

ALTERAÇÕES RENAIS MORFOLÓGICAS EM CAPRINOS SUBMETIDOS À INFUSÃO INTRAVENOSA DE HEMOLISADO

RAYMUNDO RIZALDO PINHEIRO
Pesquisador Científico
Centro Nacional de Pesquisa de
Caprinos-EMBRAPA

MITIKA KURIBAYASHI HAGIWARA
Professor Associado
Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da USP

RODOLFO NURMBERGER
Professor Doutor
Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da USP

EDUARDO HARRY BIRGEL
Professor Titular
Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da USP

PINHEIRO, R.R.; HAGIWARA, M.K.; NURMBERGER, R.; BIRGEL, E.H. Alterações renais morfológicas em caprinos submetidos à infusão intravenosa de hemolisado. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, 27(1):53-56, 1990.

RESUMO: O objetivo deste trabalho é de avaliar através de exames histopatológicos sequenciais as lesões renais decorrentes da hemoglobinemia. Foram utilizados sete caprinos adultos, sendo 4 machos e 3 fêmeas Sem Raça Definida (SRD). Retirou-se dos animais o volume sangüíneo equivalente a 15 ml/kg de peso corpóreo. Após ruptura mecânica das hemácias, por congelamento, cada animal recebeu o hemolisado homólogo 48 horas depois da colheita de sangue, via intravenosa. Um animal foi sacrificado antes de se proceder à infusão e três foram sacrificados 3, 9 e 24 horas após. Os demais foram sacrificados 96 horas depois da infusão do hemolisado. Os fragmentos renais obtidos foram corados pelo método de hematoxilina eosina (HE), segundo o método de coloração de alizarina de Okajima e ainda pelo ácido periódico de Schiff (PAS). Verificamos alterações histopatológicas 3, 9 e 24 horas após o início da aplicação do hemolisado, sendo que às 9 e 24 horas observou-se um agravamento das lesões. As alterações caracterizavam-se, principalmente, pela presença de glóbulos protéicos, cilindros de hemoglobina e degeneração tubular com destruição das microvilosidades. Os cortes

histológicos dos fragmentos renais obtidos 96 horas após a infusão do hemolisado permitiram observar sinais de regeneração do epitélio tubular. Diante do exposto concluiu-se que, a hemoglobinemia temporária resultante da aplicação intravenosa do hemolisado homólogo em caprinos, em dose de 15 ml/kg de peso, causou danos renais.

UNITERMOS: Rim, lesões; Hemoglobina; Plasma; Caprinos

INTRODUÇÃO

Foi Jean Baptiste Denys que descreveu pela primeira vez, em 1667, a instalação de hemoglobinúria após reações pós-transfusionais graves, em consequência da aplicação de sangue incompatível (FLINK⁵, 1947). A partir dessa época estudos clínicos e patológicos realizados por diversos pesquisadores permitiram concluir que, em todos os casos fatais, havia lesão renal caracterizada por variado grau de degeneração epitelial e necrose tubular na região cortical, associada à presença de cilindros pigmentares na alça de Henle, no túbulo contornado distal e túbulos coletores.

O efeito da hemoglobinemia sobre a função renal tem sido amplamente estudado em algumas espécies animais como rato e o cão. Pouco se conhece sobre o efeito da hemoglobinemia em ruminantes. Nos bovinos é freqüentemente observada como parte da sintomatologia de diversas doenças como a piroplasmose, hemoglobinúria bacilar, eperitrozoonose, doença hemolítica do recém-nascido, reação pós-transfusional e intoxicação por substâncias hemolíticas (BENJAMIN¹, 1978; BLOOD et alii³, 1983; JAIN¹¹, 1986).

O escopo do presente trabalho é portanto o de avaliar, através de exames histopatológicos sequenciais, as lesões renais decorrentes da hemoglobinemia em caprinos.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 7 caprinos adultos sendo 4 machos e 3 fêmeas Sem Raça Definida. Antes de serem introduzidos no experimento, realizou-se exame clínico e exames laboratoriais: hematológico, bioquímica sérica (proteína total, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase-AST, fosfatase alcalina, bilirrubinas), urinálise, coproparasitológico.

