

ERRATA

Estudo Experimental de Transplante Renal, com diferentes
líquidos de perfusão para conservação do órgão.
Aspectos Microcirúrgicos.

Página 22: na segunda linha de baixo para cima
onde se lê: amarelo séria
ler: amarelo CEREÁ.

Página 28: 2.11.1
na sétima linha
onde se lê: branco sério
ler: branco CEREO

Página 36: TABELA 8
na 2a. coluna, onde se lê: Anastomoses Pérvias
ler: Anastomoses OCLUÍDAS

Página 39: Figura 2 onde se lê: Grupo II a
ler: Grupo I a

Página 40: Figura 3 onde se lê: Grupo II b
ler: Grupo I b

Tabela 11
na 1a. coluna e 3a. linha, onde se lê: (3,33%)
ler: (33,33%)

Página 41: TABELA 12
Na 2a. coluna, na 1a. linha, onde se lê: 2+ RR
ler: 3+ RR
Na 2a. coluna, na 2a. linha, onde se lê: 5+ F
ler: 6+ F
Na 2a. coluna, na 3a. linha, onde se lê: 3+++ FF
ler: 4+++ FF

ANA TEREZINHA GUILLAUMON

Este exemplar corresponde à
versão final da tese de Doutorado
apresentada à Faculdade de
Ciências Médicas da UNICAMP
pela médica Ana Terezinha
Guillaumon.

Campinas 23 de outubro de 1991.

Prof. Dr. ~~Reinaldo W. Vieira~~
- Orientador -

ESTUDO EXPERIMENTAL DE TRANSPLANTE RENAL, COM
DIFERENTES LÍQUIDOS DE PERFUSÃO PARA CONSERVAÇÃO DO ÓRGÃO
- ASPECTOS MICROCIRÚRGICOS -

Orientador: Prof. Adjunto Reinaldo Wilson Vieira †
Co-orientador: Prof. Livre-Docente José Francisco Figueiredo †

Tese apresentada a Faculdade
de Ciências Médicas da Uni
versidade Estadual de Campi
nas - UNICAMP, para obtenção
do Título de Doutor em Medi
cina.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
CAMPINAS-SP - 1991

81.919.29

À minha mãe, pelo exemplo de inteli
gência e persistência, transmitida
a nós com muito amor.

AGRADECIMENTOS

Aos meus mestres que plantaram a semente do saber quando de minha formação médica.

Ao Professor Doutor Marcelo Ramos, quando coordenador da pós-graduação, pelo incentivo científico e pelo apoio na execução do regulamento do curso.

Ao Professor Doutor José Francisco Figueiredo pelo exemplo de pesquisador, rigor científico e incentivo perfeccionista em meu trabalho.

Ao Professor Doutor Reinaldo Wilson Vieira, um agradecimento muito especial, pois sempre primou pela dignidade científica, precisão nas pesquisas, bem como orientou minha dissertação de mestrado e me acompanhou em todos os estágios deste trabalho e sua elaboração.

Aos funcionários do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, especialmente a Doutora Doris Falkenstein que elaborou a análise estatística; a bióloga Rosana Celestina Morandin Ribeiro de Paiva, pelo auxílio durante todo o desenvolvimento do trabalho e ao Senhor Gomes Sarmento Alvim, pela constante paciência no acompanhamento dos trabalhos no Laboratório de Microcirurgia Experimental.

Ao meu amigo e companheiro Paulo Pazotto, pela paciência e companheirismo na redação deste trabalho.

Aos meus amigos Professora Doutora Elza Cotrim Soares, Doutora Luiza Branchini, Professor Doutor Raul Raposo de Medeiros, Doutor Jorge Saide Calil, que estiveram juntos comigo no dia a dia de minha vida acadêmica.

Ao Senhor Erasmo Gomes Carrasco, pela realização dos serviços de datilografia.

Í N D I C E

I	- INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	6
II	- MATERIAL E MÉTODOS.....	15
	2.1. Animal de Experimentação.....	15
	2.2. Planejamento.....	18
	2.3. Anestesia.....	20
	2.4. Pré-operatório.....	21
	2.5. Intra-operatório dos diferentes grupos.....	21
	2.6. Técnica operatória.....	22
	2.7. Pormenores técnicos da perfusão.....	25
	2.8. Pós-operatório.....	26
	2.9. Sacrifício dos animais.....	26
	2.10.Exame preliminar funcional das anastomoses renais e do rim global, ao microscópio cirúrgico (GRUPO I).....	27
	2.10.1. Critérios utilizados para o exame da anastomose arterial renal e do rim transplantado.....	27
	2.11.Preparo do material para o exame anátomo-patológico no GRUPO I.....	28
	2.11.1. Perfusão renal.....	28
	2.11.2. Retirada da peça cirúrgica.....	28
	2.12. Exame histopatológico.....	29
	2.12.1. Critérios utilizados no exame histopatológico.....	29
	2.13. Estudo funcional dos rins (GRUPO II).....	30
	2.14. Procedimentos anestésicos e cirúrgicos para a avalia- ção funcional do rim.....	30
III	- RESULTADOS.....	33
	3.1. Resultados ao microscópio cirúrgico no GRUPO I (Ia e Ib).....	33
	3.1.1. Exame das anastomoses arteriais e dos rins no grupo I (Ia e Ib).....	33
	3.1.1.1. Intra-operatório.....	33
	3.1.1.2. Pós-operatório ao microscópio cirúrgico.....	34
	3.2. Resultados ao microscópio óptico.....	35
	3.2.1. Resultados histopatológicos das anastomoses arteriais...	36
	3.2.2. Resultados histopatológicos dos rins.....	38
	3.2.3. Resultados funcionais.....	42

IV	- ANÁLISE GLOBAL DOS RESULTADOS.....	45
	4.1. Resultados.....	45
	a. Análise das características de cicatrização das anastomoses.....	45
	b. Análise comparativa das alterações do parênquima renal sofridas pelos dois rins nos grupos de perfusão (solução fisiológica e solução de diálise peritoneal a 1,5%).....	47
	b.1. Primeira fase do experimento.....	47
	b.2. Segunda fase do experimento.....	48
	b.3. Análise dos resultados funcionais.....	49
V	- DISCUSSÃO.....	52
VI	- CONCLUSÕES.....	60
VII	- RESUMO.....	62
VIII	- BIBLIOGRAFIA.....	63

I - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A preservação adequada do rim, por um período de tempo prolongado, consiste em um requisito importante para o sucesso no transplante renal de cadáver. Este é importante porque permite um período de tempo adequado para que sejam feitas as tipagens e a preparação das equipes clínicas e cirúrgicas e finalmente se coloque o órgão em outro organismo, em condições de viabilidade. Este procedimento poupará ao doente sacrifícios e riscos clínicos, não abolindo apenas aqueles inerentes ao próprio transplante.

