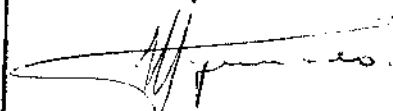


**ANDREA REDONDANO POMPEU**

SECRETARIA  
DE  
PÓS-GRADUAÇÃO  
I. B.

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato(a)  
Andrea Redondano Pompeu  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Campinas 4/12/93



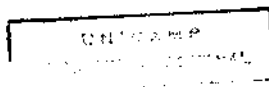
**EFEITO DAS SOLUÇÕES CONSERVADORAS RENAIIS E DA  
HIPOTERMIA SOBRE A ATIVIDADE FAGOCITÁRIA E LIBERAÇÃO  
DE SUPERÓXIDO DE MACRÓFAGOS PERITONIAIS DE  
CAMUNDONGOS, EM CULTURA.**

Tese submetida ao Instituto de Biologia da  
Universidade Estadual de Campinas, para  
a obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Biológicas, na área de Fisiologia.

**ORIENTADOR: DR. José Francisco Figueiredo**

**CO-ORIENTADORA: Dra. Doris Falkenstein**

**Campinas - São Paulo  
1993**



## POR UM ÉRRO DIVINO

Há um consenso  
de muitos  
que a vida  
é a expiação  
de pecados cometidos  
em outras vidas.

Que as ilusões  
são engodos sutís,  
levando-nos  
a cumprir, até o fim,  
penas impostas.

E, que somos  
penitentes e pecadores,  
saldando,  
com sofrimento e dores,  
dívidas  
de um passado incerto.

Mas não.  
Não cremos  
que, por erros  
outrora cometidos,  
tenhamos que pagar  
pecados inconscientes.

Cremos sim  
que a causa  
de tantos desvios  
e desacertos,  
de tanta dor  
e desamor,  
de tanto ódio  
e violência,  
seja mais  
por um erro divino  
de computação.

E tudo se fez,  
para mudar  
a natureza humana.

O dilúvio,  
os mandamentos,  
a vinda de Cristo,  
os santos,  
os profetas,  
os dogmas da igreja,  
o proselitismo das seitas.

Mas, tudo em vão.

Que sobrevivam,  
pelo menos,  
os justos.

DA SANTA

**Aos meus pais,  
pela minha formação  
Ao meu marido,  
pela dedicação  
E ao meu filho, Lucas,  
por fazer tudo valer a pena.**

## ***Agradecimentos Especiais***

### ***Dra Doris Falkenstein***

*pelos ensinamentos prestados durante os anos de convivência.*

### ***Dr. José Francisco Figueiredo***

*pelo apoio, incentivo e "Insight".*

### ***Dra Iara Maria Silva De Lucca e ao Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia - UNICAMP***

*pela gentileza e colaboração na preparação das fotos das lâminas da tese.*

### ***Carla Andrea de Lima Ribeiro***

*pela amizade, ensinamentos e paciência dedicados durante esses anos de convivência.*

### ***Fernanda Lopes da Cunha***

*por tudo...*

### ***José Eduardo Pandossio***

*pela assistência técnica, carinho e amizade*

### ***Dr. José Antônio Rocha Gontijo e Dr Waldir Eduardo Garcia***

*pelo apoio e críticas.*

**Brenelli, Fabiana, Líka, Lilla e Marlene**

*pela grande amizade e convivência.*

**Maria Cecília Bueno Jayme Gallani**

*pelo carinho, amizade e companherismo.*

**Claúdio, Márcia, Marize e Verônica**

*pela amizade e convivência.*

*Aos amigos do Departamento de Fisiologia e Biofísica e do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental e àqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.*

**Este trabalho foi realizado no Laboratório de Conservação de Órgãos , Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, FCM, UNICAMP e teve o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq.**

## **Índice**

Introdução.....	1
Objetivo.....	11
Material e Métodos.....	12
Resultados.....	25
Discussão.....	58
Sumário e Conclusões.....	71
Summary.....	76
Referências Bibliográficas.....	78

## INTRODUÇÃO

Os macrófagos possuem uma longa história, que começou há 130 anos, quando uma grande célula migratória com núcleo não segmentado, foi vista entrar em tecidos lesados e em áreas de Inflamação, fagocitando restos de células vermelhas e várias partículas (Mackness, 1993).

Estas células, assim como os monócitos circulantes e os promonócitos estão sendo agrupados ultimamente em um único Sistema, o Sistema Fagócito-Mononuclear. As células pertencentes a este Sistema apresentam origem comum, morfologia similar e atividades funcionais semelhantes (Johnston Jr., 1988).

Os macrófagos são facilmente cultivados "*in vitro*", se aderem a vidros e a plásticos e se espalham em camadas únicas. Distinguem-se mais por sua capacidade de pinocitose e de fagocitose do que por sua morfologia, a qual é variável e dependente do estado funcional e da localização desta célula no organismo. Estes fagócitos, nome genérico dado aos macrófagos, existem como células fixas ou móveis. As fixas geralmente são fusiformes ou estreladas, com núcleo ovóide e com a cromatina condensada. São encontrados em grande quantidade em tecido



conjuntivo frouxo, paredes de vasos sanguíneos e linfáticos. As células móveis migram por meio de movimentos amebóides, possuindo portanto, uma figura irregular, o seu núcleo tem a cromatina condensada e geralmente apresenta-se na forma de um rim, são encontrados extravascularmente, em tecidos conjuntivos, órgãos maciços e Sistema nervoso Central (Vernon, 1972; Junqueira & Carneiro, 1985).

Nas cavidades pleural e peritoneal os macrófagos são encontrados em sua maioria como móveis ou agarrados às paredes dessas cavidades ocorrendo como células grandes com núcleo denso (Vernon, 1972).

Estes fagócitos podem ainda ser encontrados abundantemente no alvéolo pulmonar, trabécula óssea, aparelho justaglomerular, túbulos renais e no fígado, sendo neste órgão denominados de células de Kupffer (Nathan, 1987; Ziegler-Heitbrock et al. 1991).

Os macrófagos tem papel central e essencial nas respostas imunológicas e inflamatórias, pois possuem a capacidade de apresentar antígenos aos linfócitos, fagocitar micróbios e/ou outras partículas e ainda secretar vários fatores solúveis com ação microstática, fungistática e fisiológica (Nathan, 1987; Johnston Jr., 1988; Sraer et al., 1989; Lohmann-Matthes et al., 1991; Granger et al., 1993).

A capacidade fagocitária apresentada tanto pelos macrófagos fixos quanto pelos móveis, os caracterizam como potentes elementos de defesa, pois podem fagocitar microrganismos, restos de células senescentes, células tumorais e partículas inertes que penetram no organismo (Vanholder et al., 1991; Walter et al., 1991), inclusive vários trabalhos denotam que em muitas doenças, principalmente aquelas caracterizadas por processos infecciosos, verifica-se falha do sistema

imunológico com grande diminuição da atividade fagocitária dos macrófagos, como também de outros leucócitos, o que mais uma vez confirma a importância dessas células na defesa e sobrevivência dos organismos (Bos et al., 1989; Chervu et al., 1992)

O passo fundamental no processo de fagocitose é a fase de adesão, a qual ocorre entre os receptores para o fragmento Fc de imunoglobulinas e para o terceiro componente do complemento (localizados nas membranas plasmáticas dos macrófagos), com as opsoninas, como IgG e C3b, associadas a partículas (Absolom, 1986; Robbins et al., 1986).

A fagocitose revela um estado de ativação dos macrófagos e pode estar relacionada a uma série de outras alterações bioquímicas e funcionais destas células, representada por eventos no citoesqueleto, mobilização do cálcio intracelular, mudanças no conteúdo enzimático das vesículas e expressão de vários genes (Donati et al., 1991). O conceito de macrófago ativado surgiu com o trabalho de Mackness (1960), o qual observou que macrófagos de animais resistentes a uma determinada infecção passavam a ter atividade microbicida aumentada a vários outros patógenos (in Davis et al., 1988; in Turpin et al., 1993)

Os macrófagos quando ativados se tornam maiores, apresentam pronunciadas ondulações na membrana plasmática, aumentam a formação de pseudópodos, a capacidade de adesão e estiramento sobre a superfície de contato, aumentam o número de vesículas pinocíticas, o consumo de oxigênio, como também a atividade fagocitária e liberação de várias substâncias. Enfim, o processo de ativação destes fagócitos leva a uma série de alterações morfológicas, metabólicas e funcionais, que

auxiliam na diferenciação destas células das em repouso (Kvarstein, 1970; Johnston Jr., 1988).

A ativação das células do Sistema Fagócito-Mononuclear pode ser atribuído a um número variável de estímulos na membrana, como microorganismos, células malignas tumorais, fatores quimiotáticos, substâncias químicas, zymosan, látex ou ainda pelo próprio contato da célula com superfícies de vidros e plásticos (Pick & Mizel, 1981; Robins et al., 1986).

As substâncias liberadas pelos macrófagos vêm sendo muito estudadas ultimamente e segundo Nathan (1987) estas células secretam cerca de 100 produtos diferentes de peso molecular que se estende desde 32, os superóxidos, até 44.000 daltons, as fibronectinas.

Os macrófagos podem liberar vários mediadores inflamatórios, como as citoquinas e monoquinas (Interleucina I), secretam compostos vasoconstritores, tromboxanos, e peptídeos, como o Fator de Necrose Tumoral (FNT), o qual nos últimos tempos têm sido muito investigado (Boswell et al., 1988; Boyce et al., 1989; Sraer et al., 1989; Schreiner et al., 1990; Endres et al., 1991; Stefanovic et al., 1992; Remuzzi et al., 1992). Estes fagócitos podem ainda produzir e liberar componentes do complemento, fatores quimiotáticos, fatores de coagulação, fatores que promovem crescimento de alguns tipos celulares (como fibroblastos), proteínas catiônicas, nítritos, nítratos e outros radicais, provenientes da "queima de oxigênio" (Pick & Kelsarl., 1980; Weiss et al., 1982; Freeman et al., 1984; Kitahora et al., 1988; Follin et al., 1990; Gaillard et al., 1991; Vincent et al., 1991).

A "queima de oxigênio" também denominada de "queima respiratória", foi descoberta em 1933, mas completamente ignorada por um

quarto de século. O interesse pelas espécies de oxigênio reativa, denominados genericamente de radicais livres, surgiu novamente com Karnovsky e Quastel em 1960, os quais sugeriram que tais elementos eram letais para os microrganismos (In Babior, 1984). Nesta mesma época Rebeca Gershman e Daniel L. Gilbert propuseram que muitos efeitos danosos do oxigênio eram atribuídos a formação dos radicais livres. Esta idéia foi desenvolvida por Fridovich entre 1975 a 1983, na teoria do superóxido, o qual "*in vivo*" é um dos principais representantes da toxicidade do oxigênio (in Halliwell et al., 1984).

A explosão respiratória, que também é exibida por outros fagócitos (neutrófilos e eosinófilos), além dos macrófagos é geralmente iniciada por sinais, os quais consistem no acoplamento de um receptor com uma proteína G. Esta ligação permite a ativação de fosfolipases que promoveram a hidrólise de fosfolípidos da membrana com consequente formação de segundos mensageiros, 1,4,5-trifosfato inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 provoca liberação de cálcio dos estoques intracelulares, enquanto o DAG ativa uma proteína quinase C, cuja função é ativar uma enzima presente na membrana destes fagócitos, a NADPH OXIDASE (Ortmeyer et al., 1993; Hamilton et al., 1993).

A oxidase é responsável por catalizar a redução do oxigênio, através da transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio, o que resulta na formação de produtos de oxigênio univalentes e divalentes, como os superóxidos e peróxidos de hidrogênio, os quais além de muito reativos são importantes na produção de mais oxidantes reativos, hidroxilas  $\text{OH}^-$  e oxidantes halógenos (Weiss et al., 1982; Babior, 1984).

Existem métodos para se medir a quantidade de superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroxila  $\text{OH}^-$  produzidos pelos fagócitos em

cultura e tais dosagens podem servir, mesmo que de forma indireta, para avaliar a atividade fagocitária e o estado funcional das células (Absolom,1986). A medida do superóxido é baseada na redução do ferricitocromo c, enquanto a do peróxido de hidrogênio é medida pela peroxidase "horseradish" dependente da oxidação do fenol vermelho (Pick & Kelsari,1980; Pick & Mizel,1981).

Os metabólitos de oxigênio, como relatados por muitos trabalhos, estão envolvidos nos mecanismos de defesa, contribuindo para aumentar a atividade microbicida e tumoricida dos macrófagos, assim como de outros leucócitos ( Babor et al.,1973; Gavison et al., 1989; Russo et al.,1989; Camarero et al., 1990; Eze et al., 1990; Oosting et al.,1990).

Ultimamente, tem-se discutido muito que a produção descoordenada e excessiva destes radicais podem induzir lesões celulares. A interação desses reagentes com a membrana celular, a estrutura, o material genético e o metabolismo da célula a leva a lesões e disfunções com conseqüente morte celular (Scherelner et al.,1990; Aalto et al.,1993). Os radicais livres podem reagir com ácidos graxos poliinsaturados que entram na constituição das membranas biológicas, levando a formação de lipoperóxidos e hidroperóxidos, podem induzir a liberação de produtos citotóxicos como hidrolases de lisossomos, proteases e leucotrienos e ainda acredita-se que são capazes de promover lise mitocondrial e de orgânulos citoplasmáticos (Langer,1986).

A literatura tem trazido evidências crescentes do envolvimento dos radicais livres no choque circulatório, lesão isquêmica, e na má preservação de órgão (Parks et al.,1983); na doença de Crohn (Kitahora et al.,1988); artrose, artrite inflamatória, envelhecimento, câncer (Mc Cord,1985; Skaleric et al.,1991), na patogênese de vários modelos

experimentais ou não de doenças renais, como nefrite nefrotóxica aguda (Andreoli et al.,1990), glomerulonefrite experimental (Boyce et al.,1989; Oberle et al.,1992) e em uma série de desordens patológicas (Bulkley,1983).

Alguns trabalhos relatam que em muitas das patologias renais como glomerulonefrite, nefrite intersticial e vasculite, ocorre uma grande infiltração de macrófagos ativados (Schreiner et al., 1978; Hunsicker et al.,1979; Monga et al.,1979; Magill, et al., 1981; Varani, et al., 1992).

Especula-se que a infiltração de leucócitos ativados na reperfusão de um tecido isquêmico, representa uma fonte de substâncias como radicais livres e proteases, os quais contribuem na ampliação da zona de necrose o que poderá levar a insuficiência renal aguda e em determinados casos a perda irreversível e total do órgão. Além disso, a própria isquemia pode levar a alterações nas células e tecidos, os quais quando perfundidos com oxigênio também podem gerar grandes quantidades de radicais livres (Linas et al.,1992).

Segundo alguns autores, como Boyce et al.,1989; Stefanovic et al.,1989 e Andreoli et al.,1990, estas moléculas de oxigênio reativas podem provocar lesões nas células epiteliais tubulares, nas endoteliais do glomérulo, mesangiais e nas células intersticiais.

Tais elementos provocam oxidação de sulfidrilas, o que promove danos a proteínas e membranas; afetam moléculas de DNA; induzem lesões oxidativas, as quais levam a alterações metabólicas, como elevação do cálcio intracelular e depleção de ATP, NAD e alterações morfológicas, como descamação celular. Estes fatores, conseqüentemente, podem promover necrose tubular aguda (Andreoli et al.,1990).

Sabe-se que no transplante o órgão a ser doado pode passar por período de isquemia quente prolongada, sofrendo frequentemente

perda da função e com a reperfusão podem aumentar ainda mais os riscos de lesão tecidual. Rins transplantados podem apresentar disfunções que levam a necrose tubular aguda, o que contribui enormemente para o insucesso do transplante (Parks et al.,1983; Southard & Belzer,1983; Andreoli et al.,1990).

Por outro lado, as interleucinas I também liberadas pelos fagócitos ativados, podem afetar os sistemas de transporte eletrolítico de forma diferente entre os vários segmentos do néfron. Possuem efeito natriurético e diurético. Estimulam a síntese e liberação de prostaglandinas pelas células do mesânglio e do duto coletor papilar de ratos. Induzem a geração de diacilglicerol nas células da porção ascendente espessa de Henle (Schereiner et al.,1990).

Além desses, existem os fatores vasoconstritores, como leucotrienos e especialmente tromboxanos, os quais provocam contração do músculo liso vascular e das células mesangiais através do aumento do cálcio intracelular, o que alteraria a filtração glomerular, como também, todo o processo hemodinâmico do órgão (Boyce et al.,1989). O tromboxano A embora parece ter pouca importância na manutenção da função renal sob circunstâncias fisiológicas, um aumento na sua síntese e liberação tem sido documentado em vários modelos animais de doenças renais e em algumas patologias clínicas (Remuzzi et al.,1992).

Finalmente, várias das substâncias liberadas pelos macrófagos ativados poderiam danificar estruturalmente, morfológica e funcionalmente os constituintes celulares renais.

Ter a capacidade de estocar órgãos inteiros é uma velha ambição do homem. Nos últimos anos, com o crescimento da prática de

transplante de órgãos no tratamento do estágio terminal de doenças, a realização desta ambição tornou-se imperativa (Ribeiro,1992).

A história do transplante renal começou em 1933 e tem se desenvolvido muito nos últimos tempos revelando intercomunicações importantes entre as várias áreas científicas, e a política (Barry,1992). Graças aos avanços tecnológicos ocorridos na área básica, clínica, tais como diálise, imunossupressão, melhora da conservação, e a evolução cirúrgica, está sendo possível realizar transplantes renais rotineiramente e com sucesso.

Várias são as maneiras de se conservar o rim, como armazenamento a frio do órgão após breve perfusão por pressão hidrostática com soluções eletrolíticas preservadoras a frio, perfusão contínua do rim com soluções coloidais ou crioprecipitados de plasma e resfriamento rápido do órgão, através de bombas de fluxo contínuo (Southard & Belzer,1983). Devido ao alto custo desses últimos procedimentos, utiliza-se com mais frequência a perfusão com as soluções eletrolíticas preservadoras, caracterizadas por um custo mais baixo.

Embora seja satisfatório o uso da técnica de perfusão com soluções preservadoras, pouco se sabe ainda acerca dos efeitos dessas soluções sobre a morfologia, fisiologia e atividade das células e tecidos do órgão, aliado ao fato de que a conservação clínica do órgão ainda não preenche todos os requisitos de uma boa conservação, revelando muitas vezes, deficiência na preservação do parênquima renal.

Considerando que os macrófagos poderiam ser uma célula "screening", no estudo do processo de conservação, pois parecem desempenhar papel importante no pós transplante renal, quer pela possível ação ou sua presença no órgão, resolvemos estudar o efeito das



**soluções conservadoras utilizadas no transplante renal sobre a função de macrófagos peritoneais de camundongos, em cultura. Esta atividade funcional será avaliada através da Atividade Fagocitária e da liberação do radical livre, superóxido, de macrófagos após serem conservados.**

## **OBJETIVO**

O presente trabalho pretende avaliar a atividade fagocitária e a liberação do ânion superóxido por macrófagos peritoniais de camundongo, em cultura, após serem conservados por uma e 24 horas a 8°C em diversas soluções empregadas no transplante renal, como a de Collins, Euro-Collins e a solução da Universidade de Wisconsin.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Cultura de célula - Macrófago

Os macrófagos utilizados nos experimentos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos Balb/c de seis a oito semanas de idade. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

A cada experimento, sacrificou-se dois animais para a coleta dos macrófagos. Os camundongos foram anestesiados com éter etílico (MERCK - USA) e após a desinfecção com álcool iodado da região abdominal, a pele foi seccionada de tal forma que o peritônio ficasse exposto. Cerca de 3ml de meio de coleta, uma solução salina balanceada (Hanks) + 2,5U/ml de heparina, a 37°C (Paul,1975) foram injetados na cavidade peritoneal. Após rápida massagem no abdômem, aspirou-se com uma seringa cerca de 3ml de líquido peritoneal, tomando-se o cuidado para não atingir nenhum órgão, o que contaminaria a preparação. O líquido peritoneal foi centrifugado a 2500rpm por 10 minutos.

Em câmara asséptica, tipo fluxo laminar (VECO), devidamente esterilizada com álcool iodado e luz ultravioleta, o sobrenadante do líquido centrifugado foi desprezado e ao precipitado adicionou-se 2ml de meio de cultura RPMI-1640 (INTERLAB sob licença dos laboratórios da Flow - USA) + 80µg/ml do antibiótico gamicina,

homogenizando-se a mistura com uma pipeta automática. Esse homogenato foi diluído para  $10^6$  células/ml, contadas em um hematócrito. Cerca de 200 $\mu$ l do líquido foi pipetado em lâminulas de 24mm, estéreis, contidas em placas de Petri de vidro de 35mm também estéreis. Estas placas foram incubadas em estufa com gaseificação de 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub> (FORMA), a 37°C durante 60 minutos para a adesão dos macrófagos nas lâminulas.

Completado o tempo, as lâminulas foram lavadas com meio de coleta Hanks balanceado a 37° C, por 3 vezes e então a cada placa adicionou-se 2ml de meio nutritivo filtrado, o qual era constituído pelo meio RPMI-1640 + 80 $\mu$ l de gamicina e 10% de Soro Fetal Bovino inativado (CULTILAB) previamente filtrado. As placas foram incubadas novamente na estufa com gaseificação por 48 horas.

### Conservação e estimulação fagocitária dos macrófagos

O procedimento para a conservação foi precedido de lavagem das culturas com meio Hanks, morno por 3 vezes.

A partir dessas culturas foram desenvolvidos os seguintes grupos experimentais, os quais foram realizados em duplicatas:

**GRUPO CONTROLE** - 2ml de meio nutritivo por placa e incubação a 37° C em estufa com gaseificação;

**Grupo I** - 2ml de meio nutritivo por placa e incubação a 8°C;  
(Controle a frio)

**Grupo II** - 2ml de solução de Collins (com Mg++) por placa a 8°C;

**Grupo III** - 2ml de solução de Euro-collins (sem Mg++) por placa a 8°C;

**Grupo IV** - 2ml de solução da Universidade de Wisconsin (UW) sem os aditivos, insulina e dexametasona, por placa a 8°C;

**Grupo V** - 2ml de solução da Universidade de Wisconsin com 40U/l de insulina e 16mg/l de dexametasona, por placa a 8°C;

**Grupo VI** - 2ml de solução da Universidade de Wisconsin + insulina (40U/l), por placa a 8° C;

As lamínulas foram incubadas nas soluções do grupo Controle, Controle a frio e dos grupos II, III e IV por 1 e 24 horas. As lamínulas incubadas nas soluções dos grupos V e VI foram mantidas por apenas 24 horas, nestes meios de conservação.

Após o período de incubação as culturas de macrófagos foram lavadas 3 vezes com Hanks frio.

A estimulação fagocitária sucedeu a conservação. O agente estimulante utilizado foi o Zymosan (SIGMA - USA). A cada placa de Petri foi adicionado sobre as lamínulas 0,2ml de solução de zymosan ( $5 \cdot 10^6$  partículas/ml de meio RPMI-1640), sendo então incubadas a 37° C na estufa com gasificação 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub> durante 30 minutos. Com o término do tempo as culturas foram lavadas por 3 vezes com Hanks a 37°C e posteriormente fixadas e coradas para a análise em microscopia de luz.

O fixador utilizado foi o álcool metílico (MERCK - USA) por 5 minutos e o corante foi o Giemsa (MERCK - USA - 3 gotas/ml de tampão fosfato pH 7,2) durante 20 minutos. Após a coloração as lamínulas foram montadas em lâminas com resina de Entellan (MERCK - USA) e observadas em microscópio de luz ( BAUSCH AND LOMB - USA), sendo então feita a contagem do ÍNDICE DE FAGOCITOSE (% de células que apresentam fagocitose X número médio de partículas fagocitadas) dos macrófagos.

As lâminas foram fotografadas através de uma câmera fotográfica inserida em microscópio de luz (ZEISS - Germany)

### Teste da análise do radical superóxido ( $O_2^-$ )

A análise de  $O_2$  liberado pelos macrófagos em cultura foi realizado apenas nos grupos Controle, I (Controle a frio), II (Collins), III (Euro-Collins) e IV (UW sem os aditivos insulina e dexametasona).

A dosagem do superóxido foi baseada em uma reação de oxí-redução, na qual o reagente ferricitocromo c foi reduzido pelo radical. A quantidade de ferricitocromo c reduzida foi verificada por espectrofotometria.

Imediatamente após a lavagem das culturas por 3 vezes com Hanks sem fenol vermelho a 37°C, cada placa de Petri contendo uma cultura de macrófagos foi coberta com 3ml da mesma solução de lavagem mais 80µM da solução de ferricitocromo c de coração de cavalo (TIPO VI - SIGMA - USA; 30mg/ml de Hanks sem fenol vermelho) e 5.10<sup>6</sup> partículas de zymosan/ml de solução, sendo posteriormente incubadas em estufa com gasificação 95%  $O_2$  - 5%  $CO_2$  a 37°C por 60 minutos. Cerca de 1,5ml da mistura de cada placa foi mantida no gelo, servindo assim, de BRANCO da sua própria amostra (Van Oss, 1986).

Ao término do tempo de incubação, as soluções das placas com macrófagos foram transferidas para tubos e centrifugadas a 2000rpm a 4°C para remoção de células e partículas estimulantes - zymosan (Pick & Mizel, 1981). As amostras obtidas foram lidas em um espectrofotômetro (MICRONAL) a 550nm. Em cada experimento algumas placas escolhidas aleatoriamente receberam além dos reagentes descritos acima, 300U/ml de solução de superóxido dismutase (SIGMA - USA; 3mg/ml

de H<sub>2</sub>O deionizada), servindo assim como placas controles da dosagem do radical superóxido. Como a superóxido dismutase (SOD) é uma sequestradora do ânion superóxido, nestas placas se ocorrer reação com o ferricitocromo c, não será devido ao O<sub>2</sub><sup>-</sup> e sim a outros fatores inerentes da preparação

A quantidade de superóxido liberada foi expressa em nanomoles de O<sub>2</sub><sup>-</sup> / mg de proteína X tempo de incubação em ferricitocrome c.

Nanomoles de O<sub>2</sub><sup>-</sup> foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Nanomoles de O}_2^- = A.V.47,4 \text{ (Absolom, 1986)}$$

onde A = Absorbância a 550nm da amostra reduzida - oxidada (Branco) ;

V = Volume da mistura (ml) incubada.

O valor 47,4 é um índice calculado com base na mudança de absorbância de 1 a 550nm, que corresponde a presença de 47,4 nanomoles de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Para o cálculo desse valor considerou-se o coeficiente de extinção do ferricitocrome c ( $21.10^3 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) e a distância percorrida pela luz na amostra (~ 3mm).

A quantidade de proteína requerida neste cálculo foi determinado pelo método de Lowry et all (1951).



### Dosagem de proteína pelo Lowry

Cada placa de Petri com cultura foi coberta com 1ml de NaOH 1N e permaneceu na estufa a 37° C por uma noite.

No dia seguinte foi executado o ensaio de Lowry, o qual consistiu em misturar 10µl do homogenato celular com 0,5ml de H<sub>2</sub>O destilada e 5ml de um reagente A. Após agitar a mistura esperou-se 10 minutos para adicionar 0,5ml de um reagente B - FOULIN (Qeel-USA). Este preparado é lido em um espectrofotômetro a 660nm.

As absorbâncias obtidas foram plotadas em uma curva padrão, para se determinar as concentrações das proteínas nas amostras experimentadas. A curva padrão foi realizada com albumina bovina (MERCK - USA) nas concentrações de 2, 1, 0,5 e 0,25 mg/ml de H<sub>2</sub>O deionizada.

Reagente A- Misturou-se os reagentes na seguinte ordem :

- 1 - Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2g% em NaOH 0,1N (10V);
- 2 - Tartarato de sódio e potássio 2g% em H<sub>2</sub>O (0,1V);
- 3 - Sulfato de cobre 1g% em H<sub>2</sub>O (0,1V).

Reagente B - Diluiu Foulin calciton em H<sub>2</sub>O destilada 1:1 no momento do uso.

Composição das solução de coleta - Hanks (Paul,1975)

NaCl	136,89mM
KCl	5,36mM
NaHCO <sub>3</sub>	4,16mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,34mM
MgSO <sub>4</sub>	0,81mM
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	1,26mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,44mM
Glicose	5,55mM
Fenol Vermelho	0,06mM
Osmolaridade (mOsm/Kg/H <sub>2</sub> O)	290mOsm
pH	7,2

**Composição do meio de cultura RPMI-1640 (Paul,1975)**

É uma solução salina, como o Hanks enriquecido com as seguintes substâncias (mg/l):

L-Arginina	200
L-Aspargina	50
L-Ácido Aspártico	20
L-Cistina	50
L-Ácido Glutâmico	20
L-Glutamina	300
Glututona(reduzida)	1
Glicina	10
L-Histidina	15
L-Hidroxi prolina	20
L-Isoleucina	50
L-Leucina	50
L-Lisina	40
L-Metionina	15
L-Fenilalanina	15
L-Prolina	20
L-Serina	30
L-Treonina	20

<b>L-Triptofano</b>	<b>0,5</b>
<b>L-Tirosina</b>	<b>20</b>
<b>L-Valina</b>	<b>20</b>
<b>Blotina</b>	<b>0,2</b>
<b>VitaminB<sub>12</sub></b>	<b>0,005</b>
<b>D-Ca Pantotenao</b>	<b>0,25</b>
<b>Colina Cl</b>	<b>3</b>
<b>Acido Fólico</b>	<b>1</b>
<b>I-Inositol</b>	<b>35</b>
<b>Nicotidamida</b>	<b>1</b>
<b>Ác. Paraminobenzóico</b>	<b>1</b>
<b>Piridoxina HCl</b>	<b>1</b>
<b>Riboflavina</b>	<b>1</b>
<b>Tiamina HCl</b>	<b>0,2</b>
<b>Osmolaridade</b>	<b>280mOsm</b>
<b>(mOsm/Kg/H<sub>2</sub>O)</b>	
<b>pH</b>	<b>7,2</b>

Composição das soluções conservadoras utilizadas no transplante renal

A- Solução de Collins e Euro-Collins (Dreikorn et al., 1980; Rijkmans et al., 1982; Figueiredo et. al., 1986a )

SAIS	COLLINS	EURO-COLLINS
NaHCO <sub>3</sub>	10mM	10mM
KCL	15mM	15mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15mM	15mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	42mM	42mM
Glicose	139mM	139mM
MgSO <sub>4</sub>	28mM	—
<b>Omolaridade</b>	<b>320</b>	<b>300</b>
(mOsm/Kg/H <sub>2</sub> O)		
<b>pH (ajuste com HCl 1N)</b>	<b>7,0</b>	<b>7,0</b>

B- Solução da Universidade de Wisconsin (Du Pont - USA) (Belzer, et. al., 1988)

### SAIS

Pentafraction (Hidróxido de amido)	50g/l
Ac. Lactobiônico (lactobionato de K <sup>+</sup> )	100mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25mM
MgSO <sub>4</sub> heptahidratado	5mM
Adenosina	5mM
Alopurinol	1mM
Glutathiona total	3mM
Rafinose	30mM
Osmolaridade	320
(mOsm/Kg/H <sub>2</sub> O)	
pH	7,4

## Análise estatística

Todos os resultados foram apresentados como valores individuais, média e erro padrão da média (EPM).

Análise estatística empregada para comparação intergrupos foi a de Variância corrigida por Bonferroni com nível de significância  $p < 0,008$ .

Em alguns casos utilizou-se teste t de Student não pareado com  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

A proposta deste trabalho foi avaliar a atividade funcional de macrófagos peritoneais em cultura, quando conservados a 8° C por 1 e 24 horas em várias soluções conservadoras utilizadas atualmente no transplante renal.

### A - Atividade Fagocitária

A atividade fagocitária dos macrófagos estudados foi quantificada através do Índice Fagocitário ou de Fagocitose, o qual se refere a porcentagem de células que apresentam fagocitose multiplicado pelo número médio de partículas fagocitadas.

#### I - Conservação durante uma hora

Na tabela 1 e figura 1 estão representados os valores individuais, a média e o erro padrão da média dos Índices Fagocitários de macrófagos do grupo Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a 37°C) e dos



grupos experimentais I - Controle a frio (Melo RPMI-1640 + SFB a 8°C), II - Solução de Collins, III - Euro-Collins e IV - Solução da Universidade de Wisconsin (UW) sem os aditivos Insulina e dexametasona, conservados por uma hora a 8° C.

Com este período de conservação apenas os fagócitos conservados em solução de Euro-Collins (n=12) a 8°C são diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do grupo Controle (Melo RPMI-1640 + SFB a 37°C; n=18). Macrófagos mantidos nesta solução conservadora por uma hora apresentaram baixo Índice de Fagocitose ( $145 \pm 15$ ), quando comparado ao grupo constituído de Melo RPMI-1640 + SFB a 37° C ( Controle), o qual é caracterizado por um Índice de  $230 \pm 19$ .

A figura 2 traz uma análise mais detalhada da relação entre as soluções conservadoras. Nota-se que as células do grupo III (Euro-Collins) também apresentaram-se diferente ( $p < 0,008$ ) dos macrófagos conservados em solução de Collins (n=15),  $228 \pm 17$  e em UW sem aditivos (n=14),  $254 \pm 17$ .

O Índice Fagocitário dos macrófagos mantidos em Melo RPMI-1640 + SFB a 8°C (I -Controle a frio) por uma hora (N=10) foi de  $192 \pm 20$  e não difere pela estatística aplicada ( $p < 0,008$ ) dos grupos experimentais de Collins, UW sem aditivos e nem de Euro-Collins.

## II - Conservação durante 24 horas

A tabela 2 e figura 3 apresentam os valores individuais, a média e erro padrão da média dos Índices Fagocitários de macrófagos

**TABELA 1. Valores Individuais e a média + EPM dos Índices Fagocitários de macrófagos peritoneais de camundongo em cultura dos grupos Controle(C), Controle a frio(Meio RPMI-1640 + Sôro Fetal Bovino a 8°C - I) e dos conservados em solução de Collins(II), Euro-Collins (III) e em solução da Universidade de Wisconsin sem aditivos (IV) por 1 hora a 8°C.**

	GRUPOS				
	C n=18	I n=10	II n=15	III n=12	IV n=14
<b>Índice Fagocitário</b>	365	-	149	89	-
	125	-	283	-	-
	361	239	218	267	378
	203	-	292	90	312
	238	312	234	169	222
	136	205	156	150	277
	224	140	150	100	239
	128	149	265	111	294
	238	274	244	196	328
	255	-	290	-	-
	146	176	314	127	219
	234	-	-	126	199
	170	120	105	-	182
	307	-	286	-	-
163	149	197	146	172	
276	158	240	166	178	
238	-	-	-	243	
146	-	-	-	315	
<b>X</b>	<b>230</b>	<b>192</b>	<b>228</b>	<b>146 *</b>	<b>254</b>
<b>± EPM</b>	<b>+19</b>	<b>+20</b>	<b>+17</b>	<b>+15</b>	<b>+17</b>

\*Teste t não pareado ( $p < 0,05$ ): Controle X grupos Experimentais.

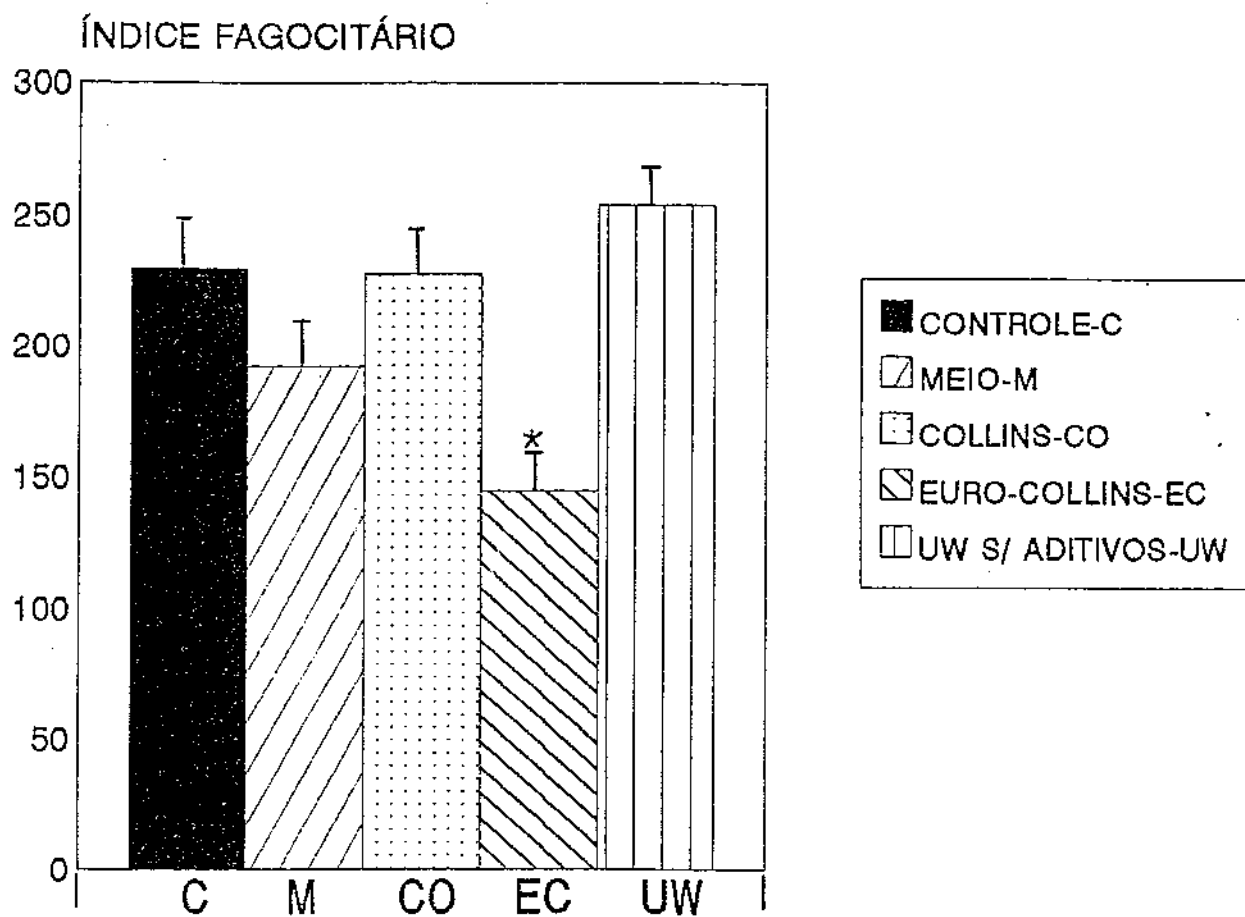
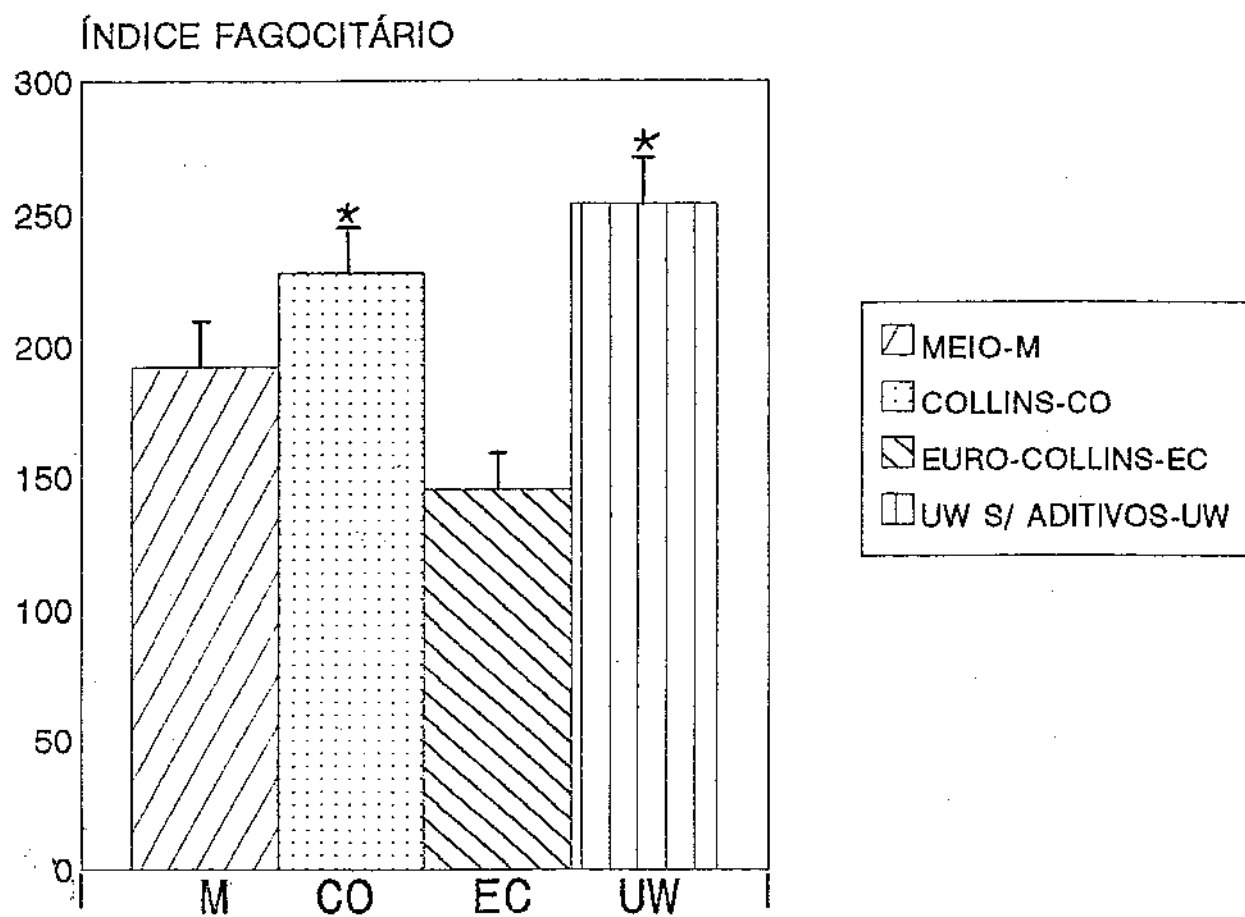


Figura 1. Índice Fagocitário de macrófagos peritoneais de camundongo em cultura, do grupo Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a 37°C - C), Controle a frio (Meio RPMI-1640 + SFB a 8°C - M) e dos conservados em Collins (CO), Euro-Collins(EC) e em solução da Universidade de Wisconsin sem aditivo(UW) a 8°C por uma hora.  
 \* Teste t não pareado( $p < 0,05$ ): Controle X demais grupos.



**Figura 2.** Índice Fagocitário de macrófagos peritoneais de camundongo em cultura dos grupos experimentais Melo RPMI-1640 + SFB a 8°C (Controle a frio - M) Collins(CO), Euro-Collins(EC) e solução da Universidade de Wisconsin sem aditivos(UW) conservados a 8°C por uma hora.

\* Análise de variância (ANOVA) corrigida por Bonferroni( $p < 0,008$ ) Euro-Collins X demais grupos experimentais.

Controle e dos grupos experimentais I (n=05), II (n=08), III (n=09) e IV (n=10), conservados por 24 horas a 8°C.

Com o aumento do tempo de conservação, observa-se que todos os grupos experimentais mostraram redução significativa ( $p < 0,05$ ) no Índice de Fagocitose em relação ao Controle ( $230 \pm 19$ ).

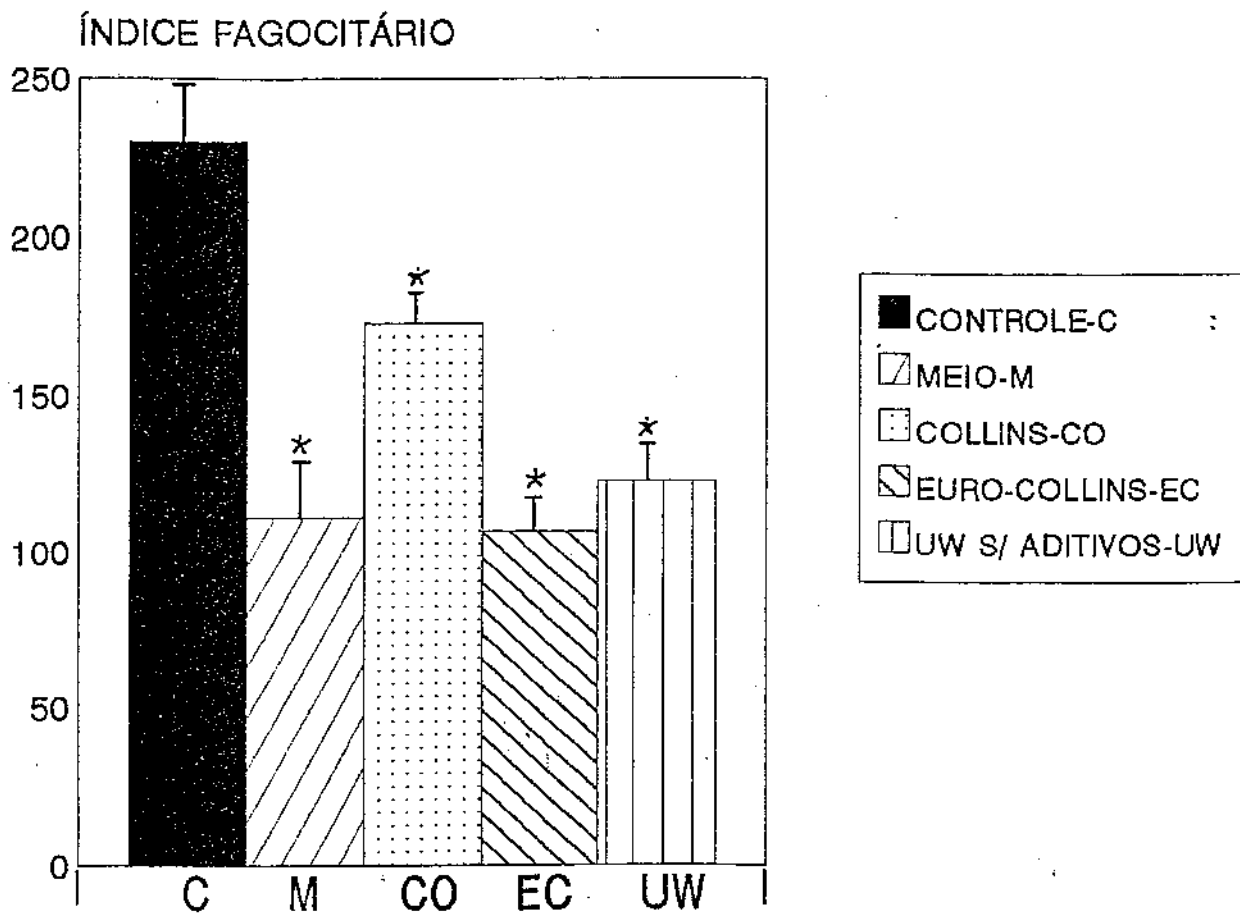
Os grupos experimentais I, II, III, e IV conservados a 8°C por 24 horas foram comparados na figura 4. Neste gráfico, o grupo II, macrófagos conservados em Collins a 8°C, apresentaram um Índice de Fagocitose,  $173 \pm 9$ , que se caracteriza diferente estatisticamente ( $p < 0,008$ ) dos Índices dos demais grupos. Embora, os macrófagos conservados em Collins também mostrassem queda da atividade Fagocitária com o aumento do tempo de conservação de uma ( $228 \pm 17$ ) para 24 horas ( $173 \pm 9$ ), este grupo quando comparado aos demais grupos experimentais (I =  $111 \pm 20$ ; III =  $107 \pm 11$ ; e IV =  $123 \pm 11$ ) foi o que apresentou o maior Índice Fagocitário.

A solução da Universidade de Wisconsin que caracteriza o grupo IV não possui os aditivos insulina e dexametasona, os quais são adicionados à esta solução quando é utilizada na clínica. Devido a isto alguns experimentos foram realizados com o intuito de verificar se estes aditivos alterariam a atividade fagocitária de macrófagos peritonais em cultura. O grupo constituído por UW mais insulina e dexametasona foi determinado de V. De acordo com a figura 5 verifica-se uma queda extraordinária no Índice de Fagocitose de macrófagos conservados em UW mais aditivos a 8°C por 24 horas (n=06). O Índice encontrado foi de  $39 \pm 6$ , enquanto o do grupo de UW sem aditivos conservados na mesma temperatura e pelo mesmo período de tempo foi de  $123 \pm 11$ , como dito anteriormente.

**TABELA 2.** Valores individuais e a média + EPM dos Índices Fagocitários de macrófagos peritoneais de camundongo em cultura, do grupo Controle(C), Controle a frio(Melo RPMI-1640 + Soro Fetal Bovino a 8°C - I), e conservados em solução de Collins (II), Euro- Collins (III) e em solução da Universidade de Wisconsin sem aditivos(IV), por 24 horas a 8°C.

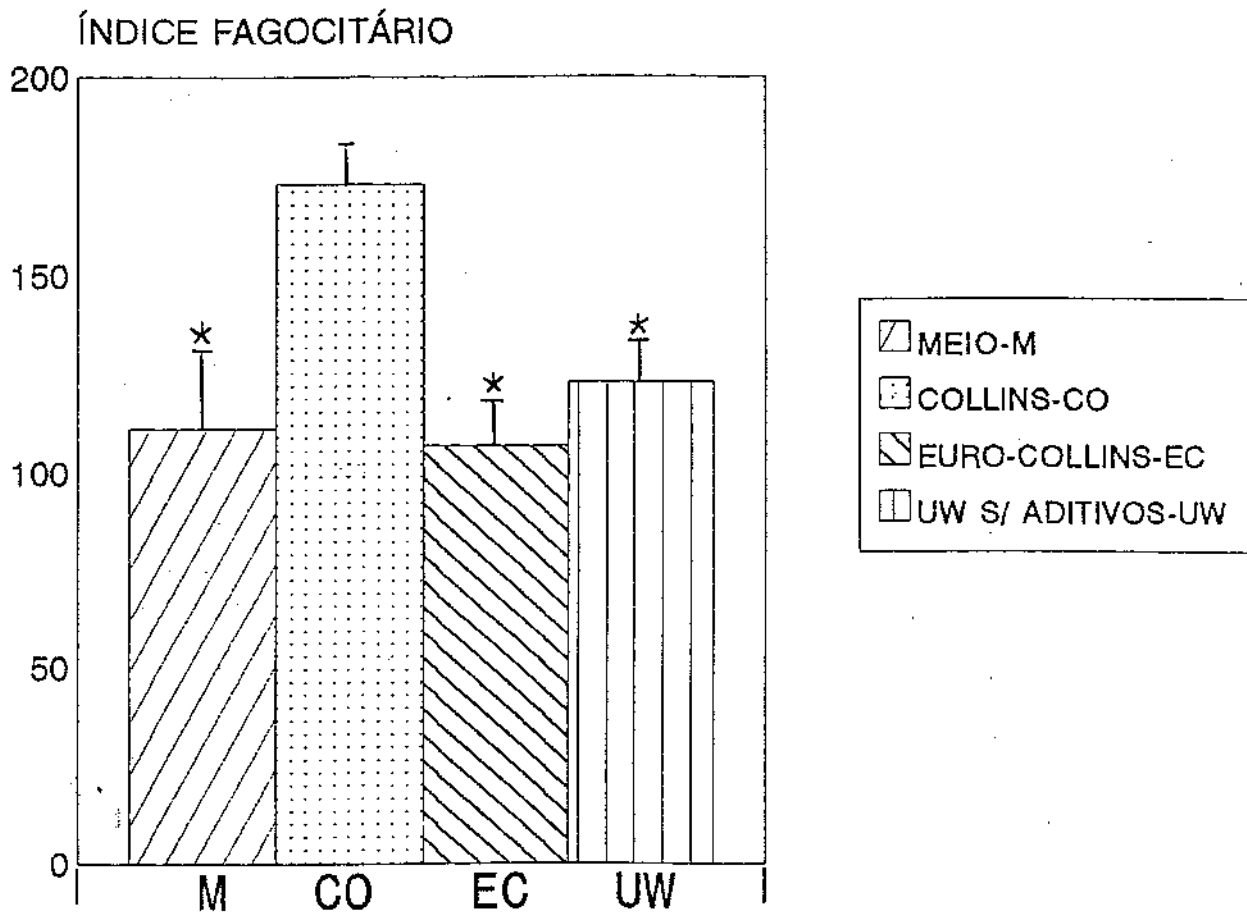
	GRUPOS				
	C n=18	I n=05	II n=08	III n=09	IV n=10
Índice Fagocitário	224	81	151	118	136
	125	-	-	86	54
	276	144	220	93	120
	128	-	-	-	-
	238	158	154	119	127
	136	-	-	-	130
	266	-	199	124	-
	203	-	-	-	-
	194	53	144	66	80
	365	-	-	-	-
	361	120	182	169	-
	379	-	-	-	-
	276	-	163	66	177
307	-	-	-	-	
170	-	174	125	158	
146	-	-	-	-	
234	-	-	-	130	
163	-	-	-	122	
X	230	111*	173*	107*	123*
EPM	+19	+20	+09	+11	+11

\*Teste t não pareado ( $p < 0,05$ ): Controle X grupos Experimentais.



**Figura 3.** Índice Fagocitário de macrófagos peritoneais de camundongo em cultura, do grupo Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a 37°C - C), mantidos em Meio RPMI-1640 + SFB a 8°C (Controle a frio - M) e dos conservados em solução de Collins (CO), Euro- Collins (EC) e em solução da Universidade de Wisconsin sem aditivos (UW), conservados a 8°C durante 24 horas.

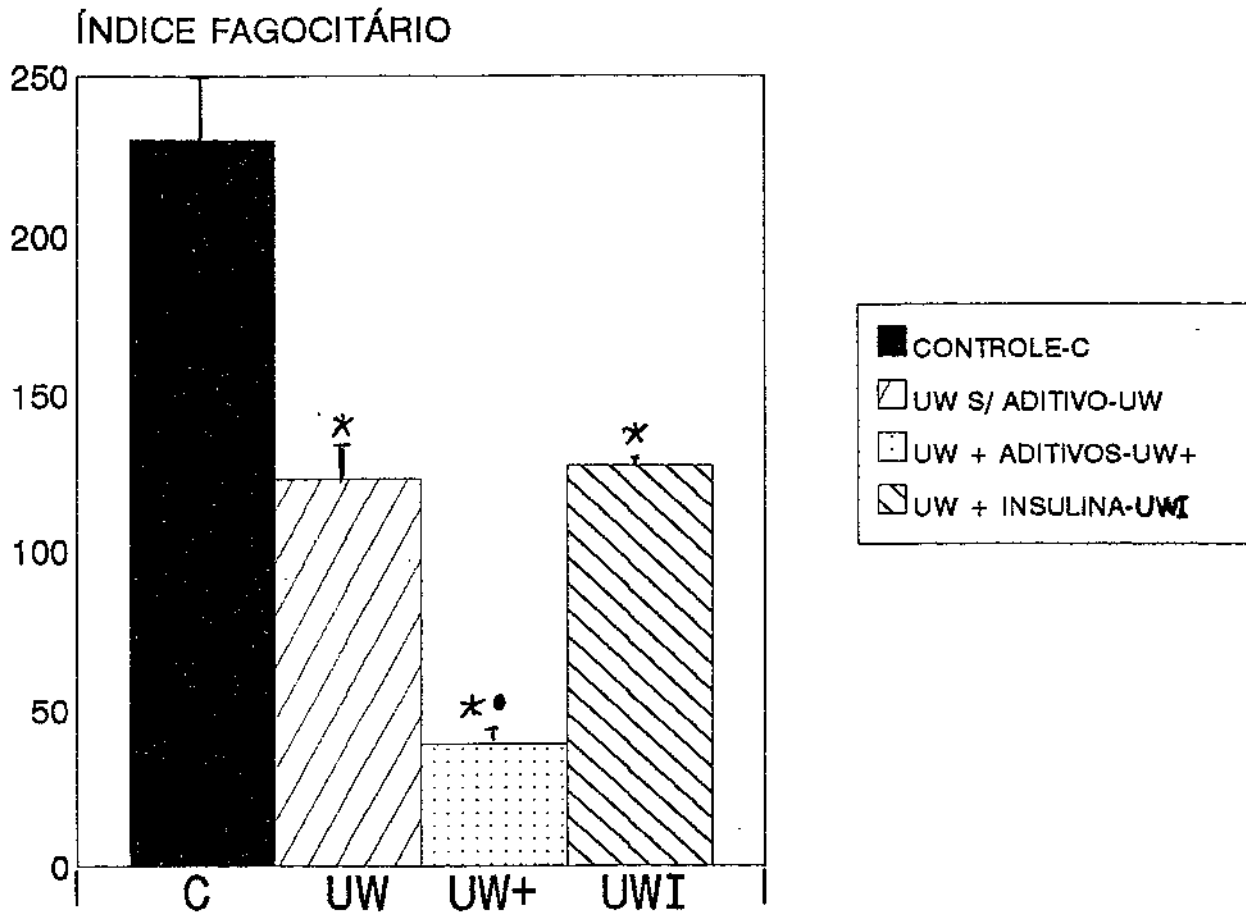
\* Teste t não pareado ( $p < 0,05$ ): Controle X grupos experimentais.



**Figura 4.** Índice Fagocitário de macrófagos peritoneais de camundongo em cultura dos grupos experimentais Meio RPMI-1640 + SFB a 8°C (Controle a frio - M), Collins (CO), Euro-Collins (EC) e solução da Universidade de Wisconsin sem aditivos (UW) conservados a 8°C por 24 horas.

\* Análise de Variância (ANOVA) corrigida por Bonferroni (p, 0,008) Collins X demais grupos experimentais.





**Figura 5.** Índice Fagocitário de macrófagos peritoneais de camundongo em cultura do grupo Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a 37°C e dos conservados por 24 horas em solução da Universidade de Wisconsin sem aditivos (UW), em UW com os aditivos insulina (40U/ml) e dexametasone(16mg/ml)- UW+ e em UW apenas com o aditivo Insulin (UWI) a 8°C.

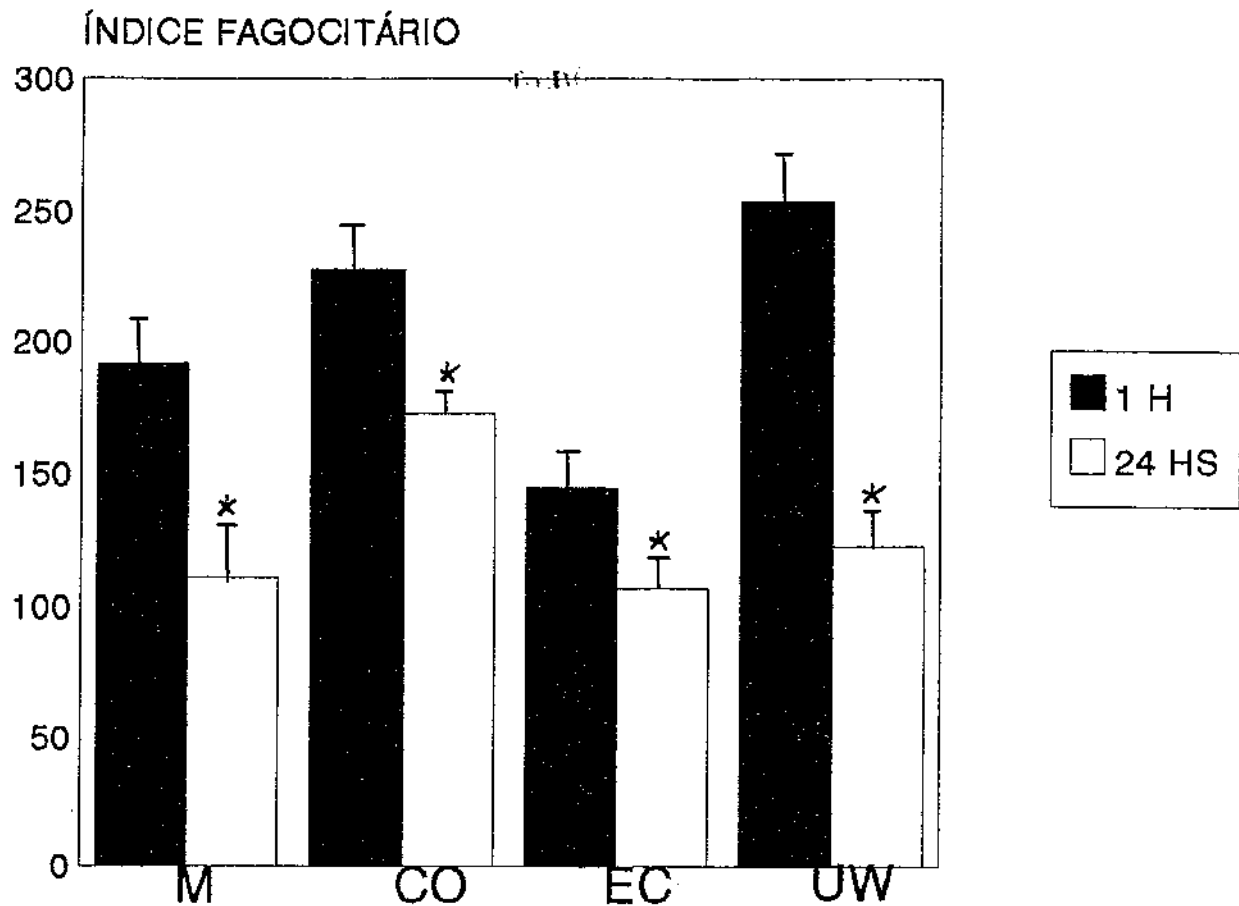
\* Teste t não pareado ( $p < 0,05$ ): Controle X grupos experimentais.

• Teste t não pareado ( $p < 0,05$ ): UW X UW+ e UWI

É muito conhecido da literatura que a dexametasona, um glicocorticoide, é inibidor da atividade de macrófagos (Chlora et al, 1991). Assim, foram realizados alguns experimentos (n=3), objetivando avaliar tal afirmação. O grupo VI foi então constituído por fagócitos mononucleares conservados em UW apenas com insulina a 8°C por 24 horas. As células apresentaram um Índice Fagocitário de  $127 \pm 0,6$ , o qual não difere estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do Índice do grupo de UW sem aditivos conservados na mesma temperatura pelo mesmo período de tempo. Este grupo não difere também do Controle (Melo RPMI-1640 + SFB a 37°C), mas sim do grupo de UW mais aditivos (Figura 5). Assim, a dexametasona parece ser o elemento causador da queda da atividade fagocitária de macrófagos peritoniais em cultura conservados em solução da Universidade de Wisconsin mais aditivos a 8°C por 24 horas.

### III - Uma hora X 24 horas de conservação

Com os dados obtidos pode-se evidenciar na figura 6, que as células de todos os grupos experimentais apresentaram queda expressiva e significativa do Índice Fagocitário quando conservadas por 24 horas em comparação à conservação por apenas uma hora. Macrófagos conservados em UW sem aditivos mostraram uma queda surpreendente da Atividade Fagocitária com o aumento do tempo de conservação. Com apenas uma hora de conservação a 8°C os fagócitos desse grupo exibiram um Índice de  $254 \pm 17$ , enquanto que, com 24 horas de conservação mostraram um valor de  $123 \pm 11$ .



**Figura 6.** Índice Fagocitário de macrófagos peritoneais de camundongo em cultura mantidos por uma e 24 hora em Meio RPMI-1640 + SFB a 8°C (Controle a frio - M) e conservados em Collins (CO), Euro-Collins (EC) e em solução da Universidade de Wisconsin sem aditivos (UW), a 8°C.

\* Teste t não pareado ( $p < 0,05$ ): Uma X 24 horas.

Os dados demonstram a importância do tempo de conservação na alteração da Atividade Fagocitária de macrófagos peritoniais em cultura.

## B - Liberação do ânion superóxido

Os valores de superóxido liberados são expressos em nanomoles de  $O_2$  / mg de proteína X tempo de incubação dos macrófagos em ferricitocromo c. A quantidade de proteína encontrada pelo método de Lowry foi em média de  $0,11 \pm 0,03$  mg por placa de Petri contendo uma cultura de macrófago.

Antes de iniciar os protocolos experimentais, resolveu-se avaliar a liberação da espécie de oxigênio reativo, o ânion superóxido, quando macrófagos eram mantidos em condições Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a  $37^\circ C$ ) mas sem serem estimulados com partículas de zymosan. Foram realizados 8 experimentos, com os quais obteve-se a média e erro padrão da média de  $0,84 \pm 0,09$ . Tal valor é estatisticamente menor ( $p < 0,05$ ) que o encontrado para o Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a  $37^\circ C$ ;  $n=14$ ),  $1,35 \pm 0,13$ , cujas células desse grupo foram estimuladas com  $5.10^6$  partículas de zymosan/ ml de solução.

Os valores apresentados por macrófagos mantidos em condições Controle, meio RPMI-1640 + SFB a  $37^\circ C$  estão de acordo com os dados encontrados na literatura (Pick & Mizel, 1981; Russo et al, 1989). Isto

não ocorre com o grupo não estimulado, pois os dados da literatura se expressam com valores mais baixos ( $\sim 0,2 \pm 0,1$ ), aos encontrados no nosso laboratório, o que pode sugerir que em nossas condições de trabalho as células já apresentam um certo grau de estimulação.

### I - Conservação durante uma hora

A tabela 3 e figura 7 mostram os valores individuais, a média e erro padrão da média em nanomoles de  $O_2$  / mg de proteína X tempo dos macrófagos Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a 37°C), mantidos em meio RPMI-1640 + SFB a 8°C (I-Controle a frio) e dos conservados em solução de Collins (II), Euro-Collins(III) e em solução da Universidade de Wisconsin sem aditivos (IV) a 8°C por uma hora . Os fagócitos mononucleares conservados em meio RPMI-1640 + SFB a 8°C (n=06) e em solução de Euro-Collins (n=08) produziram pouca quantidade ( $p < 0,05$ ) do ânion superóxido ( $0,61 \pm 0,08$  e  $0,40 \pm 0,13$ , respectivamente), quando comparados ao grupo Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a 37°C),  $1,35 \pm 0,13$ .

Na figura 8 são expressos e analisados apenas os grupos experimentais. O grupo III de Euro-Collins mostra-se diferente estatisticamente ( $p < 0,08$ ) dos grupos de macrófagos conservados em Collins (n=06),  $1,10 \pm 0,11$ , e em UW sem aditivos, que também é caracterizado por um n=06 e determina um valor de  $1,24 \pm 0,10$ . No mesmo gráfico nota-se ainda que o grupo II - Meio RPMI-1640 + SFB a 8°C (n=06) também apresenta pouca liberação do ânion superóxido quando comparado aos grupos de Collins e UW sem aditivos.

TABELA 3. Valores individuais e a média  $\pm$  EPM da quantidade de O<sub>2</sub> liberada em nanomol / mg protelna X tempo de incubação em ferricitocrome c , de macrófagos peritoniais de camundongo em cultura, Controle (C), Controle a frio(Melo RPMI-1640 + Sôro Fetal Bovino a 8°C - I), e conservados em solução de Collins (II), Euro-Collins (III) e em solução da Universidade de Wisconsin sem aditlvos (IV), por 1 hora a 8°C.

	GRUPOS				
	C n=14	I n=6	II n=6	III n=8	IV n=6
LIBERAÇÃO DE O <sub>2</sub> EM NANOMOLES O <sub>2</sub> / MG PROT. X TEMPO	1,50	0,40	1,00	0,50	1,5
	1,60	0,70	-	-	1,00
	1,10	-	-	-	-
	0,70	0,82	1,60	0,55	1,40
	1,90	-	-	0,57	-
	2,00	-	-	-	-
	0,97	0,80	1,10	0,27	1,40
	0,87	-	0,85	0,32	-
1,14	-	-	-	-	
1,85	0,52	1,00	0,25	0,94	
0,90	-	-	0,33	-	
1,30	-	-	-	-	
0,90	0,40	0,89	0,44	1,20	
2,10	-	-	-	-	
X +EPM	1,35 +0,13	0,61 * +0,08	1,10 +0,11	0,40* +0,05	1,24 +0,10

\*Teste t não pareado (p<0,05): Controle X grupos Experimentais.

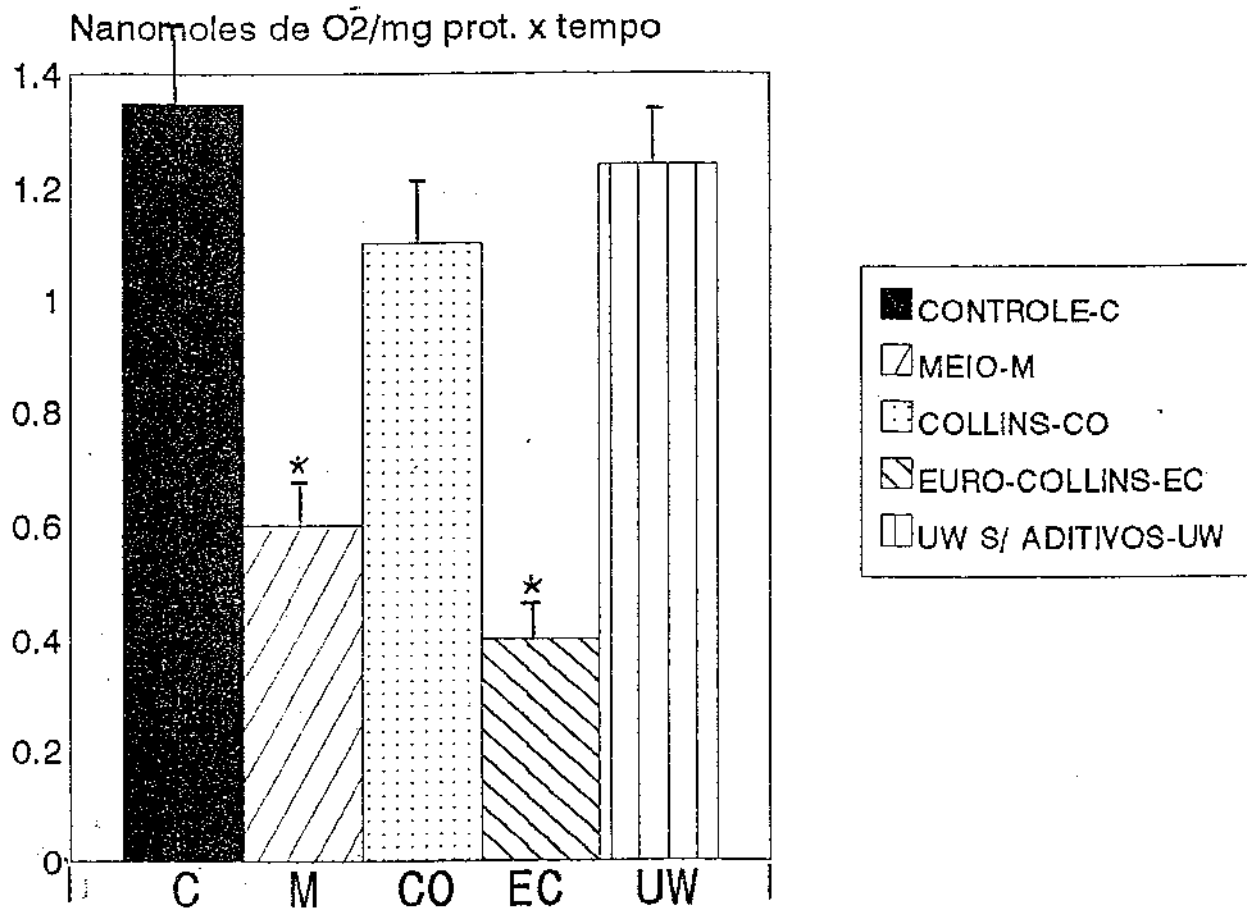


Figura 7. Nanomoles de  $O_2$  / mg de proteína X tempo , liberados por macrófagos peritoniais de camundongo em cultura, do grupo Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a 37°C - C), Controle a frio (Meio RPMI-1640 + SFB a 8°C - M) e dos conservados em Collins (CO), Euro-Collins (EC) e em solução da Universidade de Wisconsin sem aditivos (UW) a 8°C durante uma hora.

\* Teste t não pareado ( $p < 0,05$ ): Controle X grupos experimentais.

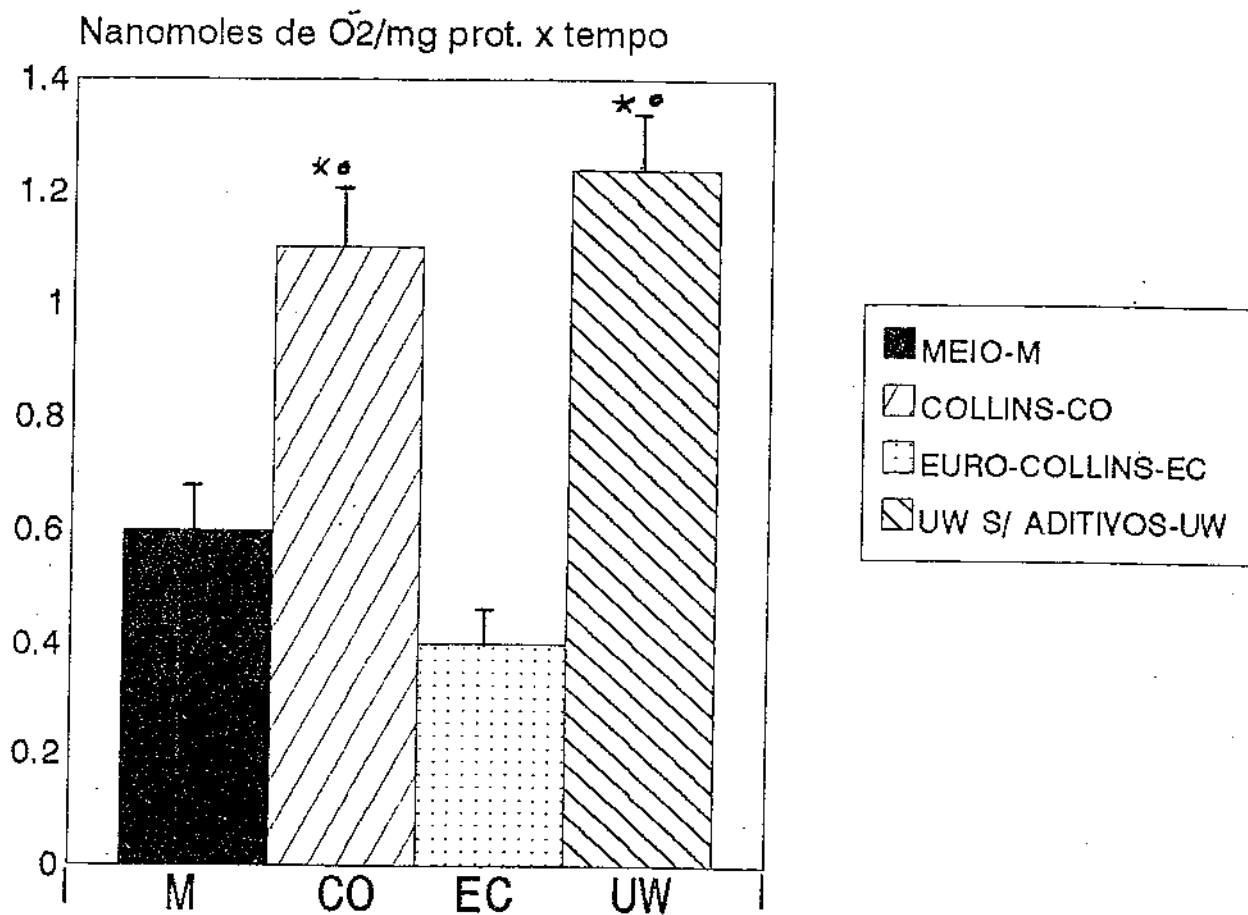


Figura 8. Nanomoles de  $\text{O}_2$  / mg de proteína X tempo, liberados por macrófagos peritoniais de camundongo em cultura, dos grupos Melo RPMI-1640 + SFB a  $8^\circ\text{C}$  (Controle a frio - M), solução de Collins (CO), Euro-Collins (EC) e em solução da Universidade de Wisconsin (UW), a  $8^\circ\text{C}$  por uma hora.

- \* Análise de Variância (ANOVA) corrigida por Bonferroni ( $p < 0,008$ ) Melo X demais grupos;
- Análise de Variância (ANOVA) corrigida por Bonferroni ( $p < 0,008$ ) Euro-Collins X demais grupos.



## II - Conservação durante 24 horas

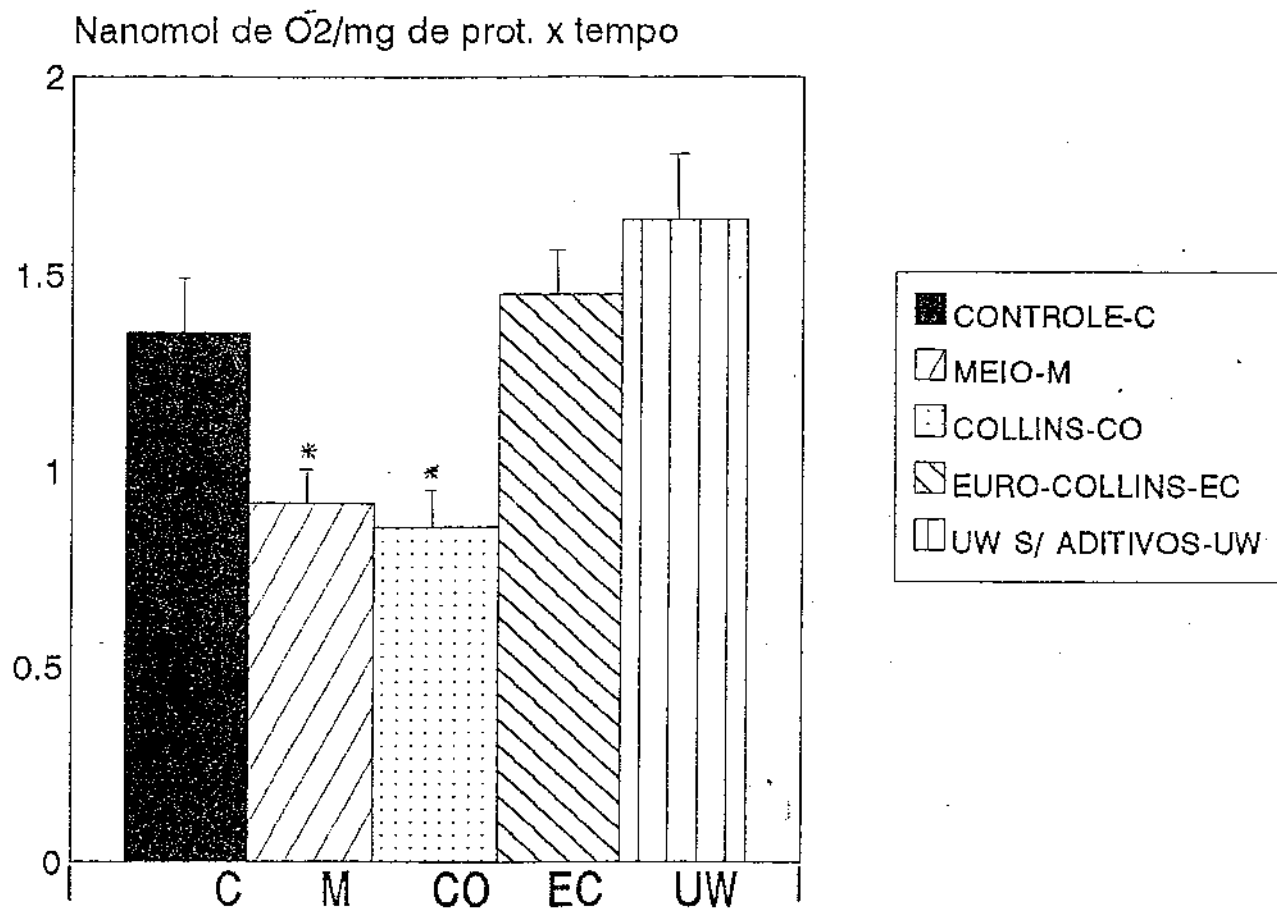
Na tabela 4 e figura 9 constam os dados referentes à produção de superóxido por macrófagos do grupo Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a 37°C); mantidos em meio RPMI-1640 +SFB (I-Controle a frio) e dos conservados em solução de Collins (II), Euro-Collins (III) e em solução da Universidade de Wisconsin sem insulina e dexametasona (IV) a 8 C por 24 horas.

O grupo Controle a frio (Meio RPMI-1640 + SFB a 8°C; n=14) continua apresentando baixa liberação ( $p < 0,05$ ) do radical superóxido ( $0,92 \pm 0,09$ ) em relação ao Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a 37°C;  $1,35 \pm 0,13$ ). Um outro grupo que difere do Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a 37°C) é o de Collins (n=13), o qual apresenta pouca liberação do ânion,  $0,86 \pm 0,09$ . Macrófagos conservados em Euro-Collins (n=15) e em UW sem aditivos por 24 horas (n=13) produziram quantidades de superóxido que não diferem estatisticamente do valor encontrado para o grupo Controle. Euro-Collins é caracterizado por uma produção de  $O_2$   $1,45 \pm 0,12$  e UW sem aditivos apresenta um valor de  $1,64 \pm 0,17$ .

Com 24 horas de conservação, os fagócitos mononucleares mantidos em Meio RPMI-1640 + SFB a 8°C (Controle a frio) continuam a ser diferentes dos conservados em UW sem Insulina e dexametasona. O contrário ocorre com as células conservadas em Euro-Collins, as quais passam a não diferir do grupo de UW sem aditivos além de se caracterizarem estatisticamente como diferentes dos macrófagos do

**TABELA 4. Valore Individuais e a média  $\pm$  EPM da quantidade de O<sub>2</sub> liberada em nanomol/mg proteina X tempo de incubação em ferricitocrome c, dos macrófagos peritoniais de camundongo em cultura, Controle(C), Controle a frio(Melo RPMI-1640 + Sôro Fetal Bovino a 8°C - I), e conservados em solução de Collins(II), Euro-Collins(III) e em solução da Universidade de Wisconsin sem aditivos(IV), por 24 horas a 8°C.**

	GRUPOS				
	C n=14	I n=14	II n=13	III n=16	IV n=13
LIBERAÇÃO DE O <sub>2</sub> EM NANOMOLES O <sub>2</sub> / MG PROT. X TEMPO	1,50	0,50	0,40	1,30	2,20
	1,60	1,40	0,41	1,00	2,40
	1,10	1,00	0,80	0,86	1,20
	-	-	-	1,20	-
	0,70	0,96	0,82	2,20	2,20
	1,90	0,48	0,62	0,80	1,10
	2,00	1,20	-	1,50	2,00
	0,97	0,57	1,40	1,90	0,90
	0,87	1,10	0,70	2,20	2,30
	1,14	0,74	1,20	1,30	1,10
	-	0,50	-	1,30	-
	1,85	0,58	1,40	1,60	1,90
0,90	1,20	1,10	0,90	2,10	
1,30	-	0,54	-	-	
0,90	1,34	0,82	2,00	0,90	
2,10	1,30	0,87	1,70	1,00	
<b>X</b>	<b>1,35</b>	<b>0,92 *</b>	<b>0,86*</b>	<b>1,45</b>	<b>1,64</b>
<b>+EPM</b>	<b>+0,13</b>	<b>+0,09</b>	<b>+0,09</b>	<b>+0,12</b>	<b>+0,17</b>



**Figura 9.** Nanomoles de  $\text{O}_2$  / mg de proteína X tempo, liberados por macrófagos peritoneais de camundongo em cultura dos grupos Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a 37°C), Controle a frio (RPMI-1640 + SFB a 8°C) e dos conservados em Collins (CO), Euro-Collins (EC) e em solução da Universidade de Wisconsin sem aditivos (UW) a 8°C durante 24 horas.

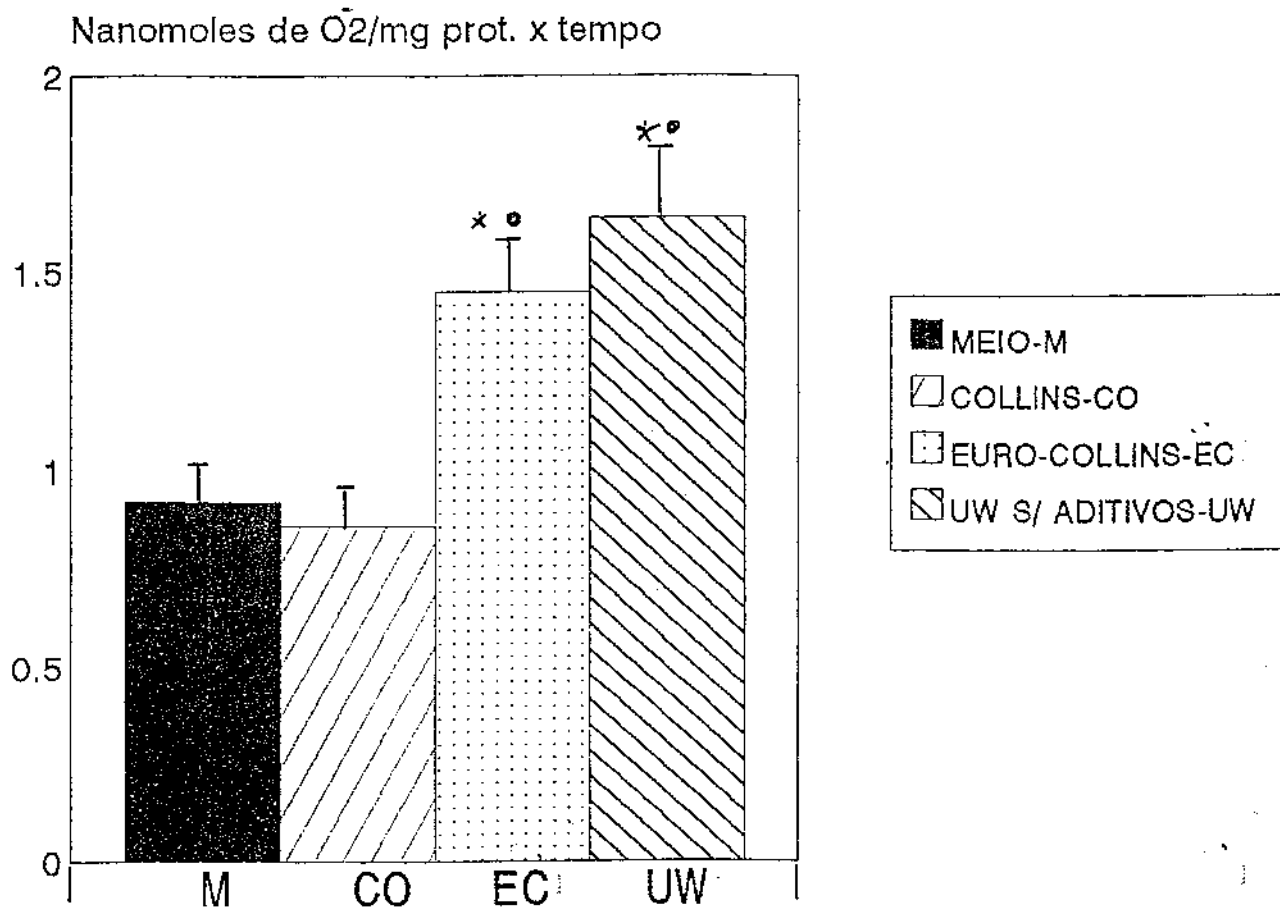
\* Teste t não pareado ( $p < 0,05$ ): Controle X grupos experimentais.

Controle a frio ( Meio RPMI-1640 a 8°C). Com o grupo de Collins também observa-se mudanças com o aumento do tempo de conservação. Este grupo produziu pouco O<sub>2</sub> ( $0,86 \pm 0,09$ ), quando comparado ao Euro-Collins,  $1,45 \pm 0,12$ , e ao UW sem aditivos,  $1,64 \pm 0,17$ . Essas relações são mostradas na figura 10.

#### Uma hora X 24 horas de conservação

Nota-se na figura 11 que macrófagos conservados em solução de Euro-Collins, aumentaram surpreendentemente ( $p < 0,05$ ) a liberação do ânion superóxido com o aumento do tempo de conservação de uma ( $0,40 \pm 0,05$ ) para 24 horas ( $1,45 \pm 0,12$ ). Isto pode ser observado também com o grupo de células do grupo Controle a frio ( Meio RPMI-1640 + SFB a 8°C). Em uma hora verifica-se uma produção de  $0,61 \pm 0,08$ , enquanto que em 24 horas a produção aumenta para  $0,92 \pm 0,09$ . Nestes grupos experimentais o tempo de conservação parece ter tido um papel fundamental na alteração da atividade funcional dos macrófagos peritoneais.

O grupo de Collins apresentou queda não significativa na produção dos reagentes de oxigênio reativos, com o aumento do tempo de conservação de uma para 24 horas, mas esta queda não foi suficiente para



**Figura 10.** Nanomoles de  $\bar{O}_2$  / mg de proteína X tempo, liberados por macrófagos peritoneais de camundongo em cultura dos seguintes grupos: Controle a frio (Meio RPMI-1640 + SFB a 8°C - M), Collins (CO), Euro-Collins (EC) e UW (Universidade de Wisconsin sem aditivos) a 8°C por 24 horas.

\*Análise de Variância (ANOVA) corrigida por Bonferroni ( $p < 0,008$ ): Controle a frio X demais grupos;

\*Análise de Variância (ANOVA) corrigida por Bonferroni ( $p < 0,008$ ): Collins X demais grupos.

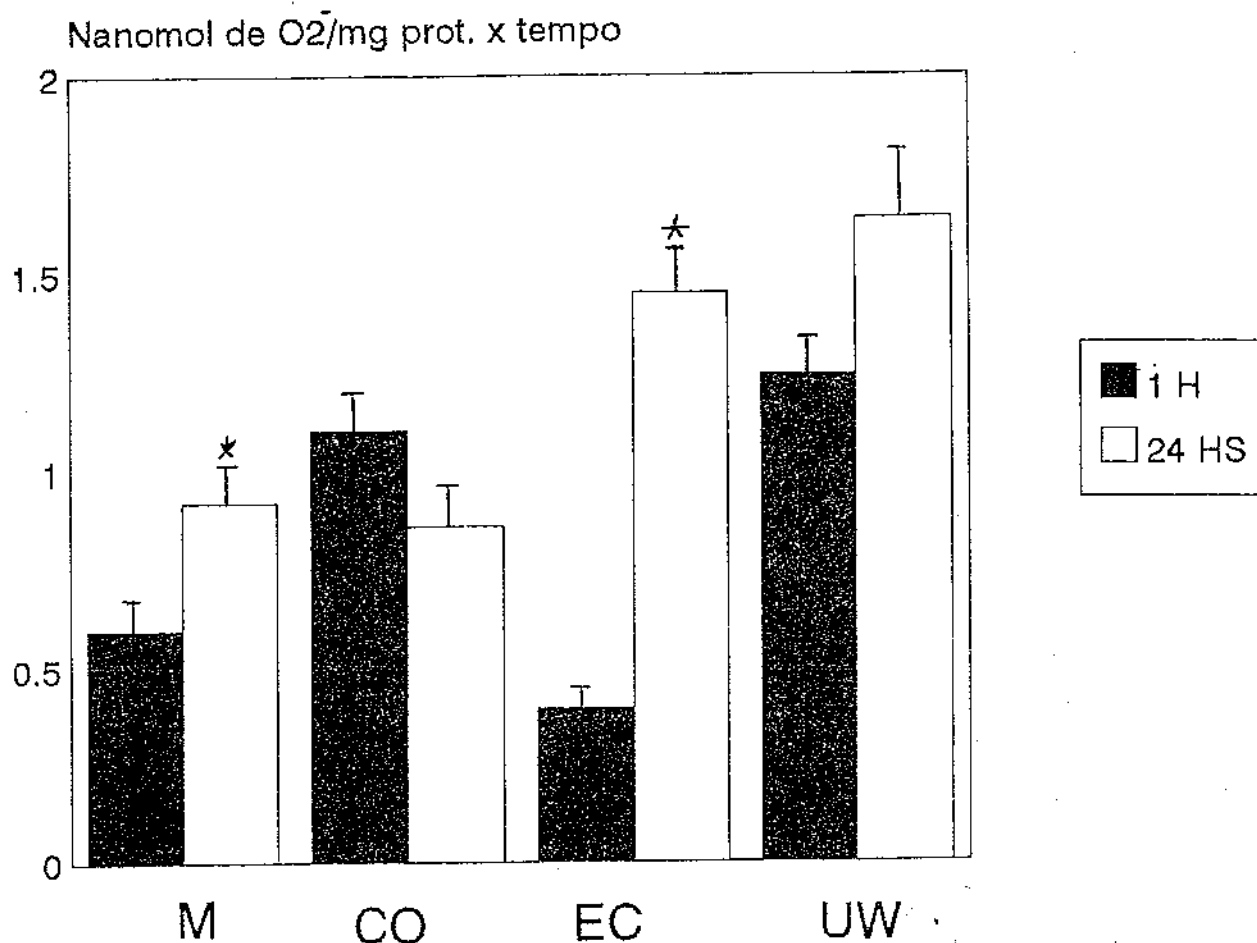


Figura 11. Nanomoles de O<sub>2</sub> / mg de proteína X tempo, liberados por macrófagos peritoneais de camundongo em cultura do grupo Controle a frio (Melo RPMI -1640 + SFB a 8°C - M), Collins (CO), Euro-Collins(EC) e da solução da Universidade de Wisconsin sem aditivos(UW) a 8°C por uma e 24 horas.

\* Teste t não pareado(p<0,05): uma X 24 horas.

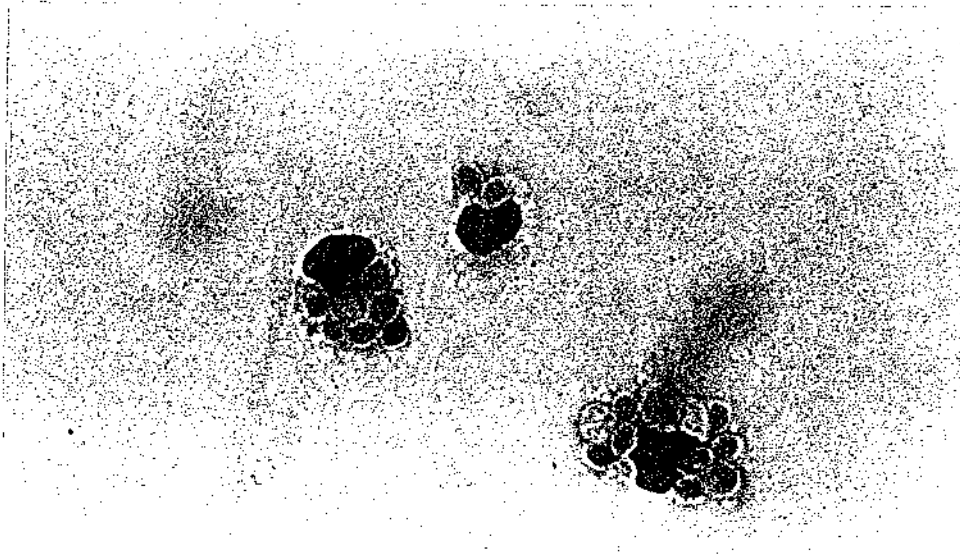
diferenciar estatisticamente esse grupo do Euro-Collins e UW sem aditivos em 24 horas de conservação (Figuras 10 e 11).

### C - Aspectos Morfológicos

As lâminas contendo as culturas de macrófagos foram cuidadosamente fotografadas para serem documentadas e melhor analisadas.

Como pode-se observar na figura 12, os macrófagos apresentam formas variadas, pouco arredondadas, demonstrando nitidamente o seu núcleo ligeiramente ovalado ou reniforme e as partículas de zymosan fagocitadas. As três células da fotografia (aumento de 1024 X) apresentam fagocitose e duas delas com muitas partículas interiorizadas. Essa lâmina se refere ao Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a 37°C), o qual como dito anteriormente, possui um Índice de Fagocitose de  $230 \pm 19$ .

A próxima foto, figura 13, também em aumento de 1024 X, observa-se que o formato das células se mostra mais arredondado e verifica-se que várias partículas do estimulante foram capturadas. Esta cultura foi mantida em Meio RPMI-1640 + SFB a 8°C (Controle a frio) por



**Figura 12. Microscopia de luz de uma cultura de macrófagos peritoneais de camundongo mantidos em Meio RPMI-1640 +SFB a 37°C (Controle).Aumento de 1024X**



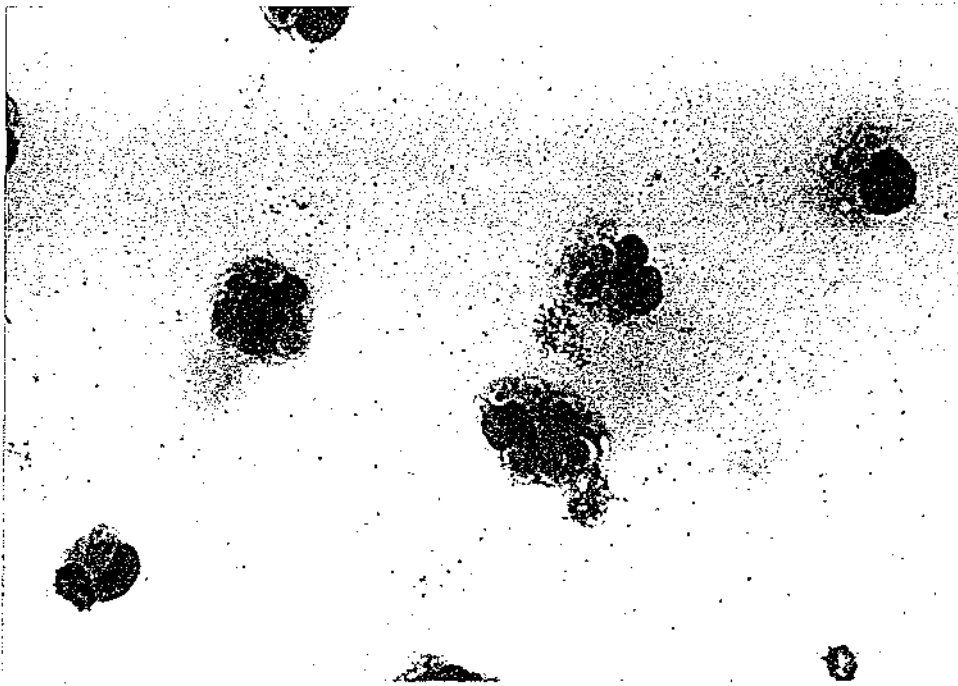


Figura 13. Microscopia de luz de uma cultura de macrófagos peritoneais de camundongo, mantidos em Meio RPMI-1640 + SFB a 8°C (Controle a frio) por uma hora (X 1024).

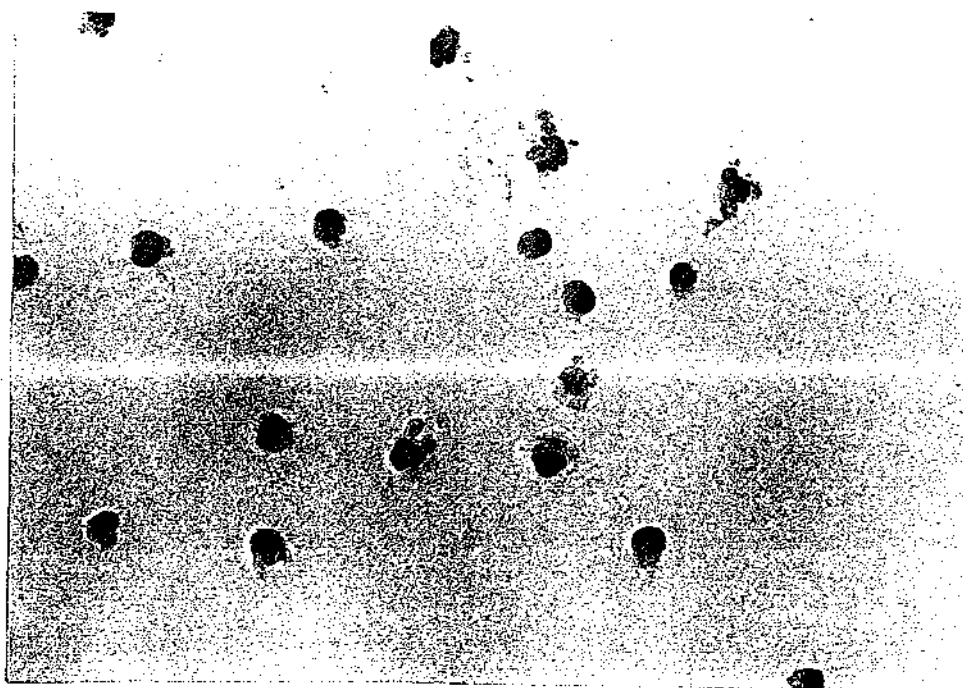


Figura 14. Microscopia de luz de uma cultura de macrófagos peritoneais de camundongo, mantidos em Meio RPMI-1640 + SFB a 8°C (Controle a frio) durante 24 horas (X 512).

apenas uma hora. O seu Índice Fagocitário,  $192 \pm 20$ , assim como a sua morfologia não diferem do grupo Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a  $37^{\circ}\text{C}$ ). Na figura 14, diferenças bruscas já podem ser observadas, as células se apresentam bastante arredondadas, identifica-se pouco citoplasma, pouca fagocitose e pouca quantidade de partículas fagocitadas por célula, quando são comparadas aos grupos descritos anteriormente. Embora estas células foram fotografadas em aumento de 512 X, elas se apresentam menores às do grupo Controle a  $37^{\circ}\text{C}$  e Controle a frio - uma hora de conservação. Os fagócitos da foto 14 também se referem ao grupo experimental II - Meio RPMI-1640 + SFB a  $8^{\circ}\text{C}$ , mas só que conservados por 24 horas. O Índice Fagocitário apresentado por este grupo é de  $111 \pm 20$  e é estatisticamente diferente do Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a  $37^{\circ}\text{C}$ ) e do Controle a frio (Meio RPMI-1640 + SFB a  $8^{\circ}\text{C}$ ) - uma hora de conservação.

Na figura 15, embora um pouco sem foco, é nítida a presença de células com formato variável com núcleos reniformes e fagocitose de muitas partículas de zymosan. Esta fotografia (X 1024) não parece ser distinta do Controle e isto é confirmado pelo seu Índice Fagocitário de  $228 \pm 17$ . Os macrófagos da figura foram conservados em solução de Collins por uma hora. A figura 16 apresenta células com muitas partículas fagocitadas, mas o número de células que apresentam fagocitose não é grande, o que contribuiu para abaxar o Índice de Fagocitose ( $173 \pm 09$ ), o qual realmente difere estatisticamente do grupo de macrófagos Controle. Esta lâmina se refere as células conservadas em Collins a  $8^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, a qual também se distingue dos fagócitos conservados nesta mesma solução a  $8^{\circ}\text{C}$  por uma hora

As células da figura 17, embora muito bonitas, apresentam poucas partículas de zymosan fagocitadas / por célula e baixa porcentagem



Figura 15. Microscopia de luz de uma cultura de macrófagos peritoniais de camundongo, conservados em solução de Collins a 8°C por uma hora. (Aumento de 1024X).

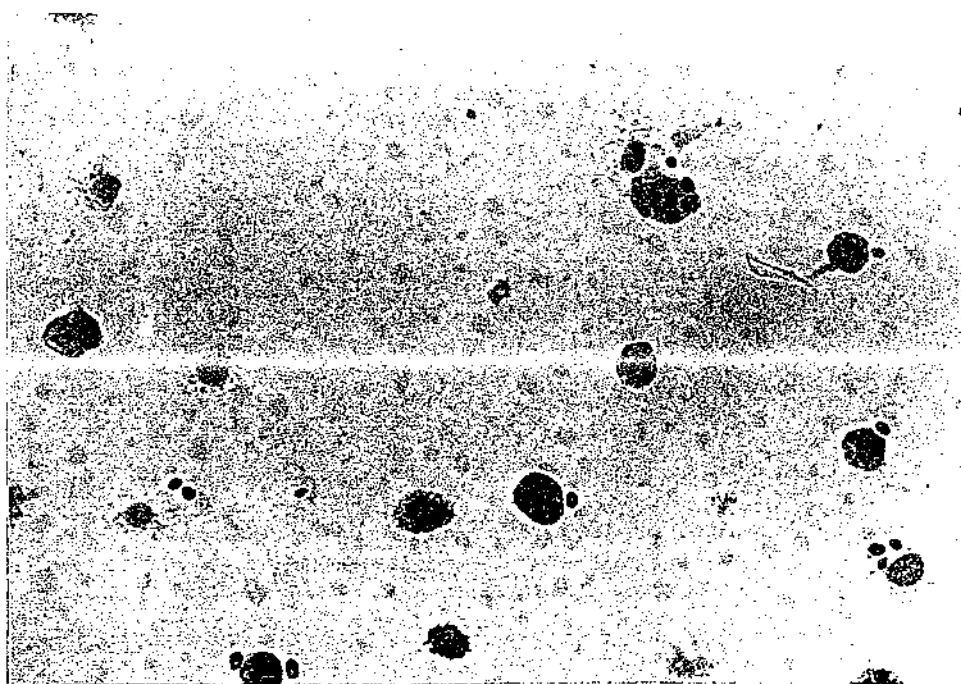


Figura 16. Microscopia de luz de uma cultura de macrófagos peritoniais de camundongo, conservados em Collins a 8°C por 24 horas. (Aumento de 512X).

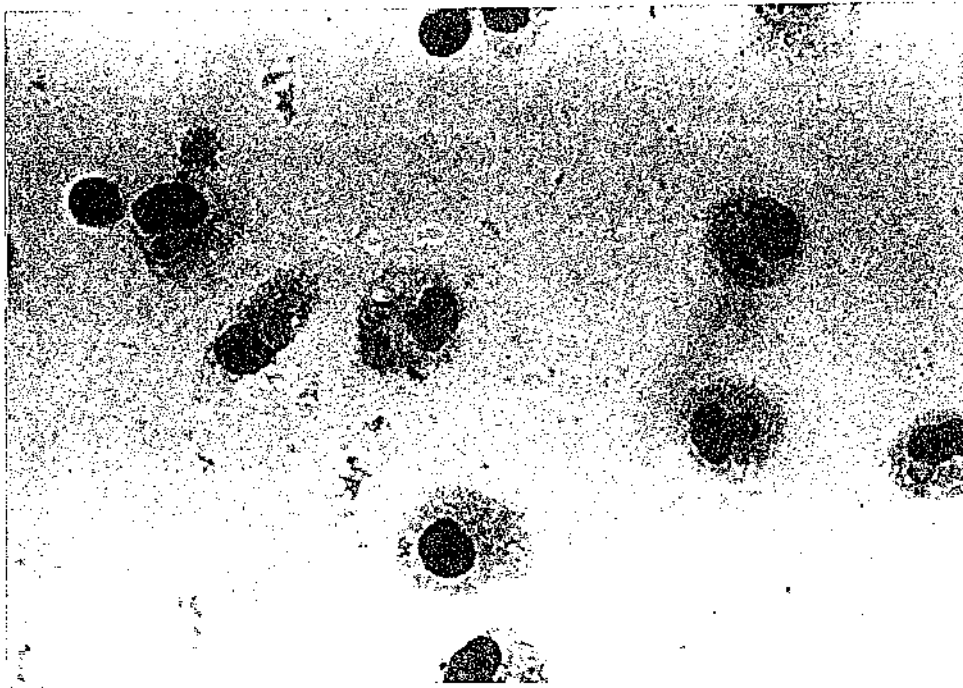


Figura 17. Microscopia de luz de uma cultura de macrófagos peritoneais de camundongo, conservados em Euro-Collins a 8°C por uma hora(X1024).

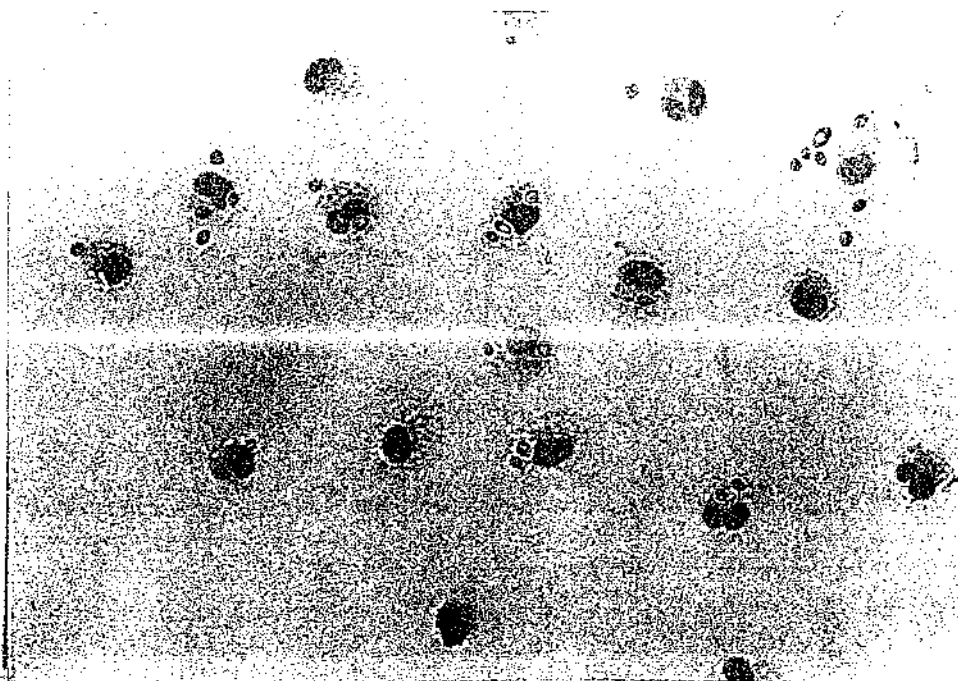


Figura 18. Microscopia de luz de uma cultura de macrófagos peritoneais de camundongo, conservados em solução de Euro- Collins a 8°C durante 24 horas.(Aumento de 512X).

de células com fagocitose. Mostram-se bem arredondadas e com nítido núcleo ovóide. O Índice dessas células é  $145 \pm 15$  e certamente é diferente do Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a  $37^{\circ}\text{C}$ ). Essa foto, aumentada 1024 X, retrata macrófagos conservados em solução de Euro-Collins a  $8^{\circ}\text{C}$  durante uma hora. Este mesmo grupo conservado por 24 horas é mostrado na figura 18 (aumento 512 X). Embora, esse campo fotográfico apresentasse as mesmas características descritas para a figura anterior, o seu Índice Fagocitário,  $107 \pm 11$ , é estatisticamente diferente de Euro-Collins - uma hora e também do Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a  $37^{\circ}\text{C}$ ).

Muita fagocitose é apresentada na figura 19, cujas células e núcleos se mostram com formato irregular. O aumento de 1024 X da foto, documenta macrófagos conservados em solução da Universidade de Wisconsin sem aditivos a  $8^{\circ}\text{C}$  durante uma hora. O Índice de Fagocitose não é diferente do Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a  $37^{\circ}\text{C}$ ). O contrário é apresentado na foto da figura 20 (aumento 512 X), em que as células arredondadas, mostram pouca fagocitose e interessantemente, verifica-se que muitas das partículas de zymosan ficam aderidas à periferia das células, mas sem serem, no entanto, fagocitadas. Esta lâmina é de macrófagos conservados também em UW sem aditivos a  $8^{\circ}\text{C}$ , mas por 24 horas e o Índice é de  $123 \pm 111$ , o que os caracterizam como diferentes do Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a  $37^{\circ}\text{C}$ ) e de UW sem aditivos - uma hora.

A análise da figura 21 (1024 X) revela células estranhas morfológicamente. Fica difícil avaliar o formato dos macrófagos, pois parece haver pouco citoplasma o qual se encontra pouco corado. O núcleo, além de picnótico apresenta uma morfologia não vista nas células das lâminas anteriores. É mais notável ainda, neste campo fotográfico a porcentagem de fagocitose assim como, o número médio de partículas

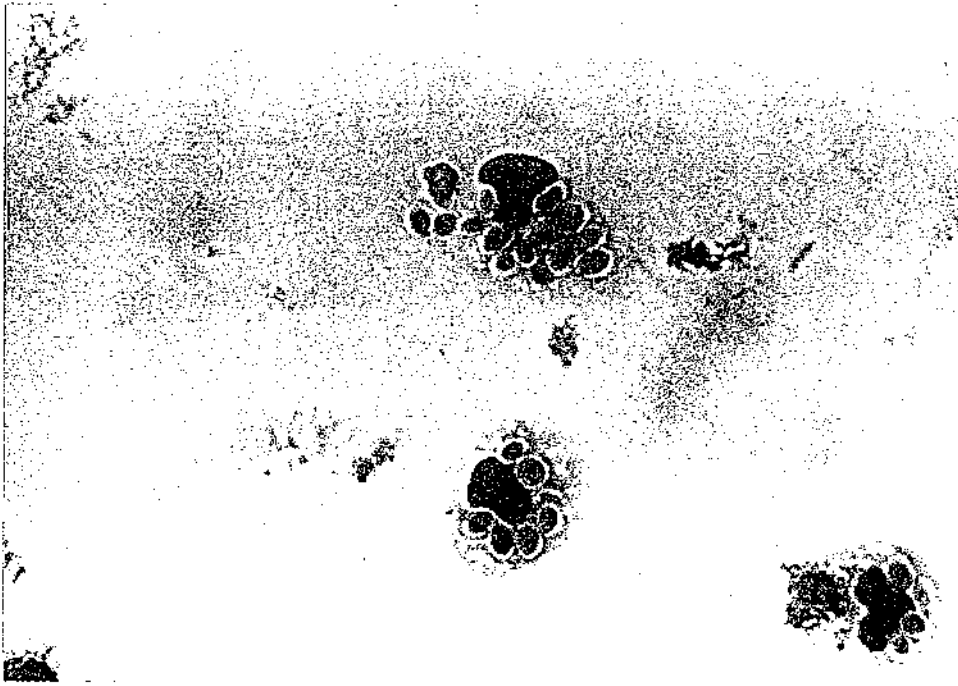


Figura 19. Microscopia de luz de uma cultura de macrófagos peritoniais de camundongo, conservados em solução da Universidade de Wisconsin sem aditivos a 8°C por uma hora(1024X).

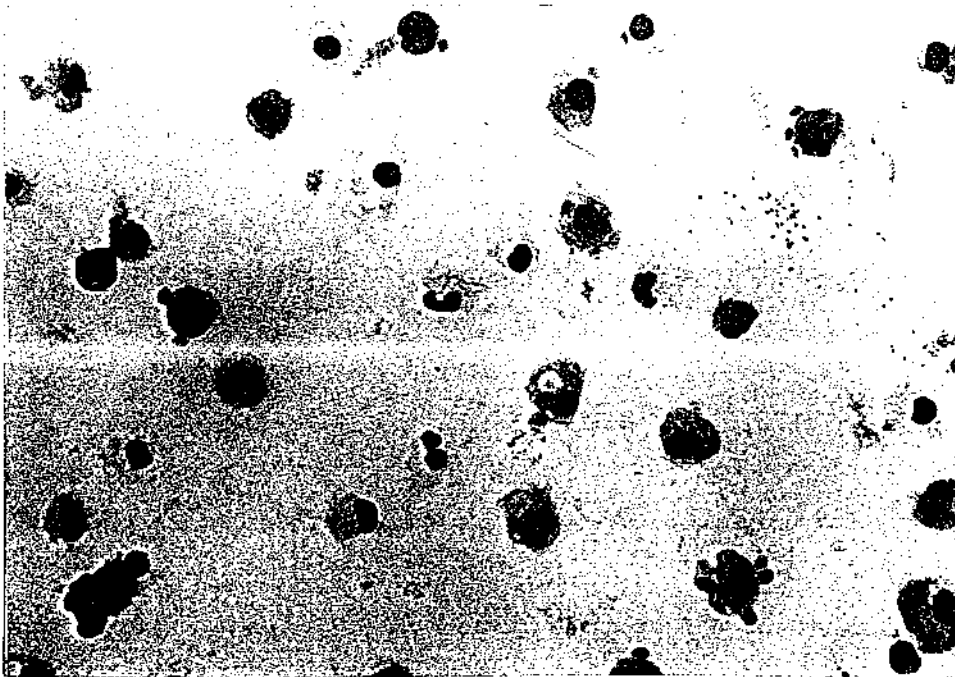
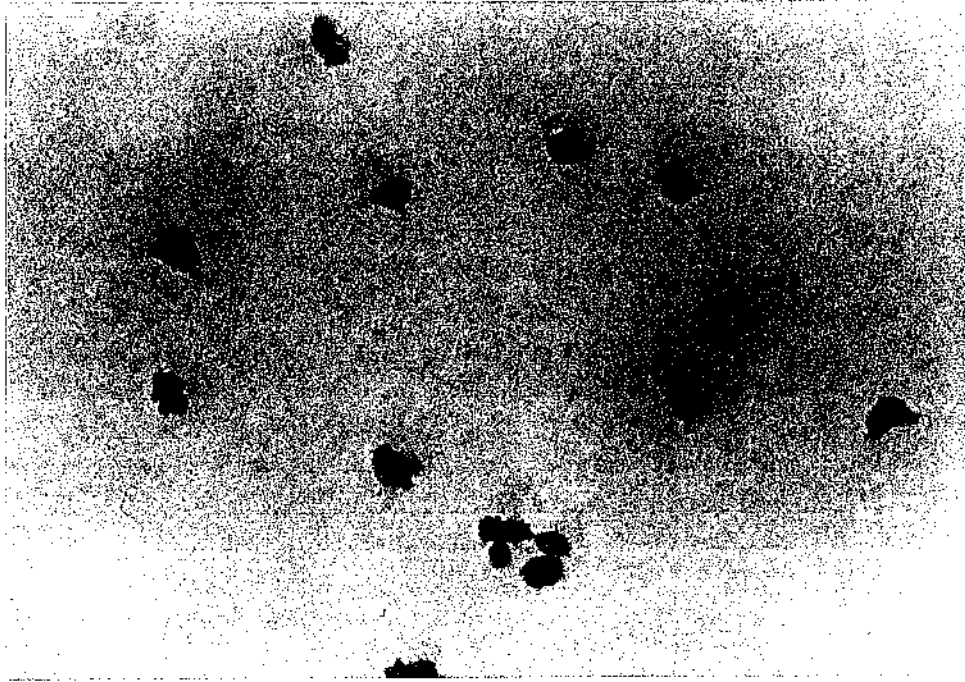


Figura 20. Microscopia de luz de uma cultura de macrófagos peritoniais de camundongo, conservados em UW sem aditivos a 8°C por 24 horas(512X).



**Figura 21. Microscopia de luz de uma cultura de macrófagos peritoneais de camundongo, conservados em UW enriquecido com insulina e dexametasone, a 3°C durante 24 horas(512X).**

fagocitadas é nulo. Esses macrófagos, totalmente descaracterizados foram conservados a 8°C por 24 horas em UW com os aditivos insulina e dexametasona. O valor do Índice de Fagocitose encontrado para esse grupo é de  $39 \pm 06$  e certamente se distingue do Controle (Melo RPMI-1640 + SFB a 37°C) e dos demais grupos experimentais, tanto conservados por uma quanto por 24 horas.



## DISCUSSÃO

O armazenamento a frio após lavagem do órgão com soluções conservadoras tem sido um método escolhido pela maioria dos centros transplantadores, por ser simples e menos dispendioso que as outras formas de conservação renal (Bennett et al., 1987; Ribeiro, 1992).

Embora essa técnica de conservação esteja possibilitando a melhora dos transplantes renais e de outros órgãos, existem ainda muitas controvérsias sobre a eficiência dessas soluções. As causas de fracasso do transplante renal, caracterizadas por deterioração e eventual perda da função do rim ainda permanecem obscuras, mas alguns mecanismos fisiológicos e moleculares tem sido documentados, como: depleção dos estoques celulares de nucleotídeos de adenina, acúmulo de metabólitos, especificamente de íons  $H^+$ , autólise e liberação de enzimas lisossomais, lesão de membranas e da vasculatura. Ainda fazendo parte do processo degenerativo, Green et al. (1986) relata que tais eventos são secundários e terciários, e atribui às lesões primárias o papel dos radicais livres.

Sabe-se que no pós transplante renal, mesmo os pacientes estáveis estão sujeitos a uma reação imunológica de baixa intensidade e pouco detectada. No rim tais eventos podem induzir a produção de espécies de radical livre e substâncias vasoativas, provenientes de células intrínsecas e de infiltrantes. Na rejeição aguda, observou-se que tanto a infiltração celular quanto a atividade secretora dessas células

apresentavam-se muito ativas, podendo produzir situações que provocariam processos degenerativos (Taylor et al., 1993).

Assim, de acordo com tais informações, aliado ao fato de haver ainda muita carência de estudos de conservação de células do Sistema Imunológico, resolvemos avaliar o efeito de algumas soluções conservadoras utilizadas no transplante renal, a 8°C por um período de uma e 24 horas, sobre a atividade funcional de macrófagos, os quais são importantes células mediadoras de respostas inflamatórias e imunológicas, como também apresentam grande potencialidade de secreção de inúmeras substâncias biologicamente importantes.

Esta discussão abrange a análise da atividade fagocitária e liberação do radical superóxido.

Primeiramente, os nossos resultados demonstraram que a composição iônica das soluções conservadoras, a temperatura e o tempo de conservação afetaram a atividade fagocitária de macrófagos peritoniais de camundongo, em cultura.

Estes dados são conhecidos da literatura em meios de cultura, a qual relata que o processo fagocitário é extremamente influenciado por fatores como, temperatura, pH, osmolaridade, presença ou ausência de determinados cátions e ânions divalentes. Nesta linha de pesquisa a literatura também reconhece o cálcio e o magnésio como elementos iônicos essenciais ao processo de fagocitose (Van Oss, 1986). Aqui devemos reforçar que tais dados obtidos em soluções eletrolíticas com capacidade de conservação a frio são originais.

Desta forma, observamos que a atividade fagocitária foi realmente afetada pelo tempo de conservação. Primeiro porque a conservação durante 24 horas reduziu marcadamente o Índice Fagocitário

das células de todos os grupos experimentais e segundo que a análise morfológica das células conservadas por este período revelou características não exibidas pelos macrófagos do grupo Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a 37°C) e dos grupos conservados por apenas uma hora. Na descrição morfológica destas células observamos que elas são menores, com pouco número de pseudópodos, sugerindo certa inatividade deste tipo celular, pois segundo Nathan (1987) macrófagos ativado mostram-se maiores e com acentuadas ondulações na membrana celular.

Os dados também mostraram a importância da composição iônica na atividade fagocitária dos macrófagos, pois constatou-se diferenças estatísticas significantes entre os vários grupos experimentais tanto em uma quanto em 24 horas de conservação.

Em uma hora de conservação notamos que os macrófagos conservados em solução de Euro-Collins apresentaram o menor Índice Fagocitário, que o distinguiu estatisticamente dos grupos Controle (Meio RPMI-1640 +SFB a 37°C), de Collins e de UW sem aditivos. Com 24 horas de conservação, embora todos os grupos apresentassem queda da atividade fagocitária, os macrófagos mantidos em Collins foram os que mostraram o maior Índice Fagocitário quando comparados aos demais grupos experimentais a 8°C.

Observando os dados notamos ainda que existiram diferenças significativas quanto a atividade fagocitária entre os grupos de Collins e de Euro-Collins, tanto em uma quanto em 24 horas de conservação. Devemos ressaltar que a diferença entre essas duas soluções, em termos de composição iônica, é a presença de 28mM do sulfato de magnésio na solução de Collins e sua ausência em Euro-Collins, o que também pode justificar quando se observa em material e métodos, uma pequena

diferença na osmolaridade entre essas duas soluções: Collins com 320mOsm e Euro-Collins com osmolaridade de 300mOsm. Desta forma, os nossos achados coincidem com os da literatura que revela a importância de elementos iônicos, no caso o íon magnésio, na ativação fagocitária de células como os macrófagos (Van Oss,1986). Considerando que a atividade fagocitária pode expressar um estado de ativação dessas células do Sistema Fagócito- Mononuclear, notamos que o magnésio é um importante elemento na atividade funcional dos macrófagos e deve estar envolvido em vários processos bioquímicos/fisiológicos dessas células.

Em outra fase dos nossos experimentos utilizamos a solução da Universidade de Wisconsin como solução preservadora, a qual sobre o ponto de vista de conhecimentos de fisiologia celular está melhor elaborada. Assim, sua composição envolveu substâncias energéticas, osmóticas e sequestradores de radicais livres, além da adição de alguns aditivos, como a dexametasona e insulina (Belzer & Southard, 1988).

O papel desses aditivos ainda não está claro (Collins & Wilcomb,1992), mas parece que são importantes no processo de conservação e regeneração da função do órgão após o transplante. Yu et al. (1990) discutem a respeito da dexametasona ser um componente essencial na solução de UW na conservação de fígado de rato e sugere a adição desse corticóide em outras soluções conservadoras. Quanto a insulina, o autor questiona sua função e utilização na solução de UW. Trabalhos clínicos recentes com transplantes de rins sugerem modificações na solução de UW, e não trazem mais a insulina e a dexametasona como constituintes dessa solução (Baatard et al.,1993).

Os nossos resultados mostraram que macrófagos conservados por 24 horas em UW com os aditivos insulina e

dexametasona, apresentaram enorme queda da atividade fagocitária em relação a UW sem aditivos e ao Controle (Melo RPMI-1640 + SFB a 37°C). Quando as células foram conservadas apenas em UW com o aditivo Insulina pelo mesmo período, o Índice se apresentou como o do grupo de UW sem aditivos, o que nos indica que a dexametasona foi o fator decisivo na diminuição tão brusca do Índice Fagocitário de tais células. A quantidade de dexametasona utilizada parece ser importante nos processos de estabilização de membranas, mas os resultados obtidos mostraram que 16mg/l deste corticóide promoveu uma significativa queda da atividade fagocitária dos macrófagos. As células desse grupo apresentaram morfologia muito irregular e diferente do observado nos demais grupos experimentais - pequenas com núcleo picnótico e pouco citoplasma. As características morfológicas revelaram desta forma, inativação dos macrófagos. Enfim, a dexametasona mostrou-se efetiva na inibição morfo-funcional desse tipo de célula em cultura.

Um outro aspecto interessante observado no protocolo de atividade fagocitária foi o encontrado no grupo de UW sem aditivos, conservados a 8°C durante 24 horas. Embora as células apresentassem redução do Índice Fagocitário muitas das partículas de zymosan não fagocitadas permaneceram aderidas às membranas dos macrófagos, o que talvez explique que a diminuição do Índice Fagocitário não foi devido a alteração no processo de adesão das partículas aos receptores de membrana e sim aos passos posteriores ao da adesão da partícula.

De modo geral, os nossos achados com atividade fagocitária se correlacionaram com as características morfológicas gerais analisadas.

Prosseguindo os nossos estudos, a análise da liberação do radical livre superóxido também se mostrou afetado pela composição iônica das soluções, o tempo e a temperatura de conservação.

O comportamento das células dos vários grupos experimentais, no que diz respeito a análise da liberação do radical livre foi diferente do encontrado na análise do Índice Fagocitário. Embora a atividade fagocitária e a liberação de superóxido sejam marcadores de ativação dos macrófagos (Tsunawaki & Nathan, 1986) e a "queima respiratória" possa ser uma forma indireta de se avaliar a atividade fagocitária, devemos ressaltar que esta afirmação apenas será válida se os mecanismos pós fagocitários estiverem intactos, além disto, qualquer perturbação na membrana pode afetar a atividade metabólica com consequente "explosão respiratória", sem necessariamente promover a fagocitose (Absolom, 1986) e desta forma a atividade fagocitária nem sempre estaria correlacionada à produção de superóxido.

Nas nossas condições experimentais os resultados mostraram que em uma hora de conservação os macrófagos dos grupos Controle a frio (Meio RPMI-1640 + SFB a 8°C) e de Euro-Collins apresentaram pouca liberação de superóxido quando comparados ao Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a 37°C) e aos demais grupos experimentais. As culturas de macrófagos conservados em Collins e em UW sem aditivos pelo mesmo período de tempo liberaram quantidades de superóxido iguais às do grupo Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a 37°C).

Como a análise da atividade fagocitária, a liberação de superóxido das culturas conservadas por uma hora revelou que o grupo de Euro-Collins é estatisticamente diferente do Collins ( $p < 0,008$ ), tendo o primeiro grupo o menor Índice fagocitário e também a menor liberação do

reagente de oxigênio . Estes achados nos sugerem que o sulfato de magnésio deve ser importante não apenas no processo fagocitário, mas também nos mecanismos bioquímicos responsáveis pela produção de espécies de oxigênio reativa.

Com os resultados obtidos, gostaríamos de destacar ainda que macrófagos do grupo Controle a frio (Meio RPMI-1640 + SFB a 8°C) aumentaram estatisticamente a liberação do radical livre com o aumento do tempo de conservação para 24 horas, mas ainda a produção de superóxido apresentou-se baixa quando comparamos este grupo com o Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a 37°C) e com o grupo da solução de UW sem aditivos. No grupo Controle a frio (Meio RPMI-1640 + SFB a 8°C) parece que o tempo de conservação foi importante para aumentar a atividade enzimática responsável pela produção de radicais livres. Os macrófagos conservados em Euro-Collins também aumentaram a liberação do radical de oxigênio com 24 horas de conservação e passaram a se apresentar estatisticamente diferentes do grupo Controle a frio (Meio RPMI-1640 + SFB a 8°C).

Por outro lado, macrófagos conservados em solução de Collins durante 24 horas passaram a se apresentar diferentes do Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a 37°C) e de UW sem aditivos. Embora, o método estatístico aplicado não revelasse diferenças entre a liberação de superóxido por macrófagos conservados em Collins por uma e 24 horas, a diminuição na produção do radical livre pelas células conservadas por 24 horas nesta solução foi suficiente para diferenciá-las do Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a 37°C) e de UW sem aditivos.

Um outro dado interessante é que o grupo de Collins continua a ser diferente de Euro-Collins. Mas ao contrário do observado no

protocolo de atividade fagocitária, são as células mantidas em Collins por 24 horas que apresentaram a menor liberação de superóxido.

Desta forma, independentemente do tempo de conservação e da variável analisada, o grupo de Collins sempre se apresentou estatisticamente diferente de Euro-Collins. Isto nos sugere que o sulfato de magnésio deve ter algum papel tanto nos processos fagocitários quanto nos mecanismos produtores de radicais livres.

Figueiredo et al. (1986b) observou em fragmentos renais conservados em várias soluções conservadoras a frio por períodos até 96 horas em hipóxia, a atividade da enzima citoplasmática lactato desidrogenase (LDH), a qual é um bom marcador do metabolismo celular. Em todos os grupos conservados até 24 horas verificou-se liberação semelhante da enzima. No entanto, após este período a LDH nos fragmentos conservados em Collins aumentou progressivamente no decorrer do tempo de conservação. Esta constante liberação até 24 horas no Collins, como também nos outros grupos provavelmente indique metabolismo anaeróbio igual para os fragmentos de todas as soluções, no entanto, a produção de superóxido ao que nos parece depende da composição iônica das soluções conservadoras.

Com os resultados obtidos parece-nos também que a ausência do magnésio limitou a liberação de superóxido em um curto período de conservação.

A observação dos dados de liberação do agente oxidante nos grupos de Euro-Collins e Collins também nos sugere que o magnésio além de ser importante na produção do radical, pode estar envolvido nos mecanismos que promovem a formação de sequestradores de radicais livres, o que tamponaria a produção desses reagentes. Desta forma, a



produção de superóxido estaria sendo tamponada por mecanismos funcionantes e íntegros do metabolismo celular, o que talvez justifique o não aumento da produção desse radical no grupo de Collins, com o aumento do tempo de conservação.

Prosseguindo a análise de liberação das moléculas de oxigênio reativas, as células conservadas em UW sem aditivos por uma e 24 horas apresentaram liberação de superóxido igual ao do Controle (RPMI-1640 + SFB a 37°C), o que pode caracterizar esta solução como preservadora do metabolismo de macrófagos em cultura.

A solução de UW contém uma série de substâncias que evitariam o acúmulo de radicais livres, como a glutatona, a adenosina e o alopurinol. Desta forma, a glutatona funcionaria como um sequestrador de espécies de oxigênio reativas. A adenosina regularizaria os estoques de ATP, o que permitiria o funcionamento de muitos processos bioquímicos e transportadores, além de que poderia evitar a formação de hipoxantina, a qual pode servir como doadora de elétrons para o oxigênio com consequente formação de superóxido. E o alopurinol seria a outra substância com função de evitar o acúmulo de radicais livres, pois consegue inibir em diversas preparações a xantina oxidase, evitando assim a produção de superóxido e consequentemente de outros oxidantes (Paller, 1988; Belzer & Southard, 1988; Collins & Wicomb, 1992).

Os nossos dados demonstraram que esses elementos, os quais encarecem muito a solução de UW parecem não serem eficazes na eliminação dos reagentes de oxigênio. Baseado nestas evidências experimentais, Collins & Wicomb, 1992 discutem em um trabalho experimental sobre a viabilidade e confiabilidade de tais substâncias na solução de UW e constataram que fígado de rato e rim de cão foram melhor

conservados com conseqüente aumento na sobrevivência dos animais após o transplante, quando utilizaram como solução conservadora, UW modificado - sem adenosina, alopurinol, insulina e dexametasona. Em um trabalho clínico recente também constatou-se que UW sem adenosina e alopurinol propiciou melhores resultados que UW não modificado, além do que reduziu significativamente o custo dessa solução conservadora (Baatard et al.,1993). Desta forma, ainda se mantém controvérsias sobre a solução original de UW, embora o emprego clínico parece estar consagrado até o momento.

Nas nossas condições experimentais as células em conservação permaneceram em hipotermia e isquemia por uma e 24 horas, embora esta situação possa promover diminuição do metabolismo celular, a literatura relata que não ocorre parada completa da atividade metabólica (Belzer,1988). Assim, observamos que de um modo geral houve tendência em aumentar a liberação de superóxido - exceto no grupo de Collins - , com o aumento do tempo de conservação, confirmada estatisticamente no grupo de células do grupo Controle a frio ( Melo RPMI-1640 + SFB a 8°C) e em Euro-Collins. Sabe-se que quanto maior o tempo de conservação maior o tempo de isquemia fria e desta forma, em tecidos isquêmicos a enzima xantina desidrogenase é facilmente convertida em xantina oxidase, a qual com a reoxigenação será capaz de transformar o oxigênio em superóxido e dar início a uma cascata de reações , cujos produtos poderão promover sérias lesões nos tecidos (Hammond et al.,1984; McCord,1985; Langer,1986; Sussman & Bulkley,1990). Essas lesões por reoxigenação está bem documentada na literatura e relatou-se que as células do parênquima de órgãos, as endoteliais e os neutrófilos circulantes são importantes fontes geradoras de radicais livres (Freeman & Crapo,1982;

Ratyck et al.,1987; Bennett et al.,1987). Desta forma, devemos lembrar que os macrófagos durante a conservação a frio estão em hipóxia e após o procedimento de conservação as células foram colocadas em meios nutritivos, em uma estufa hiperoxigenada, cuja natureza aumentou o metabolismo levando à atividade fagocitária e liberação de superóxido. Este fato pode simular exatamente a situação do rim conservado ao ser reimplantado, embora a pressão parcial de oxigênio do receptor seja menor.

Considerando que existem macrófagos nos espaços justaglomerulares e no interstício renal e que o transplante do rim envolve períodos de isquemia quente e fria seria interessante eleger uma solução conservadora que permitisse uma boa conservação dos túbulos, interstício e da vasculatura, mas que proporcionasse pouca liberação das moléculas de oxigênio reativas, pois se sabe que são altamente deletérios pois, promovem peroxidação de lipídeos polinsaturados, reagem com proteínas e conseqüentemente durante a conservação poderiam interagir com várias estruturas do rim levando a lesões e morte celular ( Freeman & Crapo,1982, Slater, 1984). Além disto, tais elementos podem também funcionar como fatores quimiotáxicos o que resultaria em uma ampliação da reação imunológica após o transplante renal. É conhecido que em linhagens celulares renais e em endoteliais as moléculas de oxigênio reativa provocam sérias lesões com conseqüente destacamento e lise celular (Andreoli,1990). Considerando que a liberação de radicais livres se constitui em um marcador da atividade funcional de macrófagos, o aumento na liberação de tais reagentes pode significar ativação dessas células. De acordo com Nathan (1987) e Johnston Jr.(1988) esta ativação envolve a secreção de várias substâncias, com largo espectro de atuação, tais como,

prostaglandinas e enzimas lisossomais, as quais, segundo Sussmann & Bulkley, 1990 estão envolvidas nos processos de lesão tecidual.

Os nossos resultados praticamente mostraram que as soluções conservadoras a 8°C com exceção de Euro-Collins uma hora e Collins 24 horas que apresentaram pouca liberação de superóxido em relação ao Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a 37°C) os demais grupos mantiveram a produção do radical livre comparável ao Controle a 37°C. Portanto, de uma forma geral as situações experimentais analisadas não evitaram a liberação de superóxido. Isto mostra que as soluções conservadoras foram eficazes na preservação da atividade funcional dos macrófagos avaliada pela dosagem da espécie de oxigênio reativo. Por outro lado o grupo Controle a frio (Meio RPMI-1640 + SFB a 8°C) parece limitar o metabolismo dessas células, no que diz respeito a produção de radicais livres, demonstrando de certa forma que este tipo de solução a frio tem propriedades conservadoras o que se deve esperar considerando o fato que esta solução tem elementos semelhantes ao plasma e que por isso deve funcionar efetivamente apenas a 37°C.

Nesta fase da discussão a análise destes resultados sobre a atividade funcional de macrófagos poderia indicar que talvez seja interessante tentar montar uma solução com baixa capacidade de preservação de células do Sistema Fagócito-Mononuclear, pois isto significaria diminuição da atividade fagocitária, da liberação de reagentes de oxigênio, como também de outros fatores que poderiam propiciar reações inflamatórias.

Além dessas observações o nosso modelo experimental poderia se constituir em um método capaz de avaliar outros processos fisiopatológicos que poderiam interferir na homeostasia do órgão. Cumpre

sallentar ainda que a cultura de macrófagos peritoneais é relativamente simples e não envolve a adição de enzimas para a sua remoção do tecido, o que poderia interferir nas características da membrana e conseqüentemente influenciar nas respostas obtidas durante o processo de conservação.

Finalmente acreditamos que o macrófago peritoneal possa ser utilizado como "screening" de soluções conservadoras e nestas condições poderíamos também estudar a ação de algumas drogas imunossupressoras, antiinflamatórias e hormonais, que possam estar presentes no transplante renal, sobre os seus "receptores" e possíveis mecanismos de ação que de alguma forma poderiam alterar a resposta inflamatória dessas células em diversas situações experimentais ou clínicas que ocorrem durante o transplante renal.

## SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Neste trabalho analisamos o efeito de soluções conservadoras utilizadas no transplante renal, como Collins, Euro-Collins e Solução da Universidade de Wisconsin a 8°C, durante uma e 24 horas, sobre a atividade funcional de macrófagos peritoniais de camundongo, em cultura.

A atividade funcional das células foi verificada através da Atividade Fagocitária e liberação do radical superóxido.

A análise da atividade fagocitária em nosso protocolo, revelou os seguintes resultados:

### 1 - EM UMA HORA DE CONSERVAÇÃO:

1. O grupo de macrófagos conservados em solução de Euro-Collins mostraram-se diferentes do Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a 37°C) e exibiram o menor Índice Fagocitário;

2. A comparação estatística entre o Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a 37°C) e os grupos Controle a frio (Meio RPMI-1640 + SFB a 8°C), Collins e UW sem aditivos não revelou diferenças significantes;

3. Não existiram diferenças significantes entre os grupos Controle a frio (Meio RPMI-1640 + SFB a 8°C), Collins e UW sem aditivos;.

4. A análise morfológica dos grupos experimentais não revelou diferenças do grupo Controle (Melo RPMI-1640 + SFB a 37°C).

## II - EM 24 HORAS DE CONSERVAÇÃO

1. Em todos os grupos experimentais houve queda da atividade fagocitária com o aumento do tempo de conservação;

2. Todos os grupos experimentais se apresentaram estatisticamente diferentes do Controle (Melo RPMI-1640 + SFB a 37°C);

3. Macrófagos conservados em solução de Collins mostraram o maior Índice Fagocitário quando comparado ao Controle a frio (Melo RPMI -1640 + SFB a 8°C), Euro-Collins e UW sem aditivos;

4. Controle a frio (Melo RPMI-1640 + SFB a 8°C), Euro-Collins e UW sem aditivos apresentaram-se estatisticamente iguais entre si;

5. A adição de dexametasona e insulina na solução da Universidade de Wisconsin promoveu queda da atividade fagocitária dos macrófagos desse grupo;

6. O Índice Fagocitário de macrófagos conservados em UW com apenas o aditivo insulina foi igual ao do grupo de UW sem aditivos;

7. A morfologia das células do Controle a frio (Melo RPMI-1640 + SFB a 8°C), Euro-Collins e UW sem aditivos mostrou-se um pouco distinta do encontrado no grupo Controle (Melo RPMI-1640 + SFB a 37°C) e nos grupos conservados apenas por uma hora;

8. Células conservadas em UW apresentaram muitas partículas de zymosan aderidas ao citoplasma;

9. Macrófagos do grupo de UW com os aditivos mostraram-se muito pequenos, núcleo picnótico e pouco citoplasma.

Por outro lado, a análise da liberação do ânion superóxido no nosso protocolo, mostrou os seguintes dados:

#### I - EM UMA HORA DE CONSERVAÇÃO:

1. Células do grupo Controle a frio (Meio RPMI-1640 + SFB a 8°C) e Euro-Collins produziram pouco superóxido quando comparados ao Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a 37°C), Collins e UW sem aditivos;

2. Macrófagos conservados em Collins e UW sem aditivos liberaram quantidades de radical livre iguais ao Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a 37°C).

#### II - EM 24 HORAS DE CONSERVAÇÃO:

1. O grupo Controle a frio (Meio RPMI-1640 + SFB a 8°C) e Euro-Collins aumentaram a liberação de superóxido com o aumento do tempo de conservação;

2. Aumentou a liberação de radical livre do grupo Controle a frio (Meio RPMI-1640 + SFB a 8°C), mas os valores quantificados ainda



mostraram-se estatisticamente menores que os encontrados nos grupos Controle (Meio RPMI-1640 + SGB a 37°C) e UW sem aditivos;

3. A produção de superóxido encontrado no grupo de Collins foi estatisticamente menor que o Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a 37°C), UW sem aditivos e Euro-Collins. Mas, essa queda não foi estatisticamente diferente do grupo de células conservadas em Collins por uma hora;

4. Macrófagos mantidos em UW sem aditivos sempre produziram quantidades de superóxido iguais ao Controle (Meio RPMI-1640 + SFB a 37°C).

Os dados obtidos nos permitiram as seguintes conclusões:

- O tempo e a temperatura de conservação, assim como, a composição iônica das soluções conservadoras afetou a atividade fagocitária de macrófagos peritoneais em cultura;

- O sulfato de magnésio é importante no processo fagocitário;

- A dexametasona (16mg/l) diminuiu a atividade fagocitária dos macrófagos em cultura;

- As substâncias de UW com o objetivo de eliminar radicais livres não foram eficientes em nossas condições experimentais;

- Praticamente, nenhuma solução eletrolítica a frio diminuiu ou evitou a produção das moléculas de oxigênio reativas. Este dado nos indica que as lesões dependentes desses radicais continuam a existir, podendo lesar néfron, interstício e outros tecidos. Assim, acreditamos que não exista ainda uma solução protetora, do ponto de vista químico, em condições anaeróbicas a frio.

- O magnésio também é importante nos processos geradores de moléculas de oxigênio reativas;

- Os dados do trabalho podem indicar que a metodologia utilizada poderá permitir "screening" de soluções conservadoras que são empregadas no transplante renal;

## SUMMARY

This work was designed to study the effect of several cold preserved solutions on the phagocytic activity and superoxide production by mouse peritoneal macrophages, in culture. The phagocytes were incubated in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal bovine serum at 37°C (Control), in the same solution at 8°C (Cold Control) and in three preserved solutions, Collins, Euro-Collins and University of Wisconsin (UW) at 8°C, during 1 or 24 hours.

In phagocytic activity protocol, the results showed that in 1 hour of cold preservation only the Euro-Collins group was different of Control and other experimental groups. Macrophages preserved in Euro-Collins solution during 1 hour showed the smallest phagocytic index. The preservation by 24 hours promoted drop of phagocytic activity in experimental groups. All groups presented statistical differences when compared with Control. The phagocytes preserved in Collins by 24 hours exposed the biggest phagocytic index when compared with Cold Control, Euro-Collins and UW solution.

In other protocol, free radical production, the results showed that Euro-Collins group produced little superoxide when compared with Control, Collins and UW group. By the other hand, during 24 hours of

preservation, macrophages preserved in Euro-Collins solution released superoxide like Control and UW groups. The Collins group showed little release of superoxide when compared with Control, Euro-Collins and UW solution.

These results led us to say that: the time and temperature of preservation, as well as, the ionic composition of preserved solution affected the phagocytic activity and the production of superoxide; Collins and Euro-Collins group always were different, so the magnesium sulfate should be important in the functional activity of these cells; the preserved solutions didn't avoid the release of free radicals; and the substances of UW utilized to eliminate free radicals were not efficient in our experimental conditions.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aalto, T. K. & Raivro, K. O. *Metabolism Adenine Nucleotides by Human Endothelial Cells to Reactive Oxygen Metabolites.* American J. Physiol., 264(33): C282-C286, 1993.
2. Absolom, D. R. *Basic Methods for the Study of Phagocytosis.* Methods in Enzymology, 132: 95-180, 1986.
3. Andreoli, S. P.; Mc Ateer, J. A.; Mallet, C. *Reactive Oxygen Molecule-Mediated Injury in Endothelial and Renal Tubular Epithelial Cells In Vitro.* Kidney International, 38: 785- 794, 1990.
4. Baatard, R.; Pradier, F.; Dantal, J.; Karam, G.; Cantarovich, D.; Hourmant, M.; Bourbigot, B.; Soullillou, J. P. *Prospective Randomized Comparizon of University of Wisconsin and UW - Modified, Lacking Hydroxyethyl - Starch, Cold - Strage Solutions in Kidney Transplantation.* Transplantation, 55(1): 31-35, 1993.
5. Babor, B. M.; Kipnes, R. S.; Curnutte, J. T. *Biological Defense Mechanisms: The Production by Leukocytes of Superoxide. A*

*Potential Bactericidal Agent. The Journal Clinical Investigation, 152: 741-744, 1973.*

6. Babor, B. M. *The Respiratory Burst of Phagocytes. Journal Clinical Investigation, 73: 599- 601, 1984.*
7. Barry, J. M. IN Campbell's Urology. edited by Walsh, P. C.; Retik, A. B.; Stamey, T. A.; Vaughan Jr., E. D. 6<sup>th</sup> edition. W. B. Saunders Company - USA. page: 2501-2518, 1992.
8. Belzer, F. & Southard, J. H. *Principles of Solid-Organ Preservation by Cold Storage. Transplantation, 45(4): 673- 676, 1988.*
9. Bennett, J. F.; Bry, W. I.; Collins, G. M.; Halaz, N. A. *The Effects of Oxygen Free Radicals on the Preserved Kidney. Cryobiology, 24: 264-269, 1987.*
10. Bos, H. J.; Meyer, F.; Veld, J. C.; Beelen, R. H. J. *Peritoneal Dialysis Fluid Induces Change of Mononuclear Phagocyte Proportions. Kidney International, 36: 20-26, 1989.*
11. Boswell, J. M.; Yui, M. A.; Burt, D. W.; Kelley, V. E. *Increased Tumor Necrosis Factor and IL-1 Beta Gene Expression in the Kidneys of Mice with Lupus Nephritis. The Journal of Immunology, 141: 3050-3054, 1988.*

12. Boyce N. W.; Tipping, P. G.; Holdsworth. *Glomerular Macrophages Produce Reactive Oxygen Species in Experimental Glomerulonephritis*. Kidney International, 35: 778-782, 1989.
13. Bulkley, G. B. *The Role of Oxygen Free Radicals in Human Disease Processes*. Surgery, 94(3): 407- 411, 1983.
14. Camarero, V. C. P. C.; Junqueira, V. B.; Colepicolo, P.; Karnovsky, M. L.; Mariano, M. *Epithelioid Macrophages Secrete a Deactivating Factor for Superoxide Release*. Journal of Cellular Physiology, 145: 481- 487, 1990.
15. Chervu, I.; Kiersztejn, M.; Alexiewicz, J. M.; Fadda, G. Z.; Smogorzewski, M.; Massry, S. G. *Impaired Phagocytosis In Chronic Renal Failure is Mediated by Secondary Hyperparathyroidism*. Kidney International, 41:1501- 1505, 1992.
16. Chiara, M. D. & Sobrino, F. *Modulation of the Inhibition of Respiratory Burst in Mouse Macrophages by Cyclosporin A: Effect of In Vivo Treatment, Glucocorticoids and the State of Activation of Cells*. Immunology, 72: 133- 137, 1991.
17. Collins, G. M. & Wicomb, W. N. *New Organ Preservation Solutions*. Kidney International, 42(Suppl.38): 197- 202, 1992.
18. Davls, C. E.; Belosevic, M.; Meltzer, m. s.; Nacy, C. A. *Regulation of Activated Macrophage Antimicrobial Activities*. *Cooperation of*

*Lymphokines for Induction of Resistance to Infection.* The Journal of Immunology, 141(2): 627-635, 1988.

19. Donati, Y. R. A.; Kantengwa, S.; Poila, B. S. *Phagocytosis and Heat Shock Response in Human Monocytes-Macrophages.* Pathobiology, 59: 156-161, 1991.
20. Dreikorn, K.; Horsch, R.; Röhl, L. *48-to 96-Hour Preservation of Canine Kidneys by Initial Perfusion and Hypothermic Storage Using the Euro-Collins Solution.* Eur. Urol., 6: 221-224, 1980.
21. Endres, H. S.; Fülle, J.; Sinha, B.; Stoll, D.; Dinarello, C. A.; Gerzer, R.; Weber, P. C. *Cyclic Nucleotides Differentially Regulated the Synthesis of Tumor Necrosis Factor - and Interleukin-1 by Human Mononuclear Cells.* Immunology, 72: 56-60, 1991.
22. Eze, M. O.; Hunting, D. J.; Ogan, A. U. *Reactive Oxygen Production Against Malaria - A Potential Cancer Risk Factor.* Medical Hypothesis, 32: 121-123, 1990.
23. Figuelredo, J. F.; Falkenstein, D.; Draibe, S. O.; Sigulen, D.; Ramos, O. C. *The Effect of Collins Solution on the Function and Structure of Isolated Proximal Convoluted Tubules from Rabbit Kidneys.* Transplantation, 42(1): 80-83, 1986a.
24. Figuelredo, J. F.; Falkenstein, D.; Santo, L. E.; Martinez, T.; Ribeiro, R. C. J.; Moura, L. A. R.; Draibe, S. A. *Release of Lactate*



- Dehydrogenase Activity by Rabbit Renal Cortex Slices During Storage in Solutions Used for Kidney Transplantation. Brazilian J. Med. Biol. Res., 19: 303-309, 1986b.*
25. Follin; Dahlgren, C. *Altered O<sub>2</sub> / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production Ratio by In Vitro and In Vitro Primed Human Neutrophils. Biochemical and Biophysical Research Communications, 167(3): 970-976, 1990.*
26. Freeman, B. A.; Crapo, J. D. *Biology of Disease: Free Radicals and Tissue Injury. Lab. Investigation. 45(5): 412-426, 1982.*
27. Gaillard, T.; Mülsch, A.; Busse, R.; Decker, K. *Regulation of Nitric Oxide Production by Stimulated Rat Kupffer Cells. Pathobiology, 59: 280-283, 1991.*
28. Gavison, R.; Bar-Shavit, Z. *Impaired Macrophage Activation in Vitamin D<sub>3</sub> Deficiency: Differential In Vitro Effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on Mouse Peritoneal Macrophage Functions. The Journal of Immunology, 143(11): 3686-3690, 1989.*
29. Granger, D. L.; Cameron, M. L.; Lee-See, K.; Hibbs Jr., J. B. IN *Mononuclear Phagocytes in Cell Biology*. edited by Berestein-Lopez, G. & Klostergaard, J. CRC Press - Florida-USA. pp: 7-30, 1993.
30. Green, C. J.; Healing, G.; Lunec, J.; Fuller, B. J.; Simpkin, S. *Evidence of Free-Radical Damage in Rabbit Kidneys After Simple Hypothermic*

*Preservation and Autotransplantation. Transplantation, 41(2): 161-165, 1986.*

31. Halliwell, B.; Gutteridge, M. C. *Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metals and Disease. Biochem. J., 219: 1-14, 1984.*
32. Hamilton, T. A.; Ohmori, Y.; Narumi, S.; Tannenbaum, C. S. IN Mononuclear Phagocytes In Cell Biology. edited by Berestein-Lopez, G. & Klostergaard, J. CRC Press - Florida -USA. pp: 47-70, 1993.
33. Hammond, B.; Kontos, H. A.; Hess, M. L. Oxygen Radicals in the Adult Respiratory Distress Syndrome, in Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury, and in Cerebral Vascular Damage. Can. J. Physiol. Pharmacol., 63: 173-187, 1984.
34. Hunsicker, L. G.; Shearer, T. P.; Plattner, S. B.; Weisenburger, D. *The Role of Monocytes in Serum Sickness Nephritis. The J. of Experimental Medicine, 150: 413-425, 1979.*
35. Johnston Jr., R. B. *Current Concepts: Immunology. Monocytes and Macrophages. The New England J. of Medicine, 318(12): 747-752, 1988.*
36. Junqueira, L. C. & Carneiro, J. - Histologia Básica- 6ª edição. Ed. Guanabara Koogan - Rio de Janeiro, Brasil. pp: 87-117, 1985.

37. Kitahora, T.; Suzuki, K.; Asakura, H.; Yoshida, T.; Suematsu, M.; Watanabe, M.; Sadakazu, A.; Tsuchiya, M. Active Oxygen Species Generated by Monocytes and Polymorphonuclear Cells in Crohn's Disease. Digestive Diseases and Science, 33(8): 951-955, 1988.
38. Kvarstein B. Oxygen Consumption during the Initial Stage of Human Leucocyte Phagocytosis of Polystyrene Latex Particles. The Scandinavian J. of Clinical & Laboratory Invest., 25(4): 337-348, 1970.
39. Langer, B. Radicals Livres, Isquemia e Inflamação. Rev. Paul. Med., 104(6): 305-310, 1986.
40. Linas, S. L.; Whittenburg, D.; Parsons, P. E.; Repine, J. E. Mild Renal Ischemia Activates Primed Neutrophils to Cause Acute Renal Failure. Kidney International, 42: 610-616, 1992.
41. Lohmann-Mathes, M.-L.; Emmendoerffer, A.; Hao, L. Influence of Interleukin-2 on the Differentiation of Macrophages. Pathobiology, 59: 117-121, 1991
42. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. & Randall, R. L. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem., 193: 266-275, 1951.
43. Mackaness, G. B. IN Mononuclear Phagocytes in Cell Biology, edited by Berestein-Lopez, G. & Klostergaard, J. CRC Press - Florida - USA. pp: 1-6, 1993.

44. Magil, A. B.; Wadsworth, L. D.; Loewen, M. *Monocytes and Human Renal Glomerular Disease. Lab. Invest., 44(1): 27-33, 1981.*
45. Mc Cord, J. M. *Mechanisms of Disease. Oxygen-Derived Free Radicals In Postischemic Tissue Injury. The New England J. of Medicine, 312(3): 159-163, 1985.*
46. Monga, G. Mazzucco, G.; di Belgiojoso, G. B.; Busnach, G. *The Presence and Possible Role of Monocyte Infiltration in Human Chronic Proliferative Glomerulonephritides. American J. of Pathol., 94: 271-284, 1979.*
47. Nathan, C. F. *Secretory Products of Macrophages. J. Clin. Invest., 79: 319-326, 1987.*
48. Oberle, G. P. ; Niemeyer, J.; Thalss, F.; Schoeppe, W.; Stahl, R. A. K. *Increased Oxygen Radical and Eicosanoid Formation in Immune-Mediated Mesangial Cell Injury. Kidney International, 42: 69-74, 1992.*
49. Oosting, R. S.; Van Bree, L.; Van Iwaarden, J. F.; Van golde, L. M. G.; Verhoef, J. *Impairment of Phagocytic Functions of Alveolar Macrophages by Hydrogen Peroxide. Am. J. Physiol., 259(3): L87-L94, 1990.*

50. Ortmeyer, J.; Mohsenin, V. *Glucose Suppress Superoxide Generation In Normal Neutrophils: Interference In Phospholipase D Activation.* Am. J. Physiol., 264(33): C402-C410, 1993.
51. Paller, M. S. Renal Work, *Glutathione and Susceptibility to Free Radical-Mediated Postischemic Injury.* Kidney International, 33: 843-849, 1988.
52. Parks, D. A.; Bulkley, G. B.; Granger, D. N. *Role of Oxygen Free Radicals in Shock, Ischemia, and Organ Preservation.* Surgery. 94(3): 428-431, 1983.
53. Paul, J. - Cell And Tissue Culture. 5<sup>a</sup> edition. Churchill Livingstone - USA. page: 91-123; 385-449, 1975.
54. Pick, E & Kelsari, Y. *A Simple Colorimetric Method for the Measurement of Hydrogen Peroxide Produced by Cells in Culture.* J. of Immunological Methods, 38: 161-170, 1980.
55. Pick, E. & Mizel D. *Rapid Microassays for the Measurement of Superoxide and Hydrogen Peroxide Production by Macrophages in Culture Using an Automatic Enzyme Immunoassay Reader.* J. of Immunological methods, 46: 211-226, 1981.
56. Ratych, R. E.; Chuknylska, R. S.; Bulkley, G. B. *The Primary Localization of Free Radical Generation After Anoxia/Reoxygenation in Isolated Endothelial Cells.* Surgery., 102(2): 122-131, 1987.

57. Remuzzi, G.; FitzGerald, G. A.; Patrono, C. *Treniboxane Synthesis and Action Within the Kidney*. Kidney International, 41: 1483-1493, 1992.
58. Ribeiro, C. A. L. *Estudo do Efeito das Soluções Conservadoras de Collins, Euro-Collins e Universidade de Wisconsin Sobre a Permeabilidade à Água de Túbulos Coletores Corticais de Coelho "In Vitro"*. Tese de Mestrado na área de Fisiologia apresentada a Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - SP., 1992.
59. Rijkmans, D. G.; Wijk, J. V. D.; Donker, A. J. M.; Stoof, M. J. H.; Kootstra, G. Functional Studies in 6 Days Successful Preserved Canine Kidneys. The Journal of Urology, 127: 163-166, 1982.
60. Robbins, S. L.; Cotran, R. S.; Kumar, V. IN Patologia Estrutural e Funcional. 3a edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil. pp: 39-67, 1986.
61. Russo, M.; Teixeira, H. C.; Marcondes, M. C. G. *Superoxide Independent Hydrogen Peroxide Release by Activated Macrophages*. Brazilian J. Med. Biol. Res., 22: 1271-1273, 1989.
62. Schreiner, G.; Cotran R. S.; Pardo, V.; Unanue, E. R. *A Mononuclear Cell Component in Experimental Immunological Glomerulonephritis*. The J. of Experimental Medicine, 147: 369-384, 1978.

63. Schreiner, G.; Kohan, D. E. *Regulation of Renal Transport Processes and Hemodynamics by Macrophages and Lymphocytes.* Am. J. Physiol., 258(27): F761-F767, 1990.
64. Skaleric, U.; Allen, J. B.; Smith, P. D.; Mergenhagen, S. E.; Wahl, S. M. *Inhibitors of Reactive Oxygen Intermediates Suppress Bacterial Cell Wall-induced Arthritis.* The J. of Immunology, 147(8): 2559-2564, 1991.
65. Slater, T. F. *Free-Radical Mechanisms in Tissue Injury.* Biochem. J., 222: 1-15, 1984.
66. Southard, J. H. & Belzer, F. O. IN Renal Preservation. edited by Marberger, M. & Dreikorn, K. Waverly Press - Baltimore - USA. pp: 188-210, 1983.
67. Sraer, J.; Bens, M.; Ardailou, R. *Dual Effect of Cyclosporine A on Arachidonate Metabolism by Peritoneal Macrophages.* Biochemical Pharmacology, 38(12): 1947-1954, 1989.
68. Stefanovic, V.; Savic, V.; Vlahovic, P.; Ardailou, N.; Ardailou, R. *Macrophages Selectively Stimulate Ecto-5'- Nucleotidase Activity of Cultured Mesangial Cells.* Kidney International. 36: 249-256, 1989.
69. Sussman, M. S. & Bulkley, G. B. *Oxygen-Derived Free Radicals in Reperfusion Injury.* Methods in Enzymology, 186: 711-755, 1990.

70. Taylor, J. E.; Scott, N.; Hill, A.; Bridges, A.; Henderson, I. S.; Stewaet, W. K.; Belch, J. J. F. *Oxygen Free Radicals and Platelet and Granulocyte Aggregability in Renal Transplant Patients. Transplantation, 55(3): 500-504, 1993.*
71. Tsunawaki, S. & Nathan, C. F. *Macrophage deactivation, altered kinetic properties of Superoxide Producing Enzyme After Exposure to Tumor Cell Conditioned Medium. J. Exp. Med., 164: 1319-1331, 1986.*
72. Turpin, J. A. & Berenstein-Lopez, G. In Mononuclear Phagocytes In Cell Biology. edited by Berenstein-Lopez, G. & Klostergaard, J. CRC Press Florida - USA. pp: 71-100, 1993.
73. Vanholder, R.; Ringoir, S.; Dhondt, A.; Hakim, R.; *Phagocytosis in Uremic and Hemodialysis Patients: A Prospective and Cross Sectional Study. Kidney International, 39: 320-327, 1991.*
74. Van Oss, C. J. *Phagocytosis: An Overview. Methods In Enzymology, 132: 3-15, 1986.*
75. Varani, J.; Taylor, C. G.; Riser, B.; Shumaker, D. K.; Yeh, K.Y.; Dame, M.; Gibbs, D. F.; Todd, R. F.; Dumler, F.; Brombrg, J.; Killen, P. D. *Mesangial Cell Killing by Leukocytes: Role of Leukocyte Oxidants and Proteolytic Enzymes. Kidney Inernational, 42: 1169-1177, 1992.*



76. Vernon, B. - Roberts. The macrophage. edited by Harrison, R. H. & Mc Minn R. M. H. Cambridge University Press, London. pp: 242, 1972.
77. Vincent F.; Eischem, A.; de la Salle, H.; Bergerat, J. P.; Faradji, A.; Hauptman, G.; Oberling, F. *Synthesis of Complement Components C2 and C4 by Human Monocyte-Derived Macrophages during In vitro Differentiation in Serum-Free Culture Conditions*. Pathobiology, 59: 136-139, 1991.
78. Walter, S.; Gonovi, D.; Bottazzi, B.; Mantovani, A. *The Role of Macrophages in the Regulation of Primary Tumor Growth*. Pathobiology, 59: 239-242, 1991.
79. Weiss, S. & LoBuglio, A. F. *Biology of Disease. Phagocyte-Generated Oxygen Metabolites and Cellular Injury*. Lab. Invest., 47(1): 5-18, 1982.
80. Yu, W.; Coddington, D.; Bitter-Suermann, H. *Rat Liver Preservation*. Transplantation, 49(6): 1060-1066, 1990.
81. Ziegler-Heltbrock, H. W. L.; Ströbel, M.; Fingerle, G.; Schlunck, T.; Pforte, A.; Blumenstein, M.; Haas, J. G. *Small (CD14+/ CD16+) Monocytes and Regular Monocytes in Human Blood*. Pathobiology, 59: 127-130, 1991.