e, finalmente, o grupo SDH+NAC, que recebeu infusão de SDP e tratamento com N-acetilcisteína via oral, diariamente (600mg/L). Após seis semanas, foi realizada avaliação funcional da membrana peritoneal pela relação uréia do dialisato, com uma hora de permanência na cavidade peritoneal, e plasma (D/P uréia), assim como pela razão entre a

concentração de glicose no líquido peritoneal após uma hora de permanência na cavidade e a concentração de glicose na solução de diálise infundida (G1/G0). As substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram utilizadas como marcadores no processo oxidativo. A concentração de TBARS foi avaliada em amostra de urina 24hs e dosagem no plasma. Comparada ao grupo-controle, a avaliação funcional do grupo SDH apresentou aumento do transporte peritoneal com D/P uréia de $0,67 \pm 0,1$ vs $0,46 \pm 0,05$ ($p: 0,03$) e G1/G0 de $0,27 \pm 0,07$ vs $0,44 \pm 0,08$ ($p: 0,01$), demonstrando lesão funcional importante. Quando avaliado o grupo SDH+NAC, tratado com N-acetilcisteína e o grupo não tratado SDH, foi observado maior transporte de solutos do grupo não tratado, com D/P uréia $0,67 \pm 0,1$ vs $0,51 \pm 0,1$ ($p: 0,03$) e G1/G0 de $0,27 \pm 0,07$ vs $0,35 \pm 0,06$ ($p: 0,01$). Portanto, foi constatada maior lesão de membrana comparada ao grupo tratado. Comparados ao controle, os grupos SDH e SDH+NAC apresentaram maiores concentrações de TBARS, seja pela dosagem urinária ($p: 0,002$), seja pelo TBARS plasmático ($p: 0,0001$). O grupo tratado SDH+NAC apresentou menores concentrações de TBARS, comparado ao grupo não tratado SDH, provavelmente por um efeito protetor da N-acetilcisteína. Quando avaliada a membrana peritoneal parietal, o grupo tratado apresentou menor espessamento de membrana, medido em micrômetro, em relação ao grupo não tratado ($p: 0,01$). O presente estudo sugere que a lesão da membrana peritoneal provocada pelo uso de solução dialítica hipertônica sofre uma forte influência do processo oxidativo e que o

uso contínuo de N-acetilcisteína, por via oral, pode ter efeito redutor dessa lesão.

Descritores: 1.Diálise Peritoneal 2.Estresse oxidativo 3.Acetilcisteína
4.Modelos animais

SUMMARY

Bui DSS Peritoneal membrane protecting N-acetylcysteine on lesion induced by hypertonic dialysis solution [dissertation]. São Paulo Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2007

Peritoneal Dialysis represents the modality of treatment for 9.3% of end stage renal disease patients in Brazil. During the period of treatment, the solution induced a peritoneal membrane lesion of inflammatory characteristic. Oxidative stress has been implicated in the development of endothelial damage. It associates the high transport of solutes and loss of ultrafiltration capacity of the membrane. The lesion is caused by several factors as follows: peritoneal dialysis solution incompatibility (PDS) and its increased concentration of glucose. The aim of the present study was to evaluate the N-acetylcysteine protecting effect on lesion aggravated by the use of hypertonic dialytic solution in peritoneal dialysis experimental model. Twenty two male, non-uremic Wistar rats were divided in four groups as follows: (I) control group, not submitted to PDS infusion; (II) RL group receiving daily infusion of ringier lactate; (III) HDS group, receiving PDS infusion, and; (IV) HDS+NAC group receiving PDS infusion and treated with N-acetylcysteine (600mg/L) orally. The peritoneal membrane functional evaluation was performed six weeks later by the dialysate-to-plasma urea, ratio (D/P), and glucose reabsorption determined by the ratio of glucose concentration in peritoneal fluid after one hour of solution permanence in the cavity (G1/GO). The thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were used as markers

on studying the oxidative process. The TBARS concentration was assessed in 24h sampling urine and plasmatic dosage. The functional evaluation for the HDS group showed increased peritoneal transport compared to the control group with urea D/P of 0.67 ± 0.1 versus 0.46 ± 0.05 ($p:0.03$), and G1/GO 0.27 ± 0.07 versus 0.44 ± 0.08 ($p:0.01$), demonstrating functional lesion. When evaluating the HDS+NAC group, treated with N-acetylcysteine and the HDS non-treated group, a greater transport of solutes was observed for the non-treated group, with urea D/P 0.67 ± 0.1 versus 0.51 ± 1 ($p: 0.03$), and G1/GO 0.27 ± 0.07 versus 0.35 ± 0.06 ($p: 0.01$), therefore greater lesion present on the membrane than for the treated group. Compared to the control group, the HDS and HDS+NAC presented greater TBARS concentrations either for urine dosage ($p: 0.002$) or for plasmatic TBARS ($p: 0.0001$). The HDS+NAC treated group showed lower TBARS concentrations compared to the non-treated HDS group, a probable protective effect of N-acetylcysteine on the treatment. In the treated group, peritoneal membrane demonstrate lower trickiness compared with untreated group. ($p:0,01$) The present study suggests that the peritoneal membrane lesion induced by the use of hypertonic dialytic solution undergoes strong influence from the oxidative process and that the continuous use of N-acetylcysteine can preserve these alterations by inhibiting the oxidative stress within the peritoneal membrane.

Descriptors: 1.Peritoneal dialysis 2.Oxidative stress 3.Acetilcysteine
4.Animal models

1 INTRODUÇÃO

A Doença Renal Crônica constitui grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Entre nós, a prevalência de pacientes em programas de tratamento dialítico dobrou nos últimos dez anos.¹

No Brasil, a incidência de pacientes em diálise cresce 8% anualmente.¹ Em 2006, o número de pacientes em programas de diálise foi de 70.872. Destes, 6.566 pacientes (ou seja, 9,3%), estavam em programas de diálise peritoneal (DP).²

Nos países desenvolvidos, a DP representa o método de tratamento de aproximadamente 15% dos pacientes com Insuficiência Renal Crônica (IRC) Avançada.³ A distribuição dos pacientes em diálise peritoneal ao redor do mundo não é homogênea. Existem países onde a prevalência em Diálise Peritoneal Ambulatorial Contínua (DPAC), modalidade de diálise peritoneal, chega a alcançar aproximadamente 90% dos pacientes dialíticos, como é o caso, por exemplo, do México.⁴

Apesar dos avanços que o método peritoneal vem apresentando ao longo do tempo, principalmente após introdução das máquinas cicladoras, pelos implementos nos sistemas de bolsas de diálise e sistemas fechados de troca, a sobrevida obtida por tal técnica é baixa, chegando a 50% no período de seis anos.⁵ Quando se trata da sobrevida de pacientes, encontramos dados na literatura que mostram sobrevidas semelhantes para ambos os métodos - diálise peritoneal e hemodiálise.⁶ Para subgrupos de pacientes jovens, não diabéticos, o método peritoneal parece estar

relacionado a uma melhor sobrevida, particularmente nos dois primeiros anos de tratamento.^{5,7}

Os principais fatores que limitam a sobrevida pela Diálise Peritoneal como Terapia Substitutiva Renal são as infecções peritoneais e as alterações da membrana peritoneal ao longo do tempo de tratamento, que modificam suas características de permeabilidade e sua capacidade de ultrafiltração, alterando o método.⁸

O aparecimento da lesão da membrana peritoneal está diretamente relacionado ao tempo de duração do tratamento. Sua incidência eleva-se de 3% após o primeiro ano em DPAC para 50% após seis anos, encontrando-se associada ao aumento da mortalidade desses pacientes.^{5, 7,8}

O desenvolvimento da lesão peritoneal nos pacientes em programa tem etiologia multifatorial. Os episódios de peritonites repetitivos e a bioincompatibilidade das soluções de diálise são seus principais fatores determinantes.^{5,7,8}

MEMBRANA PERITONEAL

O peritônio é uma membrana serosa que recobre a parede e órgãos da cavidade abdominal. A área de superfície peritoneal é semelhante à área de superfície corpórea do adulto, variando de 1 a 2 m².⁹

O peritônio visceral corresponde a 80% da área de superfície peritoneal total. É irrigado pela artéria mesentérica superior, e sua drenagem venosa é feita para o sistema portal. O peritônio parietal recebe sangue

através das artérias lombares, intercostais e epigástricas, drenando pela veia cava inferior.⁹

A membrana peritoneal é constituída pelo mesotélio e pelo interstício, contendo vasos sanguíneos e linfáticos. O mesotélio é composto por uma camada única de células achatadas com microvilosidades em sua superfície. Logo abaixo do mesotélio encontra-se o interstício, constituído por matriz de colágeno, onde se encontram os vasos linfáticos e capilares peritoneais.¹⁰

A membrana peritoneal caracteriza-se por ser semipermeável, possibilitando o transporte de água e pequenos solutos do sangue para a cavidade peritoneal.^{9,10} Está dividida, didaticamente, em seis níveis de resistência ao transporte peritoneal. São eles :

- uma película de líquido estagnado, que recobre o endotélio capilar peritoneal ;
- o endotélio capilar ;
- a membrana basal endotelial ;
- o interstício ;
- o mesotélio ;
- uma camada de líquido estagnado, que recobre o mesotélio.

O transporte de água e solutos do interior dos vasos para a cavidade peritoneal ocorre através de todas essas barreiras fisiológicas e anatômicas, sendo a principal delas a parede capilar peritoneal.¹¹

Os capilares contidos na membrana peritoneal são do tipo contínuo. Nestes últimos, as células endoteliais estão ligadas por junções

íntimas (“tight junction”), apresentando vesículas citoplasmáticas que podem participar no transporte de solutos. Tais vesículas formam, entre si, canais abertos através do endotélio. A superfície das células endoteliais é recoberta por um glicocálixe que acarreta eletronegatividade e funciona como uma barreira fisiológica à passagem de proteínas aniônicas.^{12,13}

O modelo de três poros explica a característica de ultrafiltração por diferentes canais na diálise peritoneal.¹⁴ Este modelo assume as dimensões de poros grandes, pequenos e ultrapequenos. Os poros grandes são representados por vesículas ou cadeias de vesículas, ou mesmo poros grandes intercelulares (raio até 250 Å), realizando transportes unidirecionais de moléculas do sangue para o peritônio. Os poros pequenos, com raio de 40 a 50 Å, são representados pelas junções intercelulares, permeáveis à maioria dos solutos pequenos e água. Os poros ultrapequenos, por sua vez, com raio de 3 Å, chamados aquaporinas endoteliais¹⁴, permitem apenas a passagem de água.