Atualmente existem diversas técnicas para a preservação do órgão (BELZER, F.O. & SOUTHARD, J.H., 1980; MARSHALL, V.C., 1980), entretanto, a maioria dos centros de transplante utiliza principalmente rins de cadáver e empregam as manobras hipotérmicas de lavagem a frio do órgão com soluções iônicas ou então a perfusão contínua, a 10°C com bombas contendo crioprecipitados de plasma. Estas técnicas são falhas quando os períodos de conservação são maiores que 24 horas e não conseguem prevenir a deterioração do órgão, e por conseguinte levando a necrose tubular aguda (N.T.A.) (DONOHUE, J.F. e col., 1978; HENDERSON, L.W. e col., 1968; MORGAN, D.B., 1982). A avaliação desta deterioração funcional fica às vezes difícil de ser detectada, pela presença de rejeição aguda, o que agrava o quadro de insuficiência renal aguda por N.T.A. (BESARAB, B. e

col., 1982). Existem muitas variáveis nas soluções preservadoras, sendo que alguns investigadores demonstraram que a inibção do edema celular, mais do que a manutenção do conteúdo celular de potássio pode ser o fator mais importante do efeito preservador das assim chamadas soluções que mimetizam o meio "intracelular" durante o armazenamento hipotérmico (SIMÕES , J.D. e col., 1984; DOWNES, G. e col., 1973; COLLINS, G.M. e col., 1969; COLLINS, G.M. e col., 1980). Por outro lado, utilizando-se a preparação do rim isolado, vários autores testaram também soluções de conservação por perfusão a 10°C aproximadamente (DOWNES, J.D. e col., 1973; JABLONSKI, P. e col. ., 1980) e concluíram, em parte, que existem diferenças entre as diversas soluções propostas para a conservação, a nível de atividade bioquímica intracelular, quando avaliadas, em condições normotérmicas, dentre estas soluções a de Collins, Sacks , Perfudex e citrato hipertônico (DOWNES, J.D. e col., 1973 ; BISHOP, M.C. e col., 1978; JABLONSKI, P. e col., 1980; SACKS , S.A. e col., 1973) e a solução de Aquactella (AQUACTELLA, H. e col., 1972).

Diversos investigadores demonstraram também que a presença de colóides (albumina, globulina e dextrana) (PEGG , D.E., 1986; VAN DER VICJK e col., 1983) são importantes na perfusão normotérmica e que as soluções hipotérmicas sã o não são mais efetivas pela falta de colóides (TOLEDO-PEREYRÁ, L.H. e col., 1978; SWANSON, J.W. e col., 1981; PEGG, D.E., 1986) . Da mesma forma tem se trabalhado no tamponamento efetivo , principalmente no papel do tampão sulfato, e se tem demonstrado que a atividade tamponante destas soluções protegem o rim durante o processo isquêmico que é extremamente acidótico (BORE, P.J. e col., 1981). Por outro lado existem observações interessantes em relação a presença ou ausência de magnésio nas

soluções de Collins (com magnésio) (COLLINS, G.M. e col., 1984) e Euro-Collins (sem magnésio), paradoxalmente mantêm as propriedades conservadoras de diversos órgãos como o rim, fígado e pâncreas (BELZER, F.O. & SOUTHARD, J.H., 1986; COLLINS, G.M. e col., 1984; MARSHALL, V.C., 1980).

Recentemente um grupo de investigadores da Universidade de Wisconsin lançou uma nova solução conservadora para lavagem a frio, com perfusão por pressão hidrostática, que foi chamada de soluçãde Wisconsin (U.W.S.) (BELZER, F.O. & SOUTHARD, J.H. 1988). Nesta solução, colocada a disposição no mercado, foram introduzidas na sua elaboração conhecimentos bioquímicos celulares importantes, tais como colóides não proteicos para evitar a antigenicidade, potássio hipertônico (Lactobionato de potássio) e não manitol ou sacarose como agente osmótico, pois estes podem ser tóxicos para célula e substratos energéticos (glutation) (BELZER, F.O. & SOUTHARD, J.H., 1988).

Acrescentando ao exposto, também foram introduzidas substâncias chamadas "scavengers" ou incorporadoras de peróxidos, pois a estas substâncias tem sido atribuída a responsabilidade pela instabilidade da membrana celular e o funcionamento / das cadeias enzimáticas, bem como a ativação de enzimas no citoplasma ou na membrana citoplasmática que poderiam levar ã N.T.A.

Apesar desta solução de terceira geração (solução de Belzer ou U.W.S.) ter sido lançada há dois anos, os principais centros de transplantes no mundo continuam utilizando a solução de Collins ou euro-Collins (COLLINS, G.M. e col., 1989 ; COLLINS, G.M. e col., 1980). Cumpre ainda destacar que, mesmo com a evolução da tecnologia em biomedicina, a confecção destas soluções são empíricas e obedecem a lei do "erro" e do "acerto" (eurística). Assim, teoricamente, elabora-se uma solução para

conservação, infunde-se no órgão, no caso o rim e se mede a função por vários períodos de conservação, estabelecendo-se desta forma a sua eficácia em termos de conservação funcional, dependendo da função renal residual que o órgão apresenta, avaliada pelo nível de creatinina plasmática ou de seu "clearance", excluindo-se a sua significância se estiver presente a rejeição imunológica do órgão.