Através da venopuntura da jugular, retirou-se dos animais o volume sangüíneo equivalente a 15 ml/kg de peso. E após ruptura mecânica das hemácias, por

congelamento, cada animal recebeu hemolisado, homólogo, 48 horas depois da colheita de sangue, sob a forma de aplicação intravenosa lenta.

Os animais foram sacrificados por traumatismo craniano e posterior sangria. Desses, um animal foi sacrificado antes de se proceder a infusão do hemolisado e três foram sacrificados respectivamente 3, 9 e 24 horas após a infusão de 15 ml/kg de peso de hemolisado. Os três animais restantes também receberam hemolisado em idênticas doses e foram sacrificados 96 horas após.

Os rins foram removidos imediatamente após o sacrifício dos animais, observando-se o aspecto macroscópico e retirando-se alguns fragmentos que eram fixados em solução de formol a 10%, por um período aproximado de 72 horas. Procedia-se após, à inclusão em parafina, obtenção de cortes histológicos de 5 μ de espessura e coloração pelo método de hematoxilina e eosina (H.E.). Foi também empregada a coloração específica de hemoglobina segundo o método de coloração de alizarina de Okajima, conforme indicado por MC MANUS & MOWRY¹⁴ (1965). Utilizou-se, ainda, o método de coloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS), conforme descrito por MC MANUS & MOWRY¹⁴ (1965), para observação da integridade morfológica das microvilosidades dos túbulos contornados proximais (bordadura em escova), bem como da regeneração das mesmas no período final do experimento, e também para o estudo morfológico das membranas basais dos túbulos renais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As alterações histopatológicas verificadas nesse experimento assemelham-se àquelas citadas por vários autores como HARRISON et alii⁸ (1947); BLACK² (1948); GOLDBERG⁶ (1962); JAENIKE & SCHNEEBERGER¹⁰ (1965). As alterações observadas 3 horas após a aplicação do hemolisado haviam sido relatadas por HARRISON et alii⁸ (1947) em idêntico período de tempo e foram caracterizadas pelo início da vacuolização do epitélio tubular, pela presença de material protéico no lúmen tubular, e também pela presença de hemoglobina na luz tubular e no interior das células (Fig. 1).

O agravamento das lesões tubulares nos momentos subseqüentes foi evidenciado no exame histopatológico realizado nove e vinte e quatro horas após o início do experimento. Presença de glóbulos acidófilos e de cilindros de hemoglobina relatada por JAENIKE & SCHNEEBERGER¹⁰ (1965), bem como a degeneração tubular citada por FLINK⁵ (1947) foram as alterações mais evidentes (Fig. 2 e 3).

A regeneração epitelial, verificada 96 horas após

a aplicação de hemoglobina livre, é caracterizada pela presença de epitélio de substituição constituído por células alongadas com pouco citoplasma e regeneração das microvilosidades (Fig. 4), bem como pela deposição de hemossiderina, no interior das células tubulares (FLINK⁵, 1947; HARRISON et alii⁸, 1947; JAENIKE & SCHNEEBERGER¹⁰, 1965). De acordo com estes últimos pesquisadores a regeneração é acompanhada da normalização da função renal medida pela depuração da inulina.

Três hipóteses gerais têm sido sugeridas para explicar a lesão renal causada pela hemólise intravascular: obstrução dos túbulos renais pela precipitação dos derivados da hemoglobina no seu lúmen (HAMILTON & FARR⁷, 1947; HARRISON et alii⁸, 1947; JAENIKE⁹, 1965), precipitação essa favorecida pelo pH ácido (YUILE¹⁵, 1945); injúria das células do epitélio tubular pela toxicidade das hemoproteínas e seus derivados (BRAUN et alii⁴, 1969); e diminuição do fluxo renal devido à constrição dos vasos renais (LIPPMAN et alii¹³, 1951; JAENIKE⁹, 1965; JAENIKE & SCHNEEBERGER¹⁰, 1965).