A aquaporina tipo 1 é a estrutura responsável por parte da passagem de água através da membrana. Alterações nessa proteína estão associadas à falha de ultrafiltração na diálise peritoneal.

O transporte através da membrana peritoneal acontece pelo processo de difusão, ultrafiltração e absorção linfática. No primeiro processo, os solutos urêmicos e o potássio difundem-se do capilar peritoneal para a solução de diálise, obedecendo a um gradiente de concentração, enquanto que glicose, lactato e cálcio difundem-se em direção oposta.¹¹ No segundo processo, ultrafiltração, a hiperosmolaridade da solução de diálise leva à

passagem de água e solutos através da membrana. No terceiro processo, a absorção de água e solutos é feita principalmente pelos linfáticos diafragmáticos.^{15,16} Ocorre simultaneamente aos processos de difusão e ultrafiltração, sendo responsável pela absorção de 1ml/min de líquido da cavidade em adultos.¹⁷

O grau de vascularização do peritônio, a distribuição dos capilares e sua proximidade ao mesotélio representam características principais para se determinar a área de superfície peritoneal efetiva para trocas. Quanto maior o número de capilares e mais próximos do mesotélio, menor a distância que água e solutos terão a percorrer até a superfície dos capilares. Não há uniformidade na distribuição dos capilares no peritônio, sendo bastante variável em número, inclusive dentro de uma mesma espécie.^{18,19}

A capacidade de transporte peritoneal pode ser avaliada utilizando-se relações de equilíbrio de solutos permeáveis entre o dialisato e o plasma.

As relações medem o efeito combinado dos processos de difusão e ultrafiltração. Poderá aqui ocorrer influência do peso molecular do soluto estudado, pela permeabilidade da membrana e pela área de superfície peritoneal efetiva para trocas.^{13,14}

Apresentar alta capacidade de transporte peritoneal significa alcançar mais rapidamente o equilíbrio completo de solutos entre os compartimentos peritoneal e plasmático. Significa ter um aumento da área efetiva de troca peritoneal, à custa de aumento do número de pequenos poros e capilares peritoneais, como observado nos processos inflamatórios.

A relação Dialisato/Plasmático de uréia ou creatinina representa tal processo. Quando se avalia o transporte de glicose através da membrana, ou seja, o rápido equilíbrio entre compartimentos, é constatada perda de glicose da solução dialítica para o compartimento plasmático, com conseqüente perda da força osmótica para ultrafiltração. Uma baixa relação Dialisato (tempo 2) - Dialisato (inicial) D/D_0 de glicose significa perda da capacidade de ultrafiltração, podendo até mesmo significar aumento da área de superfície peritoneal efetiva.^{14,16}

Menor capacidade de transporte representa equilíbrio mais lento de solutos, significando baixa permeabilidade ou menor área de superfície peritoneal. Observam-se menores relações de uréia e creatinina e alta relação de glicose D/D_0 .

A área de superfície peritoneal reflete a capacidade de transporte peritoneal. A média da variação dessa superfície intra-individual é de 7%, medidos pelo MTAC de creatinina em pacientes estáveis em Diálise Peritoneal Ambulatorial Crônica.¹⁸

A área de superfície peritoneal efetiva pode se apresentar aumentada em situações tais como: ocorrência de peritonite,¹⁹ administração intraperitoneal de vasodilatadores (p.ex. nitroprussiato)²⁰ e na falência de ultrafiltração tardia em pacientes de DPAC.¹⁰

Na peritonite, ocorre vasodilatação causada pelo aumento de mediadores inflamatórios locais, como prostaglandinas E2 e interleucinas-6,^{21,22} além de aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial, isoforma endotelial da enzima que sintetiza óxido nítrico (ON) a

partir de seu precursor L-arginina. Em termos moleculares, o ON parece exercer papel fundamental na reatividade, no tônus vascular e interação com fatores de crescimento, influenciando na neoangiogênese. Esta condição representa um processo agudo e parcialmente reversível, após tratamento da infecção. Também é aguda a vasodilatação provocada pela infusão de nitroprussiato intraperitoneal.²⁰ A condição mais importante, com maior impacto na terapia dialítica, por alterar de forma irreversível a capacidade de transporte e ultrafiltração da membrana, é a falência tardia de ultrafiltração, provocada pelo aparecimento da inflamação peritoneal ao longo do tratamento. Histologicamente, a membrana peritoneal apresenta-se com aumento do número de capilares, neoangiogênese, duplicação e espessamento de membrana basal capilar, deposição de colágeno IV e proliferação de matriz extracelular.¹⁹ A relação direta entre o tempo de tratamento e o tempo de surgimento das lesões sugere que o principal fator etiológico envolvido seja a exposição do peritônio às soluções dialíticas bioincompatíveis com a membrana. A bioincompatibilidade das soluções dialíticas constitui um dos principais fatores lesivos à membrana.^{23, 24}

A incompatibilidade das soluções dialíticas é devida ao baixo pH (5,5); à presença do tampão Lactato; à elevada concentração de glicose (1500-4250mg/dl); à elevada osmolalidade (334-486 mOsm/L) e aos produtos de degradação da glicose (aldeídos), gerados a partir da esterilização a quente dos fluidos. A elevada concentração de glicose parece ser a causa mais importante de toxicidade para a membrana peritoneal, com

deposição de produtos finais de glicosilação ao longo do tempo de programa.^{23,24}

INFLAMAÇÃO

A lesão da membrana peritoneal caracteriza-se por ser inflamatória, com denudação de células mesoteliais, neoangiogênese, vasodilatação, espessamento de membrana basal, com surgimento de fibrose intersticial e hialinização da parede vascular.¹⁹ Foi demonstrada, através de estudos imunohistoquímicos, presença de importantes fatores de crescimento na membrana, aumento da geração de citocinas, IL-6, VEGF,²¹ TGF- β pelas células mesoteliais e macrófagos, Colágeno tipo 4 e CA 125.²²

A glicose hipertônica das soluções de diálise e os produtos avançados de glicosilação (AGEs), gerados a partir do metabolismo da glicose, são provavelmente os fatores mais importantes envolvidos na etiologia da lesão.^{25,26} Já foi descrito o acúmulo de produtos avançados da glicosilação em tecidos peritoneais, especialmente em paredes de capilares.²⁷ Dados experimentais demonstraram, em modelo de diálise peritoneal, com duração de quatro semanas, que a glicose é mais tóxica às células mesoteliais do que o baixo pH, o lactato e a hiperosmolaridade das soluções de diálise.²⁸

As lesões histológicas dos capilares peritoneais assemelham-se às lesões diabetiformes da microangiopatia diabética. Fatores de crescimento VEGF e TGF β , moléculas importantes na lesão microvascular

diabética, foram observados também no efluente peritoneal., com provável produção local de VEGF. ^{25,26}

Além do mecanismo inflamatório, o desbalanço do sistema oxidativo tem sido apontado no desenvolvimento de lesões estruturais, endoteliais e de membrana em pacientes com Insuficiência Renal Crônica e naqueles em tratamento substitutivo, seja hemodiálise ou diálise peritoneal.

GLICOSE E PROCESSO OXIDATIVO

O processo oxidativo é o resultado do desbalanço entre a geração de espécies oxidantes e a diminuição da defesa antioxidativa. Implica na patogênese de várias doenças, incluindo aterosclerose, diabetes, insuficiência renal, anemia, hemocromatose, injúria da isquemia de reperfusão, artrite reumatóide e no processo fisiológico do envelhecimento.

29

Evidências sugerem o envolvimento da geração de radicais livres na fisiopatogenia da lesão inflamatória da membrana peritoneal. ³⁰

Muitas vias são responsáveis pelo aumento do processo oxidativo e geração de radicais livres: a formação dos AGEs, a peroxidação lipídica, principalmente da LDL pequena e densa, a atividade poliol alterada e o desequilíbrio redox. ^{30,31,32}

Radical Livre é toda espécie química que contém um ou mais elétrons não pareados ocupando orbitais atômicos. São instáveis e reagem a diversos componentes protéicos e estruturas moleculares. ²⁹ O oxigênio

pode dar origem a diversas espécies reativas, chamadas Espécies Reativas do Oxigênio (EROs), incluindo radicais livres e espécies não radicalares. Na redução do oxigênio à água, ocorre a formação do radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxilas.

(-OH), que interagem no sistema redox ²⁷.

As membranas celulares são compostas de ácidos graxos poliinsaturados. Suas características físico-químicas estão relacionadas à presença de cadeias insaturadas de fosfolipídios e colesterol. As EROs, reagindo com esses compostos lipídicos, retiram um átomo de hidrogênio do grupo metileno das cadeias de ácido graxo poliinsaturado e dão início ao processo de peroxidação lipídica. Os radicais formados reagem com o oxigênio e formam radicais peroxilas, propagando a cadeia da peroxidação lipídica. Átomos de hidrogênio são abstraídos, formando hidroperóxidos e novos radicais de carbono. ²⁹

A reatividade com lipoproteínas circulantes de baixo peso desencadeia o processo de aterosclerose e a formação de placas nos vasos.

³¹ Na insuficiência renal, o aumento da peroxidação lipídica parece ser um dos mecanismos responsáveis pelo elevado índice de complicações cardiovasculares desse grupo. ³²

No diabetes, o processo oxidativo resulta das alterações metabólicas advindas da hiperglicemia e da glicação não-enzimática de proteínas, gerando produtos avançados da glicosilação (AGEs). ³³ Tais compostos apresentam atividade redox e interagem com proteínas plasmáticas e lipídicas, contribuindo para a catalisação da peroxidação

lipídica.³⁰ Este é o mecanismo que ocasiona elevado risco de alterações ateroscleróticas no diabetes.

No diabetes mellitus, os cofatores da síntese de óxido nítrico encontram-se reduzidos pelo aumento de seu consumo. Sua via de recuperação, através da fosfato-pentose, fica bloqueada pela hiperglicemia.