Do exposto, verificamos a necessidade da montagem de modelos experimentais adequados para se testar a eficiência das soluções pós-transplantes ou durante o processo de conservação, bem como, a sistematização de estudos da fisiologia celular permitindo que estas soluções sejam manipuladas adequadamente para que se possa atingir uma eficiência máxima.

Apesar de vários estudos experimentais e clínicos, a fisiopatologia da insuficiência renal aguda isquêmica pós-transplante continua obscura. Em parte o desconhecimento deste fenômeno pode ser atribuído às diferentes possibilidades que podem levar a insuficiência renal aguda, e conseqüentemente, às dificuldades para se correlacionar os diversos modelos clínicos e experimentais desta patologia.

Fatores vários podem produzir insuficiência renal aguda (I.R.A.) lesando a célula tubular ou glomerular renal, mas o mecanismo final que agrava a lesão é a isquemia e a hipóxia (ENGBERG, A. e col., 1983). Portanto é importante distinguir entre a isquemia e a hipóxia como fatores preponderantes / na insuficiência renal aguda (I.R.A.).

Na conservação renal, a isquemia é o principal fator na produção da insuficiência renal aguda, mas sem dúvida a reperfusão do órgão com sangue também deve ter um papel importante neste fenômeno. Na prática contornamos este fator importante encurtando ao máximo o tempo de isquemia, prevenindo

desta forma a hipóxia que conduz a produção de radicais livres de oxigênio e outros metabólitos que destroem a membrana celular.

Na literatura há trabalhos experimentais que demonstram comparativamente que existem isquemias produzidas pela obstrução da artéria renal e pela retirada do rim e sua perfusão, a baixas temperaturas, com soluções preservadoras, como a de Collins e Euro.Collins. Estes trabalhos tem mostrado que até por duas horas estas conservações são efetivas na preservação tecidual, após o qual há uma significativa deterioração da função (HARVIG, B. & NORLEN, B.J., 1980). Estes resultados demonstram que existe um "limite de viabilidade" do tecido renal nas diversas situações experimentais no que se refere a função vascular (NORLEN, B.J. e col., 1978a), glomerular e tubular (NORLEN, B.J. e col., 1978b; HARVIG, G. e col., 1980).

Desta forma, torna-se necessário detectar de forma mais apurada o quanto de parênquima renal, independente da função renal residual, permanece funcionando após a conservação, pois após a insuficiência renal aguda em animais de experimentação ou em humanos, poderá haver um déficit de função consequente a diminuição da população de nefrons funcionantes durante o processo de conservação e/ou outras patologias associadas, levando a população restante de nefrons à hipertrofia e ao funcionamento com capacidade máxima em hiperfiltração (FINN, W.F., 1983), o que pode levar a uma deterioração mais rápida do rim e da filtração glomerular por gloméruloesclerose.

Do exposto, depreendemos a necessidade de se estudar a qualidade das soluções utilizadas na conservação do parênquima renal, bem como a necessidade da montagem de modelos experimentais práticos para estes estudos.

Considerando que o rim de rato é um modelo relativamente adequado e pouco dispendioso, ele tem sido utilizado para testar a eficiência das soluções eletrolíticas para perfusão do órgão, por meio da pressão hidrostática, para lavagem a frio e conservação estática por diversos períodos de tempo.

Entretanto, a cirurgia de transplante renal em rato, apresenta dificuldades técnicas, pela necessidade de se utilizar a microcirurgia.

Assim a técnica básica para as anastomoses arteriais consiste no método simples da sutura circular que foi desenvolvida na primeira década deste século por ALEX. CARREL (1902) e GUTHRIE, C.C. (1912). A aplicação técnica de anastomoses em vasos sanguíneos em larga escala, entretanto, não foi realizada até 1945 quando CRAWFORD reportou o tratamento com sucesso de coarctação de aorta por ressecção e anastomose término-terminal. Dessa forma Novos procedimentos foram sendo estudados qualificando as técnicas ora existentes.

O interesse atual focalizado são as anastomoses em vasos de pequeno calibre e que muitas vezes são vitais, implementando a tecnologia para estudos e experimentos, visando o universo microscópico.

O microscópio cirúrgico somado ao instrumental delicado tornou possível a realização de microssuturas, solidificando desta forma os princípios básicos da microcirurgia e vindo finalizar um capítulo de habilidades do cirurgião.

Nesta fase é importante lembrar que o microscópio composto, inventado por Zacharias Jansen (1590), que tinha a finalidade de estudos microbiológicos, histológicos e patológicos, venha posteriormente inaugurar uma nova era na técnica de abordagens cirúrgicas. Assim NYLEN (1921) usa o microscópio

cirúrgico, experimentalmente, pela primeira vez.

Progressivamente o microscópio binocular introduzido por HOLMGREN (1922) em otologia veio melhorar a precisão do campo visual em três planos, porém, sua progressão de aplicabilidade ocorreu lentamente nas décadas seguintes.

O uso sistemático do microscópio, cirúrgicamente, foi implantado por PERRIT em 1950.

Em 1940, MURRAY introduziu o uso de anticoagulantes, beneficiando os sucessos das anastomoses vasculares. Apesar destes avanços, a manutenção dos vasos p^{er}vios nem sempre pode ser assegurada. Assim, SCHUMAKER & LOWENBERG (1948) e SAIDENBERG, B. e col. (1958) respectivamente, revisando a literatura e estudando técnicas refinadas para superar as complicações advindas do diâmetro dos vasos, discutem os fatores técnicos que influenciariam a trombose na região das anastomoses, verificando a alta incidência de oclusão em vasos de diâmetros externos menores que 3,2 mm. Fato este bem documentado pelos resultados de estudos apresentados por THAL, W. 1956; BUNCKE, H.J. & MURRAY, D.E., 1971 e ABSOLON, K.J.B. & AUST, R.L., 1956 em vasos, cujos diâmetros variaram entre 2 e 4 mm. de diâmetro externo, onde se observou a ocorrência de trombose em 50% dos casos.