Duas, das três hipóteses mencionadas, foram observadas neste experimento: a obstrução dos túbulos (pela precipitação dos derivados de hemoglobina e pela formação de cilindros na luz tubular) e o comprometimento das células do epitélio tubular.

Embora YUILE¹⁵ (1945) tenha mencionado a importância do pH na precipitação de hemoglobina, bem como na formação de cilindros, a obstrução do fluxo urinário pode ocorrer independente do pH urinário, como observaram HARRISON et alii⁸ (1947). O aumento da viscosidade do filtrado glomerular, devido à presença de hemoglobina, altera o fluxo urinário, pois quando a resistência da solução de hemoglobina é maior que o gradiente de pressão determinado pela pressão sangüínea, somada à força resultante da absorção de água, há diminuição na velocidade do fluxo urinário. Havendo diminuição na velocidade do fluxo urinário, favorece-se a formação de cilindros, principalmente em meio ácido. Os cilindros de hemoglobina são solubilizados em pH menores que 5,2 e maiores que 8,6.

Ainda que o pH urinário houvesse variado entre 7,0 e 9,0, cilindros de hemoglobina foram encontrados, na maioria dos caprinos, em diversas ocasiões. A diminuição do fluxo urinário em conseqüência da maior viscosidade determinada pela hemoglobina e a acidez da urina ao nível da alça de Henle certamente devem ter contribuído para a formação desses cilindros, os quais, por sua vez, influíram na obstrução do fluxo urinário ao nível dos túbulos contornados distais.

Segundo LALICH¹² (1947) e JAENIKE⁹ (1965), a desidratação pode influir consideravelmente no aparecimento de lesão renal, potencializando o efeito da hemoglobinemia e favorecendo a formação de

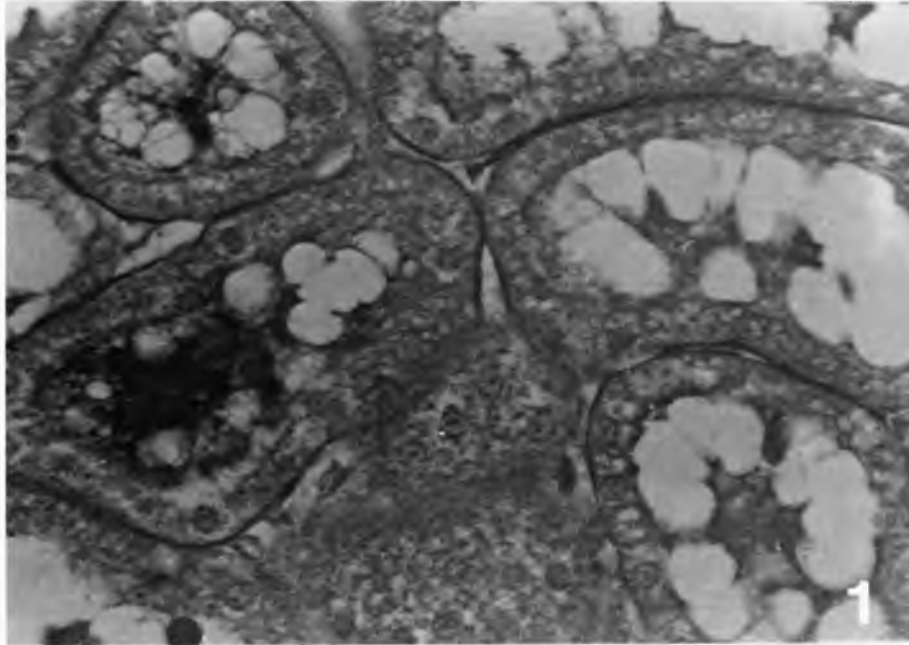


FOTO 1 - Túbulos da região cortical, 9 horas após a infusão do hemolisado, mostrando a presença de hemoglobina tanto na luz tubular quanto no citoplasma das células epiteliais. Corado pelo método da Alizarina. Aumento de 500 X.

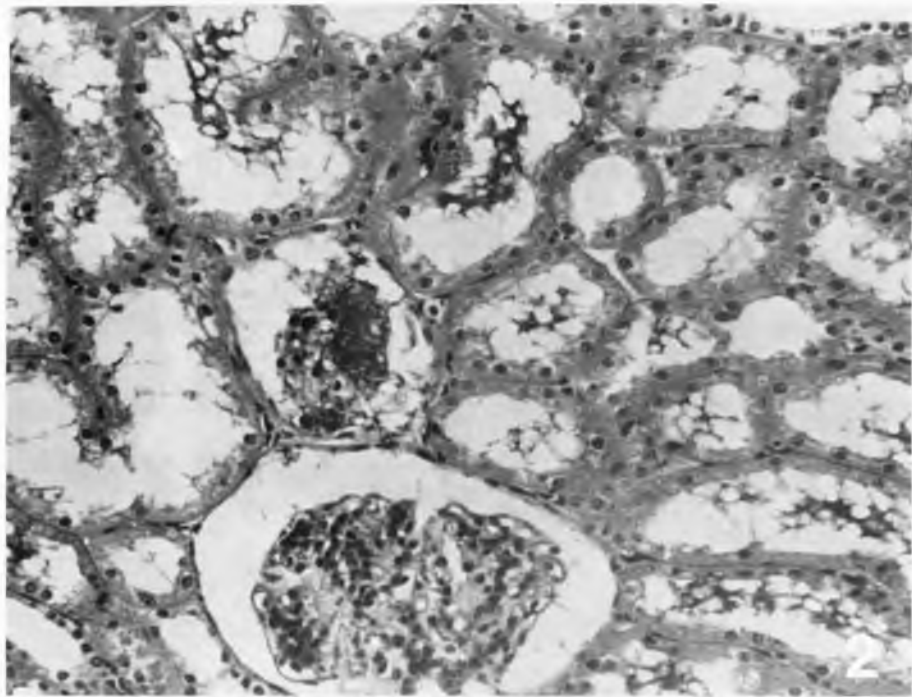


FOTO 2 - Obstrução tubular e glomerular devido à presença de material de natureza protéica. Destruição intensa das células de revestimento tubular, aumentando a sua luz, 24 horas após a infusão do hemolisado. Corado pelo H.E. Aumento de 200 X.

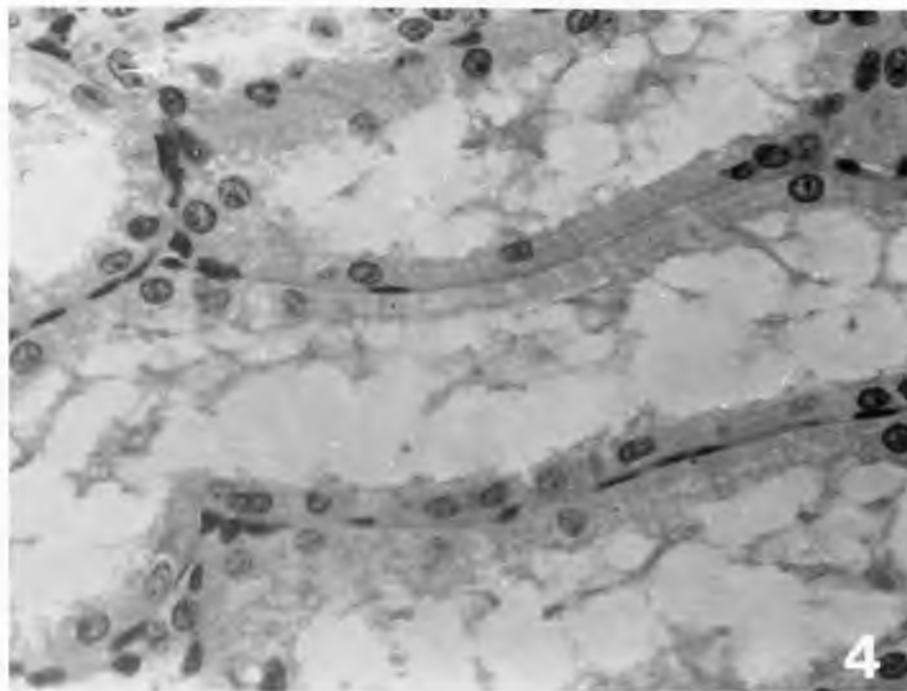
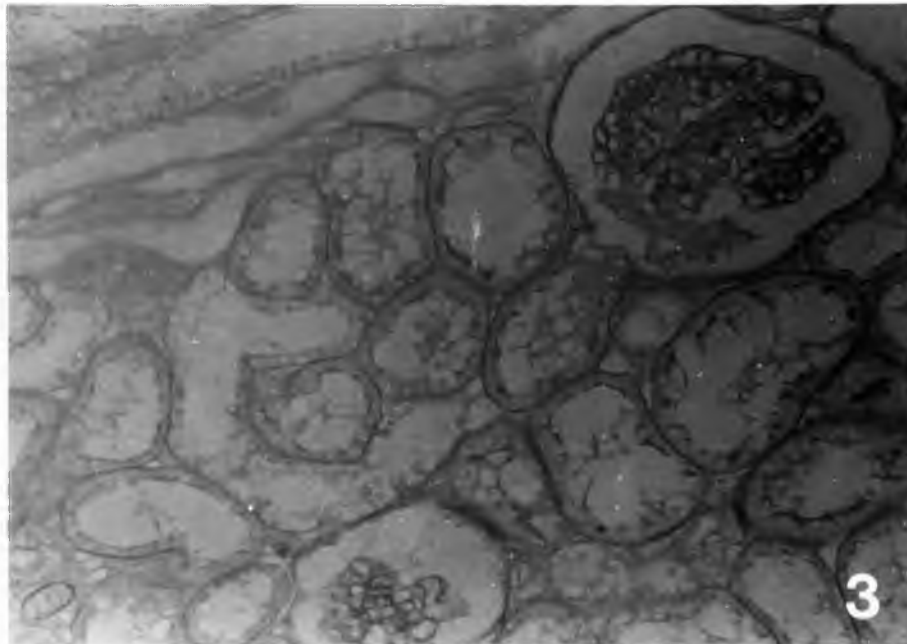


FOTO 3 - Coloração pelo P.A.S. demonstrando a distribuição das bordaduras em escova dos túbulos contornados proximais 24 horas após a infusão do hemolisado. Aumento de 200 X.

FOTO 4 - Regeneração do epitélio tubular, após 96 horas da infusão do hemolisado. Células baixas, alongadas e com pouco citoplasma. Corado pelo H.E. Aumento de 500 X.

cilindros de hemoglobina. É interessante observar que, de todos os caprinos submetidos ao experimento, havia sido retirado parte do volume sangüíneo 48 horas antes da aplicação do hemolisado, sem ter havido reposição da volemia, a não ser através da ingestão "ad libitum" de água. Assim, é possível que a retirada de sangue tivesse resultado em desidratação, alterando as condições de metabolismo celular dos túbulos renais.

Embora as lesões tubulares fossem evidentes, o comprometimento dos glomérulos avaliados através do estudo morfológico do rim foi mínimo.

A regeneração do epitélio tubular demonstra a reversibilidade do processo degenerativo causado pela hemoglobinemia e hemoglobinúria.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente experimento podemos concluir que a hemoglobinemia temporária resultante da aplicação intravenosa de hemolisado homólogo em caprinos, na dose de 15,0 ml por kg de peso corpóreo, causou danos renais evidenciados pelo exame histopatológico do órgão.

PINHEIRO, R.R.; HAGIWARA, M.K.; NURMBERGER, R.; BIRGEL, E.H. Kidney lesions in goats submitted to intravenous treatment with homologous hemolysate. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, 27(1):53-56, 1990.

SUMMARY: The aim of this study was to evaluate the kidney morphological alterations as consequence of hemoglobinemia. Four male and three female goats were treated with homologous hemolysed blood in an amount of 15 ml/kg/body weight. Blood samples were collected from each animal, submitted to mechanical rupture of red blood cells by freezing process and after 48 hours from collection, were given to the same goat. One of the goat was sacrificed 48 hours after blood sample collection, without receiving any treatment and three other were killed at 3, 9 and 24 hours after being treated with hemolysed blood. The remaining three goats were killed 96 hours after being given the treatment. Kidney fragments were stained by hematoxylin and eosin, alizarine and PAS methods. Histopathologic alterations were observed as early as 3 hours after the administration of hemolysed and remained until 24 hours, when the lesions showed to be progressively more severe. The lesions were characterized mainly by the presence of proteic droplets, within tubular cells, hemoglobin casts and tubular regenerations (Microvilli destruction). Signs of tubular regenerations were observed in the specimen from the animals killed at 96 hours.

UNITERMS: Kidney lesions; Hemoglobin; Plasma; Goats

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01-BENJAMIN, M.M. *Outline of veterinary clinical pathology*. Ames, Iowa State University Press, 1978.
- 02-BLACK, R.H. The resorption of haemoglobin by the renal tubules in haemoglobinuria. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 42:90-94, 1948.
- 03-BLOOD, D.C.; HENDERSON, J.A.; RADOSTITS, O.M. *Clínica veterinária*. 5. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1983.
- 04-BRAUN, S.R.; WEISS, F.R.; KELLER, A.I.; CICCONE, J.R.; PREUSS, H.G. Evaluation of the renal toxicity of heme proteins and their derivatives: a role in the genesis of acute tubule necrosis. *J. exp. Med.*, 131: 443-460, 1969.
- 05-FLINK, E.B. Blood transfusion studies. III. The relationship of the pH of urine to renal damage produced by injection of hemoglobin solution in to dogs. *J. Lab. clin. Med.*, 32:223-259, 1947.
- 06-GOLDBERG, M. Studies of the acute renal effects of hemolyzed red blood cells in dogs including estimations of renal blood flow with Krypton 85. *J. clin. Invest.*, 41:2112-2122, 1962.
- 07-HAMILTON, P.B. & FARR, L.E. Preparation of hemoglobin solutions for intravenous infusion. *J. exp. Med.*, 86:455-463, 1947.
- 08-HARRISON, H.E.; BUNTING, H.; ORDWAY, N.K.; ALBRINK, W.S. The pathogenesis of the renal injury produced in the dog by hemoglobin or methemoglobin. *J. exp. Med.*, 86:339-356, 1947.
- 09-JAENIKE, J.R. The renal lesion associated with hemoglobinemia. I. Its production and functional evolution in the rat. *J. exp. Med.*, 123:523-535, 1965.
- 10-JAENIKE, J.R. & SCHNEEBERGER, E.E. The renal lesion associated with hemoglobinemia. II. Its structural characteristics in the rat. *J. exp. Med.*, 123:537-544, 1965.
- 11-JAIN, N.C. *Schalm's veterinary hematology*. 4.ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1986.
Braz. J. vet. Res. anim. Sci., São Paulo, 27(1): 53-56, 1990.

56 PINHEIRO, R.R. et alii.

Alterações renais morfológicas em caprinos submetidos à infusão intravenosa . . .

12-LALICH, J.J. The influence of injections of homologous hemoglobin on the kidney of normal and dehydrated animals. *J. exp. Med.*, 86:153-158, 1947.

13-LIPPMAN, R.W.; UREEN, H.J.; OLIVER, J. Mechanism of proteinuria. IV. Effect of renin on hemoglobin excretion. *J. exp. Med.*, 93:605-613, 1951.

14-MC MANUS, J.F.A. & MOWRY, R.W. *Staining methods histologic and histochemical*. 3.ed. New York, Harper & Row, 1965.

15-YUILE, C.L.; GOLD, M.A.; HINDS, E.G. Hemoglobin precipitation in renal tubules. *J. exp. Med.*, 82:361-375, 1945.

Recebido para publicação em 14/11/89

Aprovado para publicação em 09/01/90