O metabolismo da glicose acontece, em parte, pela via poliol, na qual a glicose é metabolizada em sorbitol. Tal reação, acoplada à oxidação de NADPH para NADP+, gera o aparecimento de mais radicais livres.^{29, 31,33}

Na Diálise Peritoneal Crônica, a exposição da membrana peritoneal a soluções com elevadas concentrações de glicose e a produtos de degradação da glicose geram lesões semelhantes às do diabetes.

A glicose das soluções dialíticas aumenta a geração de AGEs intraperitoneal.^{30,33} Parte das alterações inflamatórias e estruturais relacionadas à ação dos AGEs são mediadas via receptores de AGEs (RAGE) em membrana mesotelial.³⁵ Ratos RAGE *knock out* apresentaram menor lesão peritoneal quando expostos a uma solução dialítica hipertônica glicosada, em comparação a controles submetidos à mesma exposição.³⁶ Foram identificados receptores de superfície para os AGEs que podem ativar funções inflamatórias nas células endoteliais, musculares lisas e macrófagos, havendo aumento concomitante do estresse oxidativo de forma sistêmica.^{30, 35}

Previamente à infusão intraperitoneal da solução de diálise na cavidade peritoneal, parte da glicose é transformada em compostos reativos, aldeídos, metilglioxal, glioxal e 3-glioxiglucosone, ainda durante a

esterilização a quente do fluido.^{34, 37} O nível de compostos carbonados é elevado no efluente peritoneal, sugerindo também sua produção intraperitoneal. Referidos compostos atuam como radicais livres, agindo sobre a membrana.³⁸

O aumento da glicose peritoneal de forma crônica acarreta, ainda, diminuição da disponibilidade de cofatores da síntese de óxido nítrico, como oxigênio, cálcio, calmodulina e fosfato dinucleotídeo adenina nicotinamida (NADPH).²⁹ A glicose hipertônica das soluções parece ser o fator mais importante na vasodilatação em capilares peritoneais, se comparada ao pH ácido e à presença de lactato²⁸.

ANTIOXIDANTES e N-ACETILCISTEÍNA

O determinante do processo oxidativo é o desbalanço entre a geração de substâncias reativas oxidantes e a presença das assim chamadas substâncias antioxidantes, que a ele se contrapõem.

Os antioxidantes podem ser intracelulares (glutathione, superóxido dismutase, catalase, peroxidases), ou agirem em membrana celular como betacaroteno, flavonóides e as vitaminas C e E.²⁹

O antioxidante endógeno mais importante é a glutathione peroxidase, forma reduzida que, ao reagir com os radicais, forma glutathione oxidada e água. A glutathione peroxidase atua sobre os peróxidos de lipídeos e sobre a água oxigenada (H_2O_2), reduzindo-os. A degradação da H_2O_2 origina radical hidroxila ($OH^\cdot$), iniciador da peroxidação lipídica. No estresse

oxidativo, ocorre redução da atividade do sistema da glutathione – antioxidante.^{29, 31, 32}

A N-acetilcisteína (NAC) é um tiol, composto precursor da L-cisteína e glutathione reduzida nas células.³⁹ É uma fonte de grupos sulfidril e removedores de substâncias reativas com o oxigênio (OH-e H₂O₂), geradas pela reação dos peroxinitritos, como NO e superóxidos. A NAC tem demonstrado efeito protetor na disfunção endotelial e inflamação, no tratamento pela desintoxicação ao paracetamol e na diminuição da lesão provocada pelo tempo de isquemia do enxerto e dos níveis de malondialdeído (MDA) em pacientes renais crônicos.³⁹

A N-acetilcisteína (NAC) tem sido empregada na proteção renal em modelos animais de insuficiência renal aguda isquêmica, em estudos da lesão por contraste iodado, pelo uso de drogas nefrotóxicas e na insuficiência renal crônica.^{40,41,42,43,44} Tem sido demonstrado, em modelos animais, que o uso da N-acetilcisteína pode estar relacionado ao menor aparecimento de lesões funcionais e estruturais em membranas peritoneais.

37

Outros agentes com características antioxidantes têm demonstrado preservação estrutural e funcional da membrana, como trimetazidine⁴⁵ e bloqueadores do receptor de angiotensina II, piridoxamina, vitaminas C e E.^{45,46,47}

MARCADORES DO PROCESSO OXIDATIVO

Os compostos oxidantes são elementos altamente reativos, tendo como meia vida apenas alguns segundos. Por este motivo, sua determinação *in vivo* não é viável.⁴⁸

Contudo, os lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos, após serem oxidados, têm sua meia vida em torno de horas ou semanas, funcionando como marcadores do processo oxidativo mais estáveis e mensuráveis, como as espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).⁴⁹

O malondaldeído é um aldeído de cadeia curta, sendo um dos compostos medidos pela reação com o ácido tiobarbitúrico. A formação do malondaldeído ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídios. Sua concentração tem sido usada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, em células e tecidos.⁴⁹

O processo oxidativo tem sido estudado através da concentração de várias substâncias marcadoras, tais como: espécies reativas derivadas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione Total (TG), Glutathione Redutase (GSHRx), Superóxido Dismutase (SOD) ou associação com metais como selênio, cobre e zinco.^{48,49,50}

A concentração de TBARS tem sido utilizada como marcador de oxidação tecidual, seja pela facilidade do método de mensuração, seja pela boa correlação com o processo de peroxidação. A concentração urinária é o método de escolha para avaliação em modelos animais.⁵⁰

MODELOS EXPERIMENTAIS DE DIÁLISE PERITONEAL

Nas últimas duas décadas, o desenvolvimento dos modelos experimentais em diálise peritoneal possibilitou modificações importantes na compreensão de mecanismos fisiológicos, no estudo da biocompatibilidade da membrana e nas intervenções terapêuticas do tratamento de diálise peritoneal.

Existe uma publicação de modelos experimentais em ratos e suínos Quinea-piggs que datam de 1975, apresentando método de infusão intraperitoneal com duração de 48 horas.⁵¹

Somente nas últimas décadas parece ter havido avanços significantes nos modelos de pesquisa para diálise peritoneal. Um grande número de publicações foi alcançado em diferentes grupos, principalmente na Europa, Canadá e Japão, particularmente direcionados ao estudo do impacto da biocompatibilidade em novas soluções dialíticas e das alterações morfológicas e funcionais da inflamação.

No Brasil, ainda não existem publicações de modelos experimentais de diálise peritoneal.

Os modelos atuais apresentam grandes variações em seus protocolos. Diferentes condições de estudo encontram-se associadas, como por exemplo: tempo de duração do modelo, espécime estudado, tipos de acessos peritoneais, variáveis volumes de infusão intraperitoneal, profilaxias antimicrobianas, diferentes critérios para caracterização de processos infecciosos e obtenção de amostras peritoneais parietais e viscerais, dentre outras condições.

A maioria dos estudos é realizada em ratos Wistar e Spragle-Dowley. Existem, igualmente, modelos de diálise peritoneal elaborados em camundongos, cobaias, cachorros e coelhos.^{51, 52}

Os camundongos são animais de difícil manipulação, devido a seu pequeno porte, principalmente para uso de cateteres e punções. Os coelhos apresentam, como vantagem, longevidade maior que a dos ratos e a razão da superfície corpórea e área de superfície peritoneal semelhantes à dos humanos, possibilitando infusão de maior volume intraperitoneal. No entanto, apresentam a desvantagem de serem animais com difícil adaptação às condições de criadouro.^{50, 53} O mesmo ocorre também em relação aos suínos e caninos.

Os modelos em ratos mostraram-se inadequados para o estudo envolvendo icodextrina, como agente osmótico intraperitoneal, devido à elevada degradação ocorrida pelos altos níveis de amilase intraperitoneal de sua espécie.⁵⁴

Os modelos podem ser caracterizados como não-urêmicos e urêmicos. Nos modelos urêmicos, os ratos são submetidos a nefrectomia unilateral e ablação renal a 5/6, previamente ao início do período de infusões. Sua dificuldade constitui-se na necessidade de sobrevida a longo prazo. Alguns modelos europeus relatam sobrevida de oito semanas dos espécimes urêmicos em diálise peritoneal.⁵⁵

De forma geral, o tempo de duração dos modelos varia entre quatro e vinte semanas.^{56,58} A duração do experimento correlaciona-se ao tempo necessário ao aparecimento das lesões peritoneais. O surgimento de

neovascularização, infiltrado celular perivascular e denudação mesotelial tem sido observado precocemente nos modelos com ratos não-urêmicos.

^{57, 60}

Na prática, os modelos de diálise também podem ser classificados em modelos com sistema peritoneal aberto e fechado. A diferenciação se dá pelos métodos que expõem ou não o peritônio ao meio externo. Os modelos abertos utilizam cateteres intraperitoneais tunelizados, para infusão diária de solução. Nos modelos fechados, a infusão de solução é realizada através de punções diárias na parede abdominal ou através de cateteres intraperitoneais tunelizados, com bolsa subcutânea implantada no dorso do animal, para acesso através de punção, mantendo o sistema fechado. São chamados Rat-o-Port®. ⁶⁰⁻⁶³

O número de infusões intraperitoneais diárias também é variável. Poucos modelos utilizam duas ou mais infusões ao dia. Em sua maioria, prevalece uma infusão única, com período médio de duração de 8 a 12 semanas. ⁵⁸⁻⁶² Os modelos que utilizaram duas infusões diárias, em período de oito semanas, apresentaram resultados semelhantes quando comparados aos modelos que realizam infusão única diária no período de dezesseis semanas.

O volume de solução para infusão intraperitoneal, por punção, varia entre 10, 20 e 25 ml. ⁶⁰

Em ratos com peso até 350 g., a área de superfície peritoneal é, em média, de 600cm². ⁵⁵ Neste caso, o volume de infusão calculado para o rato é de até 70-100ml. Para que não haja interferência no desempenho

respiratório do animal, o volume tolerável situa-se entre 30 - 40 ml. Sabe-se ainda que grandes infusões são responsáveis pelo aparecimento de lesões mesoteliais agudas. O volume para infusão adotado na maioria dos protocolos varia entre 10 e 20 ml, ou 3ml/100g.