A microcirurgia tem seus princípios básicos definidos por JACOBSON, J.H. & SUAREZ, E.L. em 1960, quando aplicaram-na em cirurgias plásticas reconstrutivas. Assim, em uma série sequencial de experimentos de vários autores, a aplicabilidade da microcirurgia tem demonstrado uma capacidade inequívoca de eficácia cirúrgica, quando do treino das técnicas básicas pelo cirurgião.

Desta forma, FISHER, B.S. em 1965; LEE, S. em 1967

propõe o uso da microcirurgia experimentalmente em transplante de órgãos, porém é FABRE, J. e col., 1971, que apresentam detalhes técnicos da cirurgia do transplante renal em ratos. Mas a técnica de implante renal aplicada a este trabalho foi descrita por DANILLER, A. e col., 1968, e FRENCH, M.E. & BACHELOR, J.R. 1969, embora ainda têm sido discutida a técnica cirúrgica melhor para aplicação dos transplantes renais em ratos (OESTERWITZ, H. e col., 1983; JIMENEZ, G. e col., 1988; KORBER, K.E. & KRAEMER, B.A., 1988).

COBBET, J.R., 1967 e FUJINO, T. & AOYAGY, F., 1972 estudaram as técnicas operatórias microcirúrgicas básicas, aumentando a aplicabilidade das suturas vasculares, bem como a melhor forma de realizá-las.

A microcirurgia passa a ser um desafio aos cirurgiões e pesquisadores que passam a dominar a técnica cirúrgica, realizando suturas em vasos de menores calibres, dominando o universo microscópico, auxiliados pela melhora do instrumental para as microcirurgias, chegando a relacionar o sucesso cirúrgico e, como consequência, a patência dos vasos com o instrumental (ACLAND, R., 1972; O'BRIEN, M.Mc C. e col., 1973).

Assim vários trabalhos relatam anastomoses vasculares em vasos de calibres externos microscópicos (JACOBSON, J. H. & SUAREZ, E.L., 1960; BALLINGER, W.F. e col., 1963; HALLER, J.D. e col., 1965; O'BRIEN, B.Mc C. e col., 1970 e 1973; BUNCKE, H.J. & MURRAY, D.E., 1971; ACLAND, D.R., 1972a, 1972b, 1973 e 1975; ELCOCK, H.W. & FREDERICKSON, J.M., 1972; HAYHURST, J.W. & O'BRIEN, B.Mc C., 1975; FUJIMAKI, A. e col., 1977).

A arte da técnica microcirúrgica, entretanto, ainda não é perfeita haja visto a porcentagem de insucessos. Assim um preparo pré-operatório e intra-operatório precisos e com

técnica padronizada e uma avaliação pós-operatória, para análise das anastomoses vasculares, podem elucidar fatores corrigíveis ou contornáveis do insucesso como demonstram INOBUCHI, K. e col., 1961; BAXTER, T. e col., 1972 e ELCOCK, H.W. & FREDERICKSON, J.M. 1972. Bem como a técnica de transplante renal em ratos que foi descrita por LEE, S., 1967; DANILLER, A. e col., 1968 e detalhada por FABRE, J. e col., 1971.

O presente trabalho estuda conjuntamente a forma de conservação de órgãos, os rins, ressaltando a importância / do conhecimento de aspectos fisiológicos para a sua preservação. Cumpre salientar que este tipo de pesquisa na área de conservação de órgãos necessita ainda de conhecimento sistematizados e básicos, de forma a permitir a padronização da conservação, facilitando os transplantes inter-vivos e principalmente de cadáver, em humanos, tendo em vista a escassez, no momento, de órgãos disponíveis para este procedimento.

Do exposto, o presente trabalho tem como objetivos, o estudo experimental em ratos para analisar as anastomoses microcirúrgicas em vasos de pequeno calibre (diâmetro externo de aproximadamente 0,5 mm) e as alterações apresentadas pelo rim do animal de experimentação sob o ponto de vista anatômico e funcional, quando submetido a perfusão com diversas soluções / eletrolíticas, por pressão hidrostática, a baixa temperatura (10°C), seguida do auto transplante renal por técnica microcirúrgica.

II - MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animal de experimentação

Foram utilizados 108 ratos machos da raça wistar, heterogêneos, criados sob condições convencionais, fornecidos pe o Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas. No período dos experimentos, os animais foram mantidos no Biotêrio do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, também sob condições ambientais convencionais, recebendo água e ração apropriada para ratos, "ad libitum".

A seleção dos animais foi feita pela eliminação da aqueles que apresentassem as seguintes características:

1. Comportamento alterado;
2. Pêlo eriçado e sem brilho;
3. Secreção sanguinolenta ao redor dos olhos;
4. Irritação ou descamação da pele e ainda falhas na pelagem.

Os animais de experimentação foram divididos em dois grupos (GRUPO I e GRUPO II). O peso dos animais variou entre 180 e 450 gramas, (TABELA 1 e TABELA 2). Os animais do

grupo I foram subdivididos em dois subgrupos:

Subgrupo Ia - Este subgrupo foi constituído por 45 animais (N=45) que foram submetidos ao auto transplante renal, sendo a perfusão do órgão feita com solução fisiológica (0,9g / dl de NaCl), heparinizada (0,167 mg/ml), a baixa temperatura (10°C), cujo volume de perfusão variou de 3 a 7 ml. (TABELA 3);

Subgrupo Ib - Este subgrupo foi constituído de 45 animais (N=45) que foram submetidos ao auto transplante renal, sendo a perfusão do órgão feita com solução de diálise peritoneal (1,5%), heparinizada (0,167 mg/ml), a baixa temperatura (10°C), cujo volume de perfusão variou de 3 a 7ml (TABELA 4).