Os modelos que realizam punção peritoneal utilizam agulhas de 22 a 26 gauge. Essa técnica apresenta a desvantagem de não permitir acesso à coleta do líquido efluente, sem abertura cirúrgica da cavidade peritoneal, pois todo o volume infundido é absorvido pela cavidade. A punção peritoneal diária é realizada sob anestesia, na tentativa de evitar punção acidental de alças, bexiga, vísceras abdominais e hematomas de parede, propiciando infecções peritoneais indesejáveis para o estudo. O uso local de anestésico parece influenciar a permeabilidade peritoneal quando avaliado através do clearance de uréia e inulina *in vitro*.⁶⁵

Os cateteres intraperitoneais experimentais surgiram com três diferentes intuitos: diminuir as complicações secundárias às punções peritoneais, obter acesso aos líquidos efluentes e facilitar os processos de infusão. São implantados previamente ao início das infusões, com intervalo de uma semana para sua utilização, e mantidos sob instilação diária de solução fisiológica, para evitar a obstrução, enquanto é aguardada uma cicatrização no implante peritoneal. O implante do catéter peritoneal por si só induz alterações mesoteliais inflamatórias, que podem durar até um mês.^{57,58} Modelos abertos com cateteres peritoneais apresentam, em média, duração de 20 semanas. Como freqüente complicação, observa-se a obstrução do

acesso pelo omento, fibrinas ou infecções peritoneais. O aparecimento das complicações é proporcional ao tempo de duração do modelo.^{66,67}

As principais complicações referentes ao uso de cateteres são a obstrução e tamponamento pelo omento, impedindo seu funcionamento adequado. Alguns pesquisadores fazem omentectomia previamente às infusões, associando heparina ao preenchimento do lúmen do cateter.^{68,69}

A ocorrência de peritonite é uma grave complicação associada aos modelos. A peritonite induz o aparecimento de lesões na membrana peritoneal, semelhantes às estudadas nos processos inflamatórios crônicos, inviabilizando sua diferenciação histológica e funcional na membrana e comprometendo a interpretação dos resultados. A peritonite altera o transporte de solutos, através do aparecimento de capilares na membrana, proporcionando vasodilatação. Conseqüentemente, ocorre aumento do número de poros pequenos e ultrapequenos, gerando aumento do transporte de soluto e água através da membrana.⁶⁹ O diagnóstico de peritonite é realizado através da identificação de microorganismos na cultura do líquido peritoneal e aumento de contagem celular, com predomínio polimorfonuclear.^{69,70}

A celularidade peritoneal dos ratos é mais elevada que a do homem. Os modelos estudados têm demonstrado níveis celulares tão elevados quanto 3500 células/mm³, sem ocorrência associada de infecção.^{57, 58} Não há critério estabelecido experimentalmente, ou adotado unanimemente, para determinação da celularidade peritoneal normal para os ratos. Grande parte dos trabalhos adota a contagem celular ideal no rato

como menor que 1000 células/mm³.^{54,57,59,60} Faltam, contudo, dados que comprovem este parâmetro. Alguns fatores modificam a contagem celular do líquido peritoneal, como, por exemplo, a quantidade de líquido infundido, o tempo de permanência da solução na cavidade intraperitoneal e associação com trauma mecânico, como cateteres e punções.^{57,59}

A associação de antibióticos de forma profilática aos modelos diminuiu a incidência de peritonite. São usadas comumente associações antibióticas via intraperitoneal: cefazolina, gentamicina, oxacilina e vancomicina, fracionadas de acordo com o peso do animal. Não se evidenciou qualquer alteração peritoneal decorrente do uso desses antibióticos.^{57,68,68, 70}

Novos marcadores de infecção estão surgindo como critério para identificação de peritonite, como a albumina e alfa-2-macroglobulina.⁷¹

A amostra peritoneal a ser obtida para avaliação histológica também constitui assunto controverso no estudo dos modelos animais. A avaliação do peritônio parietal e visceral em humanos submetidos à diálise peritoneal mostra que o peritônio parietal expressa alterações inflamatórias de forma mais pronunciada. Portanto, torna-se preferível para biópsias e análises. Nos modelos animais, principalmente em ratos, não se pode fazer a mesma afirmativa. No peritônio visceral, a avaliação histológica pode diferenciar, apresentando diferentes graus de lesões na dependência do segmento do tubo intestinal a ser avaliado.^{59-61, 62}

Pode-se afirmar a necessidade urgente de se estabelecer consensos entre os diferentes modelos de diálise peritoneal disponíveis.

Infelizmente, o número de questões ainda é grande. A reprodutibilidade da lesão funcional e histopatológica da membrana peritoneal necessita de substratos clínicos comparativos nos quais se apóie a pesquisa de terapias racionais.

Esse estudo pretende avaliar o processo oxidativo causado pelo uso de soluções hipertônicas dialíticas peritoneais através da dosagem das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico urinário, além de avaliar o possível papel protetor da N-acetilcisteína na lesão da membrana peritoneal em um modelo experimental de infusão peritoneal de solução de diálise peritoneal em ratos, em período com duração de oito semanas.

OBJETIVOS

OBJETIVOS PRINCIPAIS

Avaliar o efeito da N-acetilcisteína como agente protetor antioxidante sobre as alterações do padrão de transporte peritoneal de solutos e alterações histopatológicas da membrana peritoneal de ratos, submetidos à infusão intraperitoneal diária, de solução de diálise hipertônica, no período de oito semanas.

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Desenvolver, em nosso meio, um modelo experimental em ratos Wistar, para o estudo das alterações da membrana peritoneal na situação de diálise peritoneal.

2 MATERIAL E MÉTODO

ESTUDO

Estudo prospectivo, aleatorizado, em ratos Wistar, com duração de 6 semanas, implantado no Laboratório de Investigação Médica - LIM 12, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período de fevereiro de 2004 a fevereiro de 2007.

Este estudo foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa em Animais - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

ANIMAIS

Foram estudados 22 ratos Wistar, machos, cedidos pela Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os espécimes pesavam, inicialmente, entre 250-300g. Não eram urêmicos e foram mantidos em gaioleiro. Receberam dieta basal padronizada do LIM-12, em temperatura ambiente, com total liberdade de acesso ao bebedouro. Para o presente estudo, os animais foram divididos em quatro grupos.

GRUPOS DE ESTUDO

Grupo 1 (Controle - CONT): 4 ratos – grupo-controle, não submetido à infusão intraperitoneal.

Grupo 2 (Ringer Lactato - RL): 4 ratos - receberam infusão diária de solução Ringer Lactato (Anexo 2) - 30ml/Kg.

Grupo 3 (Solução de Diálise Hipertônica - SDH): 7 ratos - receberam infusão diária de solução hipertônica 3,86% (Anexo 3) - 30ml/Kg.

Grupo 4 (N-Acetilcisteína - SDH+NAC): 7 ratos - receberam infusão diária de solução de diálise hipertônica 3,86% - 30ml/Kg + N-acetilcisteína (600mg/L) na água que bebiam.

CRONOGRAMA DE SEIS SEMANAS DE ESTUDO

Foi realizada pesagem diária dos quatro grupos. A solução a ser infundida, ringer lactato (ou solução dialítica hipertônica a 3,38%) foi aquecida a 37C° em banho-maria, acrescida de antibiótico e fracionada de acordo com o peso do animal.

Após anestesia do animal e assepsia abdominal, foi realizada, uma vez ao dia, a punção da cavidade peritoneal, no quadrante inferior direito. No tempo de seis semanas de infusão diária, foi obedecido intervalo de 48 horas após a última punção, e realizada coleta de urina 24h. em gaioleiro metabólico. Após a coleta de urina 24h., foi realizado teste

funcional da membrana peritoneal. Foi aplicada anestesia para coleta de amostras do líquido peritoneal, via laparotomia. Foram colhidas amostras de sangue, por punção cardíaca, e biópsia do peritônio parietal a céu aberto. O animal foi, então, sacrificado com anestésico em excesso.

Quadro 1 - Diagrama de Trabalho.

INFUSÃO PERITONEAL DE SOLUÇÃO HIPERTÔNICA.

A infusão diária de solução dialítica (ou ringer lactato a 30mL/Kg, a 37°C) era realizada por punção peritoneal com agulha 26 gauge, uma vez ao dia, sob anestesia, na parede abdominal inferior direita, após tricotomia local e assepsia com degermante clorexidine 2% . A pesquisadora sempre tomou o cuidado de fazer uso de máscara facial, além de ter se precavido com lavagem das mãos e troca de todo o material estéril em cada punção efetuada. À solução peritoneal infundida foram acrescentadas, diariamente, gentamicina 0,04mg/d e oxacilina 2,5mg/d de forma profilática. O mesmo não ocorreu, entretanto, em duas ocasiões: no dia da realização do teste funcional e no momento da coleta das amostras para análise laboratoriais, conforme protocolo.

GAIOLEIRO METABÓLICO

A coleta de urina 24h. teve como finalidade a dosagem de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico - TBARS urinário -, utilizado como marcador do processo oxidativo no estudo.

Os animais foram levados ao gaioleiro metabólico individualizado, com livre acesso ao bebedouro provido de água, e estando eles com cavidade abdominal vazia. Portanto, sem infusão intraperitoneal de líquido por 24h.

TESTE FUNCIONAL DA MEMBRANA

A avaliação funcional da membrana peritoneal foi realizada por meio do estudo do transporte peritoneal de uréia e glicose. A relação da uréia estudada ateu-se à sua concentração no líquido peritoneal após uma hora de permanência da solução de diálise hipertônica a 2,27% na cavidade (D Uréia) e à sua concentração plasmática (P Uréia) na mesma hora. Isso está expresso na relação D/P Uréia. A D/P de Uréia aumentada significa maior transporte peritoneal, refletindo um rápido equilíbrio difusional entre soluções e solutos, e maior lesão de membrana.

A relação de glicose estudada foi realizada através de sua concentração no tempo zero, ou seja, concentração da glicose na solução de diálise peritoneal a 2,27% e a concentração de glicose no líquido peritoneal após uma hora de permanência na cavidade. Isso está expresso

na relação D1/D0. A diminuição da relação D1/D0 correlaciona-se a um decaimento maior da concentração de glicose na cavidade peritoneal, com dissipação maior do gradiente osmótico e menor ultrafiltração, refletindo uma membrana peritoneal inflamada e hipervascularizada, com maior número de poros pequenos. A avaliação da relação da uréia, como marcador funcional da membrana peritoneal, é preferível à creatinina em ratos não-urêmicos. O baixo valor da creatinina dosada nesses animais e a interferência metodológica da glicose podem ocasionar erros de mensuração. Da mesma forma, não seria apropriado aumentar o tempo de permanência da solução na cavidade peritoneal (superior a 1 hora), pois, no rato Wistar, em particular, ao término de 2 horas, a concentração da uréia na solução dialítica encontra-se praticamente em equilíbrio com a concentração plasmática.

Não foi realizada medida de ultrafiltração por não ser possível realizá-la com o emprego de métodos peritoneais de acesso fechado.

BIÓPSIA PERITONEAL

Foi aberta a cavidade peritoneal na linha mediana, e realizada biópsia do peritônio parietal esquerdo, a mais ou menos 2 cm., contralateralmente ao local das punções diárias.

As amostras peritoneais foram imersas em formalina a 10% e encaminhadas ao Hospital São Joaquim, da Real e Benemerita Sociedade Portuguesa de Beneficência, São Paulo. Foi avaliada a espessura da

membrana peritoneal parietal medida em micrômetros em avaliação óptica e calculadas as médias das mensurações em cada grupo.

O processamento do material para exame histológico foi realizado no Laboratório de Patologia do Hospital São Joaquim (CIP - Centro Integrado de Patologia). O tecido obtido foi fixado em solução de formalina a 10%, por um período mínimo de 24 horas. Para o exame de microscopia óptica, após a fixação dos fragmentos, estes foram desidratados, diafanizados, embebidos em parafina e cortados na espessura de 2 a 3 micra. Os cortes foram corados por hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson.

A documentação fotográfica foi realizada no Departamento de Ciências Patológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, através de equipamento digital Zeiss, modelo AXIOSKOP 40, acoplado à câmera digital Sony Cyber Shot, 3,3 mega pixel. Utilizando-se o programa Carl Zeiss Vision Imaging Systems - Axio Vision 3.0, através de documentação fotográfica, foram analisadas imagens das lâminas peritoneais capturadas ao acaso, em quatro campos (conforme fotos), sendo três em preparados histológicos corados pela Hematoxilina & Eosina, e um corado pelo tricrômico de Masson. Em cada foto foram realizadas três medições, em locais aleatórios. No total, foram obtidas 12 medidas de espessura peritoneal para cada amostra de cada espécime. Foram avaliadas a média das 12 medidas obtidas para cada espécime, e também a média de cada grupo.

TESTES LABORATORIAIS

DOSAGEM DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS COM ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

As concentrações urinárias de TBARS foram determinadas utilizando-se o método colorimétrico do ácido tiobarbitúrico. As amostras de urina foram diluídas em água destilada, onde foi adicionado 1 ml. de ácido tricloroacético (TCA) a 17.5%. Em seguida, foi agregado 1 ml. de ácido tiobarbitúrico a 0,6%, pH 2. As amostras foram colocadas em banho de água fervente por 15 minutos, e resfriadas a seguir. Após isso, foi adicionado a esta mistura 1 ml. de TCA a 70%, com incubação por 20 minutos. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 2000 RPM, e a densidade óptica do sobrenadante lida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 543 nm, contra reagente branco. A concentração dos produtos da peroxidação lipídica foi calculada pelo coeficiente de extinção molar equivalente para malondialdeído (MDA-equivalente), de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (utilizado para o complexo malondialdeído e ácido tiobarbitúrico). Os níveis de TBARS urinário foram expressos em nanomoles/24h. A medida da concentração do TBARS plasmático seguiu a mesma metodologia aplicada à dosagem urinária, expressa em nanomoles/ml.

DOSAGEM DE URÉIA E GLICOSE

As dosagens de uréia e glicose, sanguíneas e peritoneais, foram realizadas por espectrofotometria, através do Kit Labtest. (LIM-12 / FM-USP).

CITOLOGIA E CULTURA DA AMOSTRA DA SOLUÇÃO DE DIÁLISE

A avaliação do líquido peritoneal foi realizada no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com a finalidade de avaliar a ocorrência de infecção desenvolvida no período das infusões.

Foi realizada citologia quantitativa e diferencial de cada amostra, assim como cultura para bactérias, com identificação de espécies, quando possível.

Não foram realizados antibiogramas nas amostras com crescimento positivo ou análise quantitativa do crescimento bacteriano.

SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Após a finalização dos experimentos propostos, os animais foram sacrificados com injeção endovenosa de anestésico em excesso - pentobarbital sódico.

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os dados foram analisados utilizando-se análise de variância – ANOVA e pós-teste *Newman-Keuls multiple comparison* pelo programa de estatística GRAPHPAD (versão 3.0). Os resultados foram apresentados com média $\pm$ desvio padrão, sendo considerado significativo $p < 0.05$.

3 RESULTADOS

Grupos de animais-controle (CONT), ringer lactato (RL), solução hipertônica dialítica (SHD) e solução hipertônica dialítica +

N-acetilcisteína (SHD+NAC) avaliados após seis semanas de tratamento:

PESO CORPÓREO:

A TABELA 1 mostra as médias ($\pm$ DP) do ganho de peso corpóreo (diferença entre peso final e inicial), expressas em gramas, semelhantes entre os grupos ($p=0,2$).

A média do peso inicial dos grupos foi de 240,75 g., e do peso final foi de 348,39 g., para espécimes da mesma idade.

Tabela 1 - Média do peso inicial, final e ganho de peso dos grupos

GRUPOS	PESO INICIAL (g)	PESO FINAL (g)	Δ PESO (g) *
CONT	248,2	340,7	92,5 $\pm$ 10,8
RL	243,7	347	103 $\pm$ 13,1
SDH	238	349,8	111,8 $\pm$ 7,3
SDH+NAC	233	356	120,3 $\pm$ 8,5
MÉDIA	240,7	348,3	107,6

CONT: grupo-controle; RL: grupo ringer lactato; SDH: grupo solução de diálise hipertônica; SDH+NAC: solução de diálise hipertônica tratado com N-acetilcisteína; g: gramas. * $p = 0,2$. Os resultados estão expressos em média $\pm$ DP. *One way ANOVA post test Newman-Keuls*.

No grupo tratado – Grupo SDH + NAC -, a ingestão de

N-acetilcisteína via oral, através da água de beber, variou entre $14,0 \pm 0,8$ e $16,3 \pm 0,2$ mg/100gKg/dia; p value 0,2. Não houve, portanto, diferença na dose de tratamento oferecida aos espécimes do mesmo grupo tratado.

AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA MEMBRANA PERITONEAL

A avaliação funcional foi estudada pela relação de uréia e glicose em uma hora de permanência da solução dialítica na cavidade peritoneal.

Foi observada diferença significativa da relação D/P uréia entre os grupos ($p < 0,03$)

O grupo CONT apresentou menor D/P de uréia quando comparado aos demais. Houve diferença significativa quando comparado ao grupo SDH ($p < 0,03$).

Entre os grupos SDH + NAC (grupo tratado) e SDH (não tratado) houve diferença estatisticamente significativa, com menor D/P de uréia do grupo tratado, demonstrando menor lesão funcional de membrana e resposta ao tratamento empregado no grupo (Gráfico 1).

O grupo RL, apesar de tender a apresentar maior transporte do que o controle, não diferiu estatisticamente do mesmo.

A avaliação da relação D1/D0 foi diferente entre os grupos ($p < 0,01$) (Gráfico 2).

O grupo CONT mostrou maior relação quando comparado ao grupo SDH ($p < 0,01$). O grupo tratado - SDH+NAC -, apresentou maior relação em

comparação ao grupo não tratado, SDH, indicando menor alteração funcional de membrana no grupo tratado.

Gráfico 1 - Resultados D/P uréia dos grupos

CONT: grupo-controle; RL: grupo ringer lactato; SDH: grupo solução de diálise hipertônica; SDH+NAC: solução de diálise hipertônica tratado com N-acetilcisteína; g: gramas *One way ANOVA post test Newman-Keuls* *p = 0,03

Gráfico 2 - Resultados D1/D0 dos grupos

CONT: grupo-controle; RL: grupo ringer lactato; SDH: grupo solução de diálise hipertônica; SDH+NAC: solução de diálise hipertônica tratado com N-acetilcisteína; g: gramas Os resultados estão expressos em média *One way ANOVA post test Newman-Keuls* *p = 0,01

A avaliação celular do líquido peritoneal foi feita através de contagem total de células nucleadas e percentuais neutrofílicos realizados na amostragem dos quatro grupos. Não foram apresentadas diferenças entre eles. Foram observadas contagem celular mínima de 900 células/mm³ e máxima de 2800 células/mm³. Na tabela 2, é possível notar que, com exceção de alguns ratos RL, a maioria deles apresentou percentual de neutrófilos menor que 50%.

Tabela 2 - D/P uréia, D1/D0 e avaliação citológica do líquido peritoneal

	CONT (1)	RL (2)	SDH (3)	SDH+NAC (4)	p<
D/P Ureia	0,46±0,05	0,53±0,1	0,67±0,1	0,51±0,1	0,03 (1vs3, 3vs4)
D1/D0	0,44±0,08	0,4±0,04	0,27±0,07	0,35±0,06	0,01 (1vs3, 1vs4, 2vs3, 3vs4)
Contagem Leucocitária (mm ³)	1.350±173	1.425±917	1.867±680	1.929±573	ns
Neutrófilos (%)	25±13	41,5±7	27,67±20	12,57±12	0,04 (2vs4)

CONT: grupo-controle; RL: grupo ringer lactato; SDH:grupo solução de diálise hipertônica; SDH+NAC:solução de diálise hipertônica e tratado com N-acetilcisteína;D/P: relação dialisato e plasmática do soluto; G1/G0:relação glicose no dialisato no tempo 1 e inicial;g: gramas Os resultados estão expressos em média ± DP. One way ANOVA post test *Newman-Keuls*

A contagem celular média entre os espécimes que obtiveram resultado de cultura positiva é de 1.767 células/mm³. Os resultados foram: contagem mínima de 1200 células/mm³ e máxima de 2200 células /mm³.

Entre os espécimes com resultados de cultura negativos, a média da contagem foi de 1680 células/mm³, com contagem mínima de 900 células/mm³ e máxima de 2800 células/mm³. Não houve diferença no estudo comparativo entre o grupo com cultura positiva e aquele com cultura negativa (t test, $p=0.11$).

Pelos critérios de exclusão adotados, não houve saída por peritonite em nenhum dos grupos. Não foi encontrada conjugação de dois dos três critérios em um mesmo espécime, caracterizando a ocorrência de peritonite em ratos Wistar.

De forma isolada, foi encontrado um total de seis culturas positivas do líquido em cada um dos seis espécimes entre os grupos, representando 28% da amostragem total. Isoladamente, o critério de contagem celular acima de 2500 células/mm³ foi observado em 14% da amostragem total (três espécimes).

Avaliando os dois critérios de maneira conjugada (contagem celular elevada e cultura positiva), é possível constatar que não houve correlação a ser realizada ao término do estudo. A explicação seria uma possível característica da espécie, e não uma infecção que tivesse influenciado o aumento da celularidade do líquido peritoneal.

O crescimento positivo de bactérias no líquido peritoneal mostrou predominância entre os Gram positivos do tipo *Streptococcus* de variadas espécies. Houve crescimento de Gram negativos em menor número, e nenhum anaeróbio.

Houve a ocorrência de mortalidade de um espécime do grupo SDH (ou seja, 4,5%), por meio de excesso de anestésico.

SUBSTÂNCIAS REATIVAS COM ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) URINÁRIO (NMOLES/24H) E PLASMÁTICO (NMOLS/ML)

A avaliação do processo oxidativo entre os quatro grupos foi realizada através da dosagem de TBARS Urinário e Plasmático.

Foi observada diferença da excreção de TBARS Urinário, TBARS (U) entre os quatro grupos, sendo p value $<0,002$. (Gráfico 3).

O grupo CONT, comparado ao SDH, apresentou menor valor. Foi menor ainda em relação ao grupo RL, que, por sua vez, entre os quatro grupos estudados, foi o que mostrou maior elevação de TBARS (U).

O grupo tratado SDH+NAC mostrou menor TBARS (U) em comparação ao grupo RL. Em relação ao grupo SDH, não apresentou diferença estatística.

A avaliação plasmática dos TBARS, TBARS(P) mostrou-se significativa entre os grupos, sendo $p < 0,0001$ (Gráfico 4).

Foi observada menor concentração de TBARS (P) do grupo CONT em relação ao grupo SDH, assim como aos demais. O grupo tratado - SDH+NAC -, também apresentou menor valor TBARS(P) quando comparado ao GLIC e RL.

A análise do TBARS plasmático correlacionou-se à análise urinária, em que o grupo não tratado, comparado ao tratado, obteve resultados mais elevados dos valores encontrados, com aumento da concentração, sugerindo a ocorrência de maior evento oxidativo.

Tabela 3 - TBARS urinário e plasmático dos grupos

	CONT (1)	RL (2)	SDH (3)	SDH+NAC (4)	p <
TBARS U (nmols/24h)	57,7±9,5	231.3±61	160,1±8,5	107,6±10,8	0,002 (1vs2, 2vs4) 0,05 (1vs3)
TBARS P (nmols/ml)	3,77±0,19	5,12±0,5	5,5±0,4	4,0±0,3	0,0001 (1vs3) 0,001 (1vs2, 3vs4)
PESO (g)	92,5±10,8	103±13,11	111,8±7,3	122,3±8,5	ns

CONT: grupo-controle; RL: grupo ringer lactato; SDH:grupo solução de diálise hipertônica; SDH+NAC:solução de diálise hipertônica tratado com N-acetilcisteína; g: gramas Os resultados estão expressos em média *One way ANOVA post test Newman-Keuls**

Gráfico 3 - Resultados de TBARS urinário dos grupos

TBARS: espécies reagentes ao ácido tiobarbitúrico CONT: grupo-controle; RL: grupo ringer lactato; SDH:grupo solução de diálise hipertônica; SDH+NAC:solução de diálise hipertônica e tratado com N-acetilcisteína. Os resultados estão expressos em média *One way ANOVA post test Newman-Keuls* *p = 0,002

Gráfico 4 - Resultados do TBARS plasmático dos grupos

TBARS: espécies reagentes ao ácido tiobarbitúrico. CONT: grupo-controle; RL: grupo ringer lactato; SDH: grupo solução de diálise hipertônica; SDH+NAC: solução de diálise hipertônica e tratado com N-acetilcisteína. Os resultados estão expressos em média One way ANOVA post test *Newman-Keuls* $p = 0,001$

HISTOLOGIA PERITONEAL:

A avaliação da membrana peritoneal mostra, através da medida de sua espessura, que a diferença entre os grupos é significativa e importante. Com uma análise feita através da média obtida em 12 medidas de segmentos diferentes de cada amostra peritoneal, o grupo-controle obteve uma média de 7,7 μm , no RL 7,4 μm , no SDH 9,7 μm e no SDH+NAC 7,6 μm . Quando comparado o grupo-controle aos grupos que receberam infusão peritoneal, o grupo SDH apresentou-se de forma distinta ($p=0,01$). Na avaliação entre grupos tratados com NAC, SDH+NAC, e o grupo não tratado – SDH -, também foi encontrada diferença ($p=0,01$). Ficou

demonstrada a ação protetora do tratamento sob a estrutura peritoneal parietal.

Gráfico 5 - Resultados da medida de espessamento peritoneal dos grupos

CONT: grupo-controle; RL: grupo ringer lactato; SDH: grupo solução de diálise hipertônica; SDH+NAC: solução de diálise hipertônica e tratado com N-acetilcisteína. Os resultados estão expressos em média *One way ANOVA post test Newman-Keuls* p value = 0,01

Figura 1 - Medidas da espessura parietal nos quatro grupos.

Microscopia óptica da membrana peritoneal nos quatro grupos, corados em hematoxilina eosina e com medidas expressas em micrômetros (μm). CONT: grupo-controle; RL: grupo ringer lactato; SDH: grupo solução de diálise hipertônica; SDH+NAC: solução de diálise hipertônica e tratado com N-acetilcisteína.

4 DISCUSSÃO

O presente estudo sugere que o uso contínuo de solução de diálise glicosada hipertônica a 3,86 % seja um dos fatores responsáveis pela falha funcional da membrana peritoneal, estando associada a um grave processo inflamatório oxidativo. Sugere, também, que o uso contínuo de N-acetilcisteína, agente antioxidante, pode atenuar o processo.

A lesão inflamatória peritoneal, resultante de fatores agressivos da solução de diálise hipertônica, já foi demonstrada em modelos de diálise peritoneal experimental, em diferentes espécimes e diferentes protocolos. Utilizando-se soluções hipertônicas glicosadas,^{14,19} novas soluções dialíticas biocompatíveis,⁷² tais como icodextrina⁵⁴ e soluções não glicosadas,⁵⁸⁻⁶⁰ foi possível reproduzir a lesão inflamatória na membrana em estudos experimentais na situação de diálise peritoneal, à semelhança da lesão clínica presente nos tratamentos crônicos. É sabido que o ringer lactato é também lesivo à membrana peritoneal, assim como o é, e já foi demonstrada experimentalmente, a infusão de solução fisiológica e de novas soluções dialíticas.⁷³ Fica, portanto, reforçada a afirmação de que a glicose não é exclusivamente o único fator responsável pela inflamação da membrana.

A duração de seis semanas do estudo foi suficiente para o aparecimento de alguns tipos de alterações na membrana peritoneal, tais

como de natureza funcional, de marcadores biológicos do processo oxidativo e, finalmente, histológicas.^{60-64,73,74,75} Já foi observado, em outros estudos, o tempo precoce das alterações de transporte e histológicas peritoneais. Há protocolos de curta duração - quatro semanas,⁷⁴ por exemplo -, em modelos crônicos com SDH, utilizando igual volume e número de infusões diárias. Sabe-se que, de forma precoce, estão presentes as alterações de transporte de solutos, o evidente aumento da celularidade do efluente peritoneal, o aumento nas concentrações de marcadores inflamatórios e a duplicação de membrana basal, assim como o aparecimento de um número maior de capilares, a neoangiogênese.^{55, 57, 59}

A avaliação funcional realizada através do transporte de uréia e glicose mostrou que os animais expostos à infusão peritoneal de solução hipertônica glicosada apresentaram maiores alterações funcionais da membrana - avaliadas na relação G1/G0 menor e D/P Uréia maior – em comparação aos animais-controle e àqueles que fizeram infusão de ringer lactato. A avaliação funcional da membrana peritoneal em modelos animais tem sido discutida em diferentes espécimes, sobretudo em ratos e coelhos. O transporte de solutos através da membrana peritoneal, em modelos, é avaliado através do equilíbrio da concentração de pequenos solutos entre compartimentos até a determinação de seu equilíbrio. Em ratos, sabe-se que o equilíbrio de uréia é alcançado no prazo de duas horas de permanência da solução na cavidade, obtendo-se equilíbrio plasmático e peritoneal. No entanto, não se podem comparar processos ou quantificá-los, à semelhança dos processos de difusão, convecção ou ultrafiltração dos modelos clínicos,

avaliados pelo Teste de Equilíbrio Peritoneal (PET), através do transporte de creatinina. Nos modelos animais, a avaliação funcional em membrana tem sido realizada através de suas principais formas, quais sejam: pela avaliação de equilíbrio de pequenos solutos entre compartimentos demonstrados no presente estudo e pelo *Standard Peritoneal Permeability Analysis in Rabbits* (SPAR),⁷⁶ ou do *Standard Peritoneal Permeability Analysis in Rats* (SPART).^{62, 63} Consistem em testes funcionais onde, além do equilíbrio de solutos, acrescenta-se à análise a avaliação de fluidos e ultrafiltração. Neste caso, um implante prévio de cateteres intraperitoneais para infusão e drenagem é requerido.

Os animais que foram tratados com NAC apresentaram aparente proteção, preservando relação D/P uréia menor e D1/D0 maior, comparados aos do grupo não tratado.

A ação dos agentes antioxidantes, sob a permeabilidade da membrana peritoneal a pequenos solutos, vem sendo demonstrada em modelos experimentais. A ação da N-acetilcisteína na membrana peritoneal parece estar relacionada à diminuição do estímulo formador de neovascularização e aumento capilar peritoneal. Com o mesmo efeito, já foram demonstradas as ações da trimetazidine, piridoxamina e enalapril.^{43,}

44, 45,46

A avaliação do processo oxidativo, no presente estudo, pela geração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em urina e plasma, mostra, de forma concludente, que existe um grande desbalanço do processo oxidativo nos espécimes submetidos à infusão peritoneal, seja com

soluções glicosadas, seja com soluções ringer lactato. Estudos em modelos peritoneais demonstram boa correlação deste marcador com o processo inflamatório, evidenciado, na análise óptica da membrana peritoneal e na marcação de mediadores inflamatórios, pela imunohistoquímica.^{43, 44, 45,46}

A avaliação do processo oxidativo, seja em humanos (através de estudo clínico ou experimental), seja *in vitro*, é feita através da quantificação de marcadores pró e antioxidantes, visto que se trata da avaliação de um sistema em desequilíbrio. Nos modelos em ratos, a avaliação do processo oxidativo comumente tem sido realizada pelo estudo comparativo, entre concentrações de TBARS em meios urinários e plasmáticos.^{43, 44, 45,46} A avaliação em fluido peritoneal, contudo, não tem sido demonstrada.

No presente estudo, quando avaliado o aumento da dosagem plasmática de TBARS, evidencia-se que a N-acetilcisteína diminui significativamente sua concentração plasmática no grupo tratado, protegendo-o. O grupo não tratado apresenta concentrações mais elevadas de TBARS plasmático, tanto pela exposição ao RL, quanto pela exposição à glicose hipertônica.

A contagem celular normal no líquido peritoneal e a contagem a ser relacionada à presença de processo infeccioso inflamatório não está definida para os modelos experimentais. de diálise peritoneal. No presente estudo, a contagem celular observada nos quatro grupos apresentou médias inferiores a 2000 células/mm³, incluindo espécimes com cultura positiva. Espécimes com cultura positiva ou negativa não apresentaram significância estatística, quando avaliados separadamente. Não foi encontrada diferença

quanto à celularidade ou percentual de neutrófilos, não podendo ser evidenciada a distinção entre contaminação das amostras positivas e ocorrência de peritonites.

O diagnóstico de peritonite apresenta grande variabilidade quanto ao limite superior da contagem celular do líquido peritoneal 856 *células/mm³* a 2500 *células/mm³* entre os vários estudos.^{56,57,58} A celularidade peritoneal descrita pode variar, dependendo de muitos fatores. Entre eles, o volume infundido, o tempo de permanência na cavidade, o tamanho da amostra de líquido adotada para contagem, o trauma relacionado a implante de cateteres ou punções peritoneais.⁵⁷ Tem sido demonstrado aumento celular com duração de até oito dias após implante de catéter peritoneal, com celularidade do líquido tão elevada quanto 3500 *células/mm³*, sem crescimento bacteriano associado.⁵⁷ Portanto, qualquer critério adotado para limites de contagem celular deverá ainda ser considerado. Constituirá uma escolha arbitrária do pesquisador, necessitando de estudos que consolidem novos parâmetros a serem adotados.

A avaliação histológica peritoneal demonstra, de forma clara, a diferença entre os grupos. Principalmente, a ação lesiva da SDH sobre a membrana peritoneal parietal. O aumento de espessura é importante. Da mesma forma, é significativo que, devido à lesão sofrida, o grupo tenha apresentado maior média em comparação aos demais. Os modelos em diálise peritoneal analisam segmentos peritoneais viscerais para avaliação de vasos e neoangiogênese, não possível neste estudo. Demonstram, também, que o aparecimento de vasos é precoce, correlacionando-se o

aumento de marcadores inflamatórios. A alteração está demonstrada, na membrana peritoneal, através de técnica imunohistoquímica.^{43,46, 56}

5 CONCLUSÃO

O presente estudo mostra que a infusão peritoneal diária de solução dialítica hipertônica glicosada a 3,38%, aplicada no período de 6 semanas, em modelo animal, utilizando ratos não-urêmicos, gera uma lesão aguda na membrana peritoneal de característica inflamatória. Foi observado, nesta lesão, um alto transporte de solutos pela membrana, um grave processo oxidativo, avaliado pela dosagem de TBARS urinário e plasmático. Também foram observadas importantes alterações de membrana peritoneal parietal nesses espécimes. O uso contínuo de N-acetilcisteína, via oral, protege a membrana peritoneal, diminuindo a expressão do processo oxidativo e a geração de TBARS.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Romão Júnior JE. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. Diretrizes de Doença Renal Crônica. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 2004. vol XXVI, n.3, (Supl 1).
2. Censo SBN jan/2005. Available from:<http://www.sbn.org.br> (assessed December 2006).
3. Gokal R, Mallick NP. Peritoneal Dialysis. *Lancet* 1999;353:823-8.
4. Cusumano A, Garcia-Garcia G, Di Gioia C, Hermida O, Lavorato C, Carreno CA, *et al.* End-stage renal disease and its treatment in Latin America in the twenty-first century. *Ren Fail.* 2006;28(8):631-7.
5. Smit W, Schouten N, Van Den Berg N, Langedijk MJ, Struijk DG, Krediet RT. Analysis of the prevalence and causes of ultrafiltration failure during long-term peritoneal dialysis: a cross-sectional study. *Perit Dial Int.* 2004;24(6):506-8.
6. Vonesh EF, Snyder JJ, Foley RN, Collins AJ. Mortality studies comparing peritoneal dialysis and hemodialysis: what do they tell us?. *Kidney Int.* 2006;103:3-11.
7. Wang T, Heimbürger O, Waniewski J, Bergström J, Lindholm B. Increase Peritoneal Permeability is associated with decreased fluid and small solute removal and higher mortality in CAPD patients. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:1242-9.
8. Widereo TE, Smeby LC, Mjaland S, Dahl K, Berg KJ, Wessel AT. Long-term changes in transperitoneal water transport during continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephron* 1984;38:238-47.
9. Di Paolo, G Sacchi. Atlas of peritoneal Histology. *Perit Dial Int.* 2000;20(suppl 3):95–6.
10. Eroschenk V P. Epithelial Tissues. In: Eroschenk V P. *Atlas of Histology with Funcional Correlations*. 10ª edição. London. LippincottWilliams&Wilkins.2005.Cap.1;28-29.
11. Blake PG, Daugirdas JT. Fisiologia da Diálise Peritoneal. In: Daugirdas JT, Blake PG, Ing TS. *Manual de Diálise*. 3ª edição. Rio de Janeiro. 2001. Guanabara Koogan. Cap.13.
12. Nolph KD, Mactier R, Khanna R, Twardowski ZJ, Moore H, McGary T. The kinetics of ultrafiltration during peritoneal dialysis: the role of lymphatics. *Kidney Int.* 1987;32(2):219-26.

13. Davies SJ, Williams JD. Complications of Peritoneal Dialysis. Johnson RJ, Feehally J. In: *Comprehensive Clinical Nephrology*. 2a edição. Espanha. Elsevier. 2000;1113-24.
14. Flessner MF. Peritoneal transport physiology: insights from basic research. *J Am Soc Nephrol*. 1991;(2):122-35.
15. Rippe B, Zakaria ER. Lymphatic versus nonlymphatic fluid absorption from the peritoneal cavity as related to the peritoneal ultrafiltration capacity and sieving properties. *Blood Purif*. 1992;10:189-202.
16. Krediet RT. The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis. *Kidney Int* 55:341-356.
17. Musi B, Braide M, Wieslander A, Rippe A, Albrektsson A, Henle T, Rippe B. Very high daily intraperitoneal doses of carbonyl compounds affect the morphology, but not the exchange characteristics, of rat peritoneum. *Blood Purif*. 2001;19(3):286-92.
18. Imholz A, Koomen G, Voorn W, Struijk D, Arisz L, and Krediet R. Day-to-day variability of fluid and solute transport in upright and recumbent positions during CAPD. *Nephrol. Dial. Transplant*. 1998;13:146-153.
19. Krediet RT, Zweers MM, Van Der Wal AC, Struijk DG. Neoangiogenesis in the Peritoneal Membrane. *Perit Dial Int*. 2000;20(2):19-25.
20. Douma CE, Hiralall JK, de Waart DR, Struijk DG, Krediet RT. Icodextrin with nitroprusside increases ultrafiltration and peritoneal transport during long CAPD dwells. *Kidney Int*. 1998;53(4):1089-90.
21. Pecoits-Filho R, Araújo MRT, Lindholm B, Stenvinkel P, Abensur H, Romão Jr JE, *et al*. Plasma and dialysate IL-6 and VEGF concentrations are associated with high peritoneal solute transport rate. *Nephrol Dial transplant* 2002;17:1480-6.
22. Zweers MM, de Waart DR, Smit W, Struijk DG, Krediet RT. Growth factors VEGF and TGF-beta 1 in peritoneal dialysis. *J Lab Clin Med*. 1999;134(2):124-32.
23. Devuyst O, Topley N, Williams DJ. Morphological and Funcional changes in the dialysed peritoneal cavity: impact of more biocompatible solution. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17(suppl 3):12-15.
24. Inagi R, Miyata T, Ueda Y, Yoshiro A, Nangaku M, Van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K. Efficient in vitro lowering of carbonyl atress by glyoxalate system in conventional glucose peritoneal dialysis fluid. *Kidney Int*. 2002;62(2):679-87.

25. Simon JD, Louise P, Patrick FN, and Gavin R. Peritoneal Glucose Exposure and Changes in Membrane Solute Transport with Time on Peritoneal Dialysis. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12:1046–51.
26. Witowski J, Wisniewska J, Korybalska K, Bender T O., Breborowicz A, Gahl G M., Frei U, Passlick-Deetjen J and Achim JO. Prolonged Exposure to Glucose Degradation Products Impairs Viability and Function of Human Peritoneal Mesothelial Cells. *J Am Soc Nephrol* . 2001;12: 2434–41.
27. Friedlander MA, Wu Y C, Elgawish A and Monnier V M. Early and Advanced Glycosylation End Products Kinetics of Formation and Clearance in Peritoneal Dialysis. *J. Clin. Invest*. 1996;97(3):728–35.
28. Jörres A, Bender TO, Finn A, Witowski J, Fröhlich S, Gahl G M, Frei U, Keck H and Passlick-Deetjen J. Biocompatibility and buffers: Effect of bicarbonate-buffered peritoneal dialysis fluids on peritoneal cell function. *Kidney Int*. 1998;54:2184-93.
29. Laurindo, FRM. Desequilíbrio Redox, resposta vascular à lesão da aterosclerose. Endotélio e Doenças Cardiovasculares. Da Luz L P, Laurindo MRF, Chagas CPA., 2003. São Paulo. Atheneu.
30. Miyata T, Krokowa K, Van Ypersele de Strihou C. Advanced glycation and lipoxidation end products: role of reactive carbonyl compounds generated during carbohydrate and lipid metabolism. *J Am Soc Nephrol* . 2000;11:1744-52.
31. Maulik N, DAS DK. Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:1047-60.
32. Miyata T, Sugiyama S, Saito A, Kurokawa K. Reactive carbonyl compounds related uremic toxicity (carbonyl stress). *Kidney Int Suppl*. 2001;78,25-31.
33. De Oliveira FS, Wajchwnberg LB. Endotélio e Diabetes. Endotélio e Doenças Cardiovasculares. Da Luz L P, Laurindo MRF, Chagas CPA. 2003. São Paulo. Atheneu. Cap 20.
34. Schalkwijk CG, Posthuma N, Ten Brink HJ, Ter Wee PM, Teerlink T. Induction of 1,2-dicarbonyl Compounds, Intermediates in the Formation of Advanced Glycation End-Products, during Heat-Sterilization of Glucose-based Peritoneal Dialysis fluids. *Perit Dial Int*. 1999;19(4):325-33.
35. De Vriese N S., Flyvbjerg A, Siska M, Ronald GT, and Robert HL. Inhibition of the Interaction of AGE–RAGE Prevents Hyperglycemia-Induced Fibrosis of the Peritoneal Membrane. *J Am Soc Nephrol* . 2003;14:2109–18.

36. Schwenger VV, Morath C, Salava A, Amann K, Seregin Y, Ritz RD *et al.* Damage to the Peritoneal Membrane by Glucose Degradation Products Is Mediated by the Receptor for Advanced Glycation End-Products *J Am Soc Nephrol.* 2005;30: 117-22.
37. Nilson-Thorel CB, Muscalu N, Audrer AHG, Kjellstrand PTT, Wieslander AP. Heat sterilization for fluids of peritoneal dialysis gives rise to aldehydes. *Perit Dial Int.* 1993;13:208-213.
38. Linden T, Forsback G, Deppisch R, Henle T, Wieslander A. 3-Deoxyglucosone, a promoter of advanced glycation end products in fluids for peritoneal dialysis. *Perit Dial Int.* 1998; 18(3):290-3.
39. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60:6-20.
40. Efrati S, Averbukh M, Berman S, Feldman L, Dishy V, Kachko L *et al.* N-Acetylcysteine ameliorates lithium-induced renal failure in rats. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20:65–70.
41. Tepel M. Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. *N Engl J Med.* 2000;20:343(3),180-4.
42. Drager LF, Andrade L, Toledo JFB, Laurindo FRM, Cesar LAM, Seguro AC. Renal effects of N-acetylcysteine in patients at risk for contrast nephropathy: decrease in oxidant stress-mediated renal tubular injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;4:1-5.
43. Shimizu MHM, Coimbra TM, Araújo M, Menezes LF, Seguro AC. N-acetylcysteine attenuates the progression of chronic renal failure. *Kidney International* 2005;68:2208-17.
44. Noh H, Kim JS, Han K-H, Lee GT, Song JS, Chung SH *et al.* Oxidative stress during peritoneal dialysis: Implications in functional and structural changes in the membrane. *Kidney International.* 2006;69:2022–8.
45. Gunal AI, Celiker H, Ustundag B, Akpolat N, Dogukan A, Akcicek F. The effect of oxidative stress inhibition with trimetazidine on the peritoneal alterations induced by hypertonic peritoneal dialysis solution. *J Nephrol.* 2003;16: 225-30.
46. Takatoshi K, Reika T, Yoshinobu S, Yuko I, Reiko I, Masaomi N, Akira S, and Toshio M. Pyridoxamine improves functional, structural, and biochemical alterations of peritoneal membranes in uremic peritoneal dialysis rats. *Kidney International.* 2005;68:1326–36.
47. Trimarchi H, Mongitore MR, Baglione P, Forrester M, Freixas EA, Schropp M *et al.* N-acetylcysteine reduces malondialdehyde levels in chronic hemodialysis patient – a pilot study. *Clin Nephrol.* 2003;59(6):441-6.

48. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.* 1989;6:593-597.
49. Massy ZA, Nguyen-KHOA T. Oxidative stress and chronic renal failure: markers and management. *J Nephrol.* 2002;15 (4):336-341.
50. Trimarchi H, Mongitore MR, Baglioni P, Forrester B, Freixas M, Schropp M, Pereira H, Alonso M. N-acetylcysteine reduces malondialdehyde levels in chronic hemodialysis patients – a pilot study. *Clin Nephrol.* 2003;59:441-6.
51. Lankisch PG, Koop H, Winckler K, Quellhorst E, Schmidt H. Experimental model for peritoneal dialysis in small laboratory animals. *Clin Nephrol.* 1975;4(6):251-2 .
52. Di Paolo N, Garosi G, Petrini G, Travesari L, Rossi P. Peritoneal dialysis solution biocompatibility in animals. *Perit Dial Int.* 1995;15:61-9.
53. Garosi G, Di Paolo N. The rabbit model in evaluating the biocompatibility in peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:664-5.
54. Waart DR, Zweers M, Struijk DG, Krediet. Icodextrin degradation products in spent dialysate capd patients and the, and its relation with dialysate osmolarity. *Perit Dial Int* . 2001;21:269-74.
55. Di Paolo N, Garosi G, Petrini G Traversari L, Rossi P. Peritoneal Dialysis Solution Biocompatibility testing in Animals. *Perit Dial Int.* 1995;15:61-9.
56. Lameire N, Van Biesen W, Van Landschoot M, Wang T, Heimbürger O, Bergström J, Lindholm B, Hekking LP, Havenith CE, Beelen RH. Experimental models in peritoneal dialysis: a European experience. *Kidney Int.* 1998;54(6): 2194-206.
57. Suzuki K, Nolph KD, Moore HL, Twardovsk ZJ. Expected white blood cell counts and differentials in a rat model of peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* . 1995;15:142-6.
58. Mortier S, De Vriese AS, Leyssens A, *et al.* Antibiotic administration in an animal model of chronic peritoneal dialysis exposure. *Perit Dial Int.* 2003;23:331-8.
59. Machteld MZ, Raymond TK, Dirk GS. Morphological Changes in the Peritoneum in a Continuous Peritoneal Infusion Model in the Rat. *Peritoneal Anatomy/ Peritoneal Kinetics.* 1989;19:113-6.

60. Zweers MM, Splint LJ, Krediet RT, Struijk DG. Ultrastructure of Basement of Peritoneal Capillaries in a Chronic Peritoneal Infusion Model in the Rat. *Nephrol Dial Transplant*. 2001; 16:651-4.
61. Robert HJB, Liesbeth HPH, Mammad Z, Van der Born J. Rat Model in Peritoneal Dialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2001; 16:672-4.
62. Raymond TK, Machteld MZ, Laura JS, Dirk GS. Effect of the Supplementation and Mortality on Peritoneal Permeability Characteristics in a Rat Peritoneal Dialysis Model. *Perit Dial Int*. 2001;21:58-64.
63. Zeltzer E, Klein O, Rashid G, Zatz D, Korsets Z, Bernheim J. Intraperitoneal Infusion of Glucose-Based Dialysate in the Rat- an Animal Model of Study of Peritoneal Advanced Glycation End-Products Formation and Effect on Peritoneal Transport. *Perit Dial Int*. 2000;20:656-61.
64. Noh H, Kim JS, Han KH, Lee GT, Song JS *et al*. Oxidative stress during peritoneal dialysis: Implication in functional and structural changes in the membrane. *Kidney International*. 2006;69:2022-8.
65. Breborowicz A, Knapowski J. Augmentation of peritoneal dialysis clearance with procaine. *Kidney Int*. 1984;26(4):392-6.
66. Zweers MM, Mulder JB, Krediet RT, Struijk DG. Morphological changes in the peritoneum in a continuous peritoneal infusion model in the rat. *Perit Dial Int*. 2003;19: supp1.
67. Zweers MM, Splint LJ, Krediet RT, Struijk DG. Ultrastructure of basement membranes of peritoneal capillaries in a chronic peritoneal infusion model in the rat. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16(3):651-4.
68. Pawlaczyk K, Kuzlan-Pawlaczyk M, Anderstam B, Heimbürger O, Bergström J, Waniewski J, Breborowicz A, Lindholm B. Effects of intraperitoneal heparin on peritoneal transport in a chronic animal model of peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16(3):669-71.
69. Mortier S, De Vriese AS, Leyssens A, Vanacker NJ, Faict D, Cornelissen M, De Ridder L, Lameire NH. Antibiotic administration in an animal model of chronic peritoneal dialysate exposure. *Perit Dial Int*. 2003;23(4):331-8.
70. Zeltzer E, Klein O, Rashid G, Katz D, Korsets Z, Bernheim J. Intraperitoneal infusion of glucose-based dialysate in the rat - an animal model for the study of peritoneal advanced glycation end-products formation and effect on peritoneal transport. *Perit Dial Int*. 2000;20(6):656-61.

71. Van Westrhenen R, Westra WM, van den Born J, Krediet RT, Keuning ED, Hiralall J Dragt C, Hekking LH. Alpha-2-macroglobulin and albumin are useful serum proteins to detect subclinical peritonitis in the rat. *Perit Dial Int.* 2006;26(1):101-7.
72. Devuyst O, Topley N, Williams JD. Morphological and functional changes in the dialysed peritoneal cavity: impact of more biocompatible solutions. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17:12-5.
73. Wieczorowska-Tobis K, Brelinska R, Witowski J, Passlick-Deetjen J, Schaub TP, Schilling H, Breborowicz A. Evidence for less irritation to the peritoneal membrane in rats dialyzed with solutions low in glucose degradation products. *Perit Dial Int.* 2004;24(1):48-57.
74. Peng WX, Guo QY, Liu SM, Liu CZ, Lindholm B, Wang T. Comparison of three chronic dialysis models. *Adv Perit Dial.* 2000;16:51-4.
75. Suzuki K, Khanna R, Nolph KD, Moore HL, Twardowski ZJ. Effects of bicarbonate dialysis solution on peritoneal transport in rats. *Adv Perit Dial.* 1996;12:24-6.
76. Zweers MM, Douma CE, de Waart DR, Van Der Wardt AB, Ho-dac-Pannekeet MM, Krediet RT, Struijk DG. The standard peritoneal permeability analysis in the rabbit: a longitudinal model for peritoneal dialysis. *Perit Dial Int.* 1999;9(1):56-64.