Os animais do grupo II, em número de 18, (N=18) foram subdivididos em três subgrupos:

Subgrupo IIa - Os rins deste subgrupo foram perfundidos com solução fisiológica (0,9g/dl de NaCl), a baixa temperatura (10°C), heparinizada. Este subgrupo constou de seis animais (N=6);

Subgrupo IIb - Os rins deste subgrupo foram perfundidos com solução de diálise peritoneal (1,5%), a baixa temperatura (10°C), heparinizada. Este subgrupo constou de seis animais (N=6);

Subgrupo IIc - Os rins deste subgrupo foram perfundidos com solução de Collins, a baixa temperatura (10°C) heparinizada. A heparinização utilizada nos três subgrupos foi na dose de 0,167 mg/ml. A composição química das soluções de perfusão estão expressas na TABELA 5. Este subgrupo constou de seis animais (N=6).

T A B E L A 1

PESO DOS ANIMAIS DO GRUPO I, EM GRAMAS

PESO EM GRAMAS	NÚMERO DE ANIMAIS
180 a 270	30
271 a 360	60
T O T A L	90

T A B E L A 2

PESO DOS ANIMAIS DO GRUPO II, EM GRAMAS

PESO EM GRAMAS	NÚMERO DE ANIMAIS
180 a 270	01
271 a 360	08
361 a 450	09
T O T A L	18

2.2. Planejamento

O trabalho foi iniciado com as cirurgias dos animais do grupo I, sendo que neste grupo se operou um animal por dia, alternando os dois grupos de perfusão (grupo Ia, solução salina e Ib, solução de diálise peritoneal). Após 21 dias e 120 dias, 60 e 30 animais, respectivamente, foram coletadas as anastomoses arteriais e os rins transplantado e o contralateral, supostamente normais, para exame anátomo-patológico.

T A B E L A 3

VOLUME EM MILILITROS DAS SOLUÇÕES DE PERFUSÃO DOS ANIMAIS DO GRUPO I

VOLUME DE PERFUSÃO (ml.)	S.F. NÚMERO DE ANIMAIS	S.D. NÚMERO DE ANIMAIS
3 a 5	9	10
5.1 a 7	36	27
T O T A L	45	45

S.F. - solução fisiológica

S.D. - solução de diálise peritoneal a 1,5%

ml. - mililitros

T A B E L A 4VOLUME EM MILILITROS, DA SOLUÇÃO DE PERFUSÃO
DOS ANIMAIS DO GRUPO II

VOLUME DE PERFUSÃO (ml.)	S.F. NÚMERO DE ANIMAIS	S.D. NÚMERO DE ANIMAIS	S.C. NÚMERO DE ANIMAIS
3 a 5	2	3	3
5.1 a 7	4	3	3
T O T A L	6	6	6

S.F. - solução fisiológica
 S.D. - solução de diálise peritoneal a 1,5%
 S.C. - solução de Collins
 ml. - mililitros

T A B E L A 5

COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES USADAS PARA A PERFUSÃO RENAL

SOLUÇÃO SALINA - (vol. = 1ml.)
 cloreto de sódio = 0,9g./l.

SOLUÇÃO DE DIÁLISE PERITONEAL

glicose = 15,00 g./l.
 lactato de sódio = 5,00 g./l.
 cloreto de sódio = 5,60 g./l.
 cloreto de cálcio = 0,26 g./l.
 cloreto de magnésio = 0,15 g./l.
 sulfato de magnésio = 0,15 g./l.

SOLUÇÃO DE COLLINS - Componente A
 glicose monohidratada 3,57% = 39,27 g./l.
 glicose anidra = 35,70 g./l.
 componente B (vol. = 20 ml.)
 fosfato monoácido de potássio = 2,09 g./l.
 fosfato dibásico de potássio = 0,55 g./l.
 cloreto de potássio = 1,14 g./l.
 bicarbonato de sódio = 0,86 g./l.
 sulfato de magnésio heptahidratado = 6,89 g./l.

A segunda parte do experimento (GRUPO II), constou de animais que foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, sendo subdivididos em três subgrupos:

Subgrupo IIa - Os rins desse subgrupo foram perfundidos com solução fisiológica e constou de seis animais (N=6);

Subgrupo IIb - Os rins deste subgrupo foram perfundidos com solução de diálise peritoneal (1,5%) e constou de seis animais (N=6);

Subgrupo IIc - Os rins deste subgrupo foram perfundidos com solução de Collins e constou de seis animais (N=6).

As soluções estavam heparinizadas e a temperatura aproximada de 10°C. Após 10 dias se fez a avaliação funcional dos rins e o exame anátomo-patológico dos mesmos. Os animais cujas anastomoses vasculares não estavam pèrvias foram abolidos do grupo.

2.3. Anestesia

Os animais foram submetidos a anestesia geral com éter etílico via inalatória, através de máscara cônica contendo algodão embebido e ligada a catêter de oxigênio. A temperatura do ambiente estava constante e de aproximadamente 20°C. A anestesia com éter etílico, acima descrita foi feita para a realização da primeira cirurgia, ou seja, o auto transplante renal. Na segunda cirurgia (animais do grupo II), em que o intuito era a avaliação funcional e anátomo-patológica renal, foi feita anestesia com pentobarbital sódico, intraperitoneal,

na dose de 30 mg./kg de peso corporal do animal; e quando necessária foi feita a suplementação com um terço da dose anestésica inicial.

2.4. Prê-operatório

Os animais selecionados não foram submetidos a jejum pré-anestésico. Após a anestesia inalatória ou intra-peritoneal, os animais foram fixados em prancha cirúrgica aquecida a 37°C em decúbito dorsal horizontal, submetidos a rapagem dos pelos da região abdominal, seguida de assepsia e antisepsia com álcool iodado a 2%.

Não foi utilizada a antibioticoterapia profilática ou pós-operatória.

2.5. Intra-operatório dos diferentes grupos

A primeira parte do experimento (GRUPO I) foi totalmente realizado com o uso de anestesia inalatória, de éter etílico, por embebição do algodão, em máscara cônica.

A segunda parte do experimento (GRUPO II), foi utilizada no primeiro ato operatório indução anestésica com éter etílico via inalatória; e no segundo ato operatório a anestesia foi feita com pentobarbital sódico intraperitoneal.

2.6. Técnica Operatória

Foram realizadas 108 anastomoses microcirúrgicas em artérias renais esquerdas de ratos.

A cirurgia tem início por uma laparotomia mediana xifo-púbica, com abertura dos planos anatômicos da parede abdominal, seguida da abertura da cavidade peritoneal. As alças intestinais são afastadas, envoltas em gaze umedecida com solução fisiológica a temperatura ambiente e protegidas por recipiente plástico.

A seguir, o peritoneo posterior é aberto e se inicia a dissecação da aorta abdominal (microscópio D.F. Vasconcelos, modelo F.C. 250, São Paulo, Brasil) com lentes de aumento de 12,5 x 10, na região da emergência da artéria renal esquerda. Esta artéria é submetida a dissecação em toda sua extensão, ou seja, desde sua emergência da aorta até o hilo renal (aumento de 12,5 x 16).

Prosseguimos a abordagem cirúrgica com a dissecação da veia renal esquerda desde a sua imergência na veia cava inferior, até o hilo renal. Procedemos a ligadura dos vasos (artéria e veia) renais separadamente, em sua porção proximal. Seccionamos os vasos e realizamos o cateterismo da artéria renal com cateter (P.E. 50), (aumento de 12,5 x 25), para perfusão do órgão com solução escolhida aleatoriamente, entre os três tipos previamente selecionados; todas heparinizadas e a baixa temperatura (10°C). A perfusão se faz por coluna de 130 cm de altura para fornecer pressão de infusão suficiente. O órgão é perfundido até se observar uma coloração amarelo-séria. Cumpre salientar que não houve secção do ureter, sendo que o rim

foi recolocado no mesmo local da cavidade abdominal. Esta manobra de não se dissecar o ureter foi planejada com o intuito de evitar que outras variáveis fossem introduzidas no experimento, como exemplo a estenose e/ou a necrose do ureter.

O diâmetro das artérias renais observado variou de 0,5 a 0,8 mm.

A reconstrução microcirúrgica das artérias renais foi realizada após a colocação de pinças vasculares microcirúrgicas na aorta e na veia cava inferior para reimplante do órgão. A anastomose arterial foi realizada sob visão microscópica (aumento de 12,5 x 25), com fio de nylon monofilamentado com diâmetro de 10-0 (Ethicon 2820-G-BOS 3/8), pela aplicação de pontos simples separados, sequenciais, iniciado na parede posterior e se completando na parede anterior (FIGURA 1). Nestes procedimentos cirúrgicos não foi seccionado o ureter, visto que não havia necessidade, pois estávamos avaliando apenas a repercussão da infusão de líquidos de perfusão no órgão e a anastomose microcirúrgica. No entanto o rim foi liberado cuidadosamente e também envolto com a respectiva solução a uma temperatura de aproximadamente 10°C.

TÉCNICA MICRO CIRÚRGICA DE SUTURA

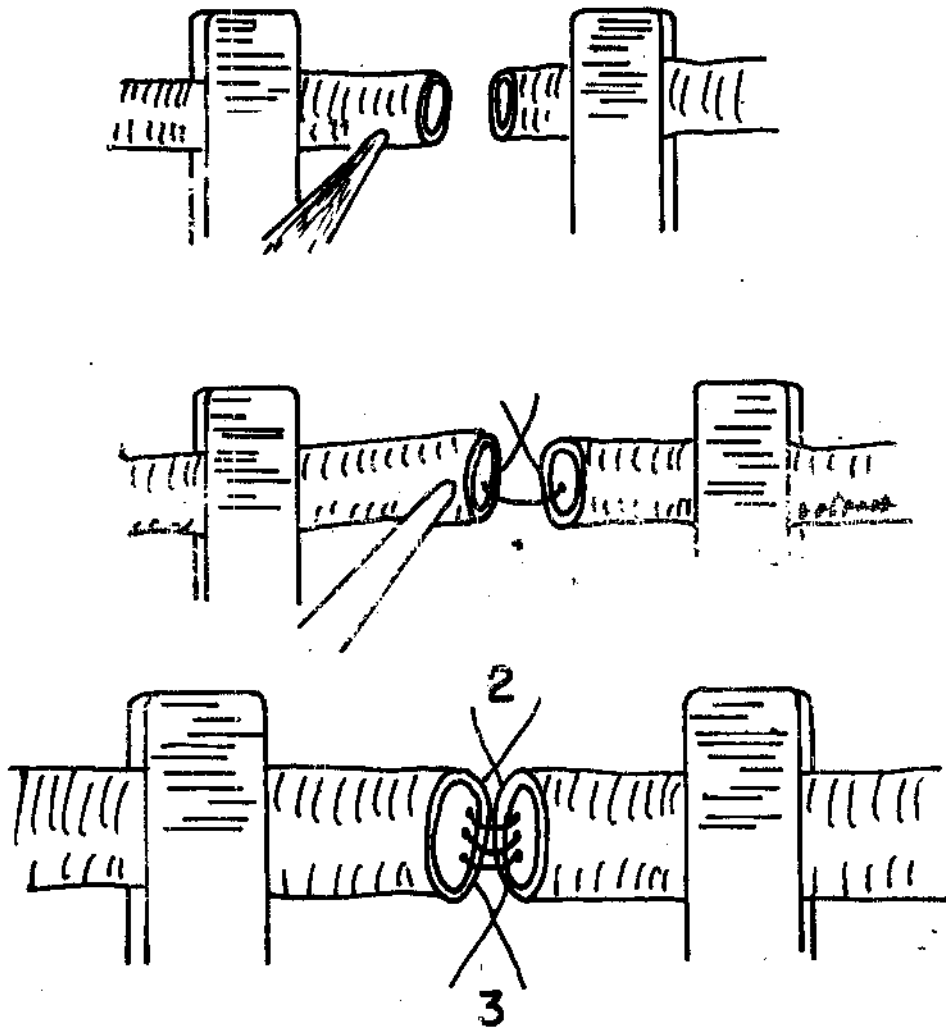


FIGURA 1. Sequência de aplicação de pontos na anastomose microcirúrgica nas artérias renais de ratos Wistar.

Na anastomose venosa repetimos o mesmo procedimento, tomando-se o cuidado de antes de dar o último ponto, liberar o fluxo arterial, de forma a perfundir o órgão e apresentar fluxo venoso.

Os pontos aplicados nas anastomoses variaram em número de 12 a 14, de acordo com o calibre do vaso.

Ao microscópio cirúrgico avaliamos a perfusão renal intra-operatória, e se os vasos (artéria e veia) estavam pervios e sem sangramento.

Procedemos a revisão da cavidade abdominal e suas estruturas, seguido de fechamento do abdome por planos, com fio inabsorvível (nylon monofilamentar 3-0), por chuleio simples.

A variação técnica não foi considerada, tendo em vista que a microcirurgia foi realizada pelo mesmo operador, com o mesmo instrumental cirúrgico e alternadamente nos grupos descritos, com temperatura ambiente controlada (23°C), uniforme e sem variação.

2.7. Pormenores técnicos da perfusão

A perfusão renal foi feita por pressão hidrostática, sendo iniciada após cateterismo da artéria renal com cateter específico para tal fim e conectado a uma coluna líquida da solução de perfusão, de 130 cm de altura, de modo a perfundir o órgão porém sem produzir uma hiper-pressão.

A perfusão renal intra-operatória foi considerada suficiente quando ao microscópio cirúrgico (aumento de 12,5 x 25), se verificou que o rim ficou branco sério. Interrompeu-se a perfusão e o rim ficou com o líquido de perfusão retido em seu parênquima por um período de 20 minutos.

2.8. Pós-operatório

Após a microcirurgia, nas primeiras 72 horas, os animais foram mantidos em gaiolas individuais. Não foi administrado antibiótico ou analgésico. A ingestão líquida e sólida foi liberada após passar o efeito anestésico.

Os ratos foram inspecionados diariamente até o vigésimo primeiro dia de pós-operatório, determinado para o sacrifício dos animais (60 animais dos grupos Ia e Ib); e no 120º dia de pós-operatório (30 animais dos grupos Ia e Ib). Nos animais do grupo II a inspeção foi realizada até o 10º dia de pós-operatório, quando foram sacrificados após a análise da função renal.

2.9. Sacrifício dos animais

A padronização utilizada para o sacrifício dos animais foi:

a) Anestesia geral com éter etílico via inalatória, através de máscara cônica, contendo algodão embebido, ligada a cateter de oxigênio, para os animais do grupo I. Nos animais do grupo II, onde avaliamos a função renal, utilizamos anestesia / com pentobarbital sódico, intraperitoneal (30 mg./kg de peso corporal);

b) Laparotomia xifo-pública mediana seguida da abertura da cavidade peritoneal, afastamento das alças intestinais e abertura do peritoneo posterior para proceder a dissecação da artéria renal em toda a sua extensão.

Nesta primeira fase do experimento retiramos a anastomose renal e o rim e encaminhamos para a avaliação anátomo - patológica, utilizando como fixador o corante de Bouin.

2.10. Exame preliminar funcional das anastomoses renais e do rim global ao microscópio cirúrgico (GRUPO I).

A punção da artéria renal foi realizada na região pré-anastomótica, que foi cateterizada introduzindo-se uma agulha no sentido proximal à aorta. Através desta cateterização foi medida a pressão intra-arterial. Nova punção foi realizada na artéria renal porém na região pós-anastomótica e se repetiu a mesma técnica para a medida da pressão intra-arterial pré-anastomótica.

A pressão arterial renal variou entre 110 a 130mmHg, sendo que nos animais em que se observou haver um gradiente de pressão pré e pós-anastomótico, foram desprezados, tendo em vista que não tencionavamos avaliar as alterações renais quando houvessem alterações de perfusão renal por defeito técnico existente nas anastomoses vasculares.

2.10.1. Critérios utilizados para o exame da anastomose vascular e do rim transplantado.

A avaliação da artéria renal externamente, se fez através do microscópio cirúrgico na região da anastomose (aumento de 12,5 x 25), e a avaliação renal no seu aspecto externo

(aumento de $12,5 \times 10$). A avaliação da anastomose foi feita sob a seguinte classificação: Com estenose, com obstrução, normal . Na avaliação renal também adotamos a classificação qualitativa : rim normal, rim com áreas de fibrose e rim contraído e fibrosado.

A avaliação do parênquima renal foi feita através da pesagem do órgão e em seguida encaminhado para exame histopatológico.

2.11. Preparo do material para o exame anátomo-patológico no grupo I.

2.11.1. Perfusão renal.

A perfusão renal foi realizada através da mesma punção na artéria renal utilizada para a medida da pressão intra-arterial, pós-anastomótica. Após a colocação de pinças vasculares microcirúrgicas na artéria renal, junto a aorta, esta foi perfundida com solução glicosada (concentração de 50 g/dl), até se verificar ao microscópio cirúrgico (aumento de $12,5 \times 10$) , que o rim ficou com aspecto branco sério. Esta manobra foi utilizada para produzir nos cortes histológicos melhor qualidade / de coloração.

2.11.2. Retirada da peça cirúrgica

As anastomoses renais e os rins foram retirados , imersos em corante de Bouin para fixação, processadas e incluídas

em parafina. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina e P.A.S.

2.12. Exame histopatológico

Os exames histopatológicos do grupo I foram realizados no Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas; os exames histopatológicos do grupo II foram realizados no Laboratório de Anatomia Patológica do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

As peças (rins) foram perfundidas com solução glicosada numa concentração de 50 g/dl, após cateterização da artéria renal, antes de serem retiradas dos animais. Após este procedimento foram colocadas em solução de corante de Bouin, para sua fixação, processadas, e incluídas em parafina. Os cortes dos rins dos animais do grupo I e do grupo II foram corados com hematoxilina-eosina P.A.S.

O exame histopatológico foi realizado em todas as anastomoses para se estudar a linha de sutura e o estado pérvio vascular. Nos rins, o estudo microscópico visou o exame dos glomérulos, túbulos renais, interstícios e vasos.

2.12.1. Critérios utilizados no exame histopatológico

A finalidade deste exame foi analisar as características

de coaptação das bocas anastomóticas nos vasos renais, a homogeneidade da parede interna (endotélio), a presença de tecido cicatricial na linha de sutura e as alterações histopatológicas desta região, bem como estudar a conservação da estrutura morfológica do parênquima renal.

As lesões observadas nos rins foram avaliadas quanto a intensidade em uma +, ++, +++, correspondendo respectivamente a lesões leves, moderadas e intensas. Quando a frequência foram consideradas R, RR, F, FF, respectivamente correspondendo a lesões raras, muito raras, frequentes e muito frequentes.

2.13. Estudo funcional dos rins (GRUPO II)

Os estudos funcionais foram realizados após os animais serem subdivididos em três grupos:

IIa - Rins perfundidos com solução fisiológica heparinizada, a baixa temperatura (10°C);

IIb - Rins perfundidos com solução de diálise peritoneal a 1,5%, heparinizada, a baixa temperatura (10°C);

IIc - Rins perfundidos com solução de Collins, heparinizada, a baixa temperatura (10°C).

2.14. Procedimentos anestésicos e cirúrgicos para a avaliação funcional do rim

Os animais cujos rins foram transplantados após

conservação com diversas soluções, foram anestesiados com pentobarbital sódico na dosagem de 30 mg/kg de peso corporal.

A seguir os animais foram submetidos a cirurgia de auto transplante renal, com as mesmas técnicas até então empregadas e anteriormente descritas.

No décimo dia de pós-operatório, os animais foram submetidos a nova cirurgia, para a avaliação funcional e morfológica do órgão. Os animais que apresentaram anastomoses vasculares com defeito perceptível ao microscópio cirúrgico, foram desprezados, nesta fase do estudo.

A anestesia empregada foi o pentobarbital sódico intraperitoneal, na dose de 30 mg./kg. de peso corporal do animal. Quando necessária foi feita a suplementação anestésica na quantidade de um terço da dose inicial.

A cirurgia foi realizada observando-se os seguintes tempos cirúrgicos:

a) Colocação do animal em ambiente condicionado a 23°C, em decúbito dorsal horizontal, em mesa térmica (37°C) para a manutenção de sua temperatura corporal e fixação de seus membros com fita crepe;

b) A temperatura corporal foi monitorizada durante o ato operatório por um teletermômetro com o sensor colocado na via retal (Yellow Spring Instruments - U.S.A.);

c) Dissecção da veia jugular e infusão de inulina (Sigma Co. U.S.A.) numa concentração de 7,5 mg./dl., diluída em solução fisiológica, na velocidade de 1,2 ml. da solução por hora, através de um cateter (P.E.-50). Essa infusão foi realizada durante 20 minutos ou seja, tendo como volume total de 0,4 ml., com auxílio de uma bomba de infusão (B.Braun, W.Germany); na velocidade de 0,02 ml./min. utilizando seringa (Hamilton ,

U.S.A.) com capacidade de 5.0 ml., sendo que a velocidade de infusão foi mantida durante todo o experimento, que durou em torno de 60 minutos.

d) Foi realizado o cateterismo de artéria carótida comum (cateter P.E. -10) para ser monitorada a pressão arterial média, com um manômetro de coluna de mercúrio;

e) Incisão transversal em abdômem baixo, interessando pele, tecido celular subcutâneo e musculatura. Abertura do peritônio e colocação de afastadores, feitos artesanalmente no Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental.

Procedemos a seguir a dissecação dos ureteres e os cateterizamos isoladamente com cateter (P.E. -50) heparinizado.

Após esta manobra, iniciamos a coleta de urina para análise da perfusão e depuração renal, sendo desprezada a primeira amostra. A coleta de urina é feita por um tempo de 40 minutos.

No material coletado, sangue e urina, foi feita a dosagem de inulina, pelo método de antrona, para a avaliação da função renal. A função renal foi analisada pelo ritmo de filtração glomerular (R.F.G.) segundo a fórmula:

$$R.F.G. = \frac{U_{in} \times V'}{P_{in}}$$

onde U_{in} = concentração urinária de inulina em mg./dl.

V' = volume minuto

P_{in} = concentração plasmática de inulina em mg./dl.

O R.F.G. inter-grupos foi analisado estatisticamente pelo teste não pareado de Student, sendo o nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$). Na análise estatística morfológica foi utilizado o teste exato de Fisher.

III - RESULTADOS

3.1. Resultados ao microscópio cirúrgico no Grupo I (Ia e Ib).

O exame da parede abdominal mostrou boa cicatrização em todos os animais. Não houve infecção em nenhuma das cicatrizes cirúrgicas. Como intercorrência, no pós-operatório, tivemos três óbitos, onde encontramos um animal com obstrução total da artéria renal operada; um animal com estenose da artéria renal operada, porém pèrvia; e um animal com ruptura da anastomose e sangramento.

3.1.1. Exame das anastomoses arteriais e dos rins no grupo I (Ia e Ib).

3.1.1.1. Intra-operatório.

O exame das anastomoses arteriais no intra-operatório logo após a realização das anastomoses, ao microscópio cirúrgico, demonstrou a presença de estenose discreta em seis

casos e bom aspecto nos outros 84 casos (TABELA 6).

T A B E L A 6

ASPECTOS INTRA-OPERATÓRIOS DAS ANASTOMOSES DO GRUPO I (Ia e Ib)

<u>ASPECTOS DAS ANASTOMOSES</u>	<u>NÚMERO DE CASOS</u>
ESTENOSE	6 (6,67%)
ANASTOMOSE NORMAL	84 (93,33%)
T O T A L	90 (100%)

O exame dos rins no intra-operatório, ao microscópio cirúrgico, mostrou órgão sem alterações extensas.

3.1.1.2. - Pós-operatório ao microscópio cirúrgico

A avaliação pós-operatória foi realizada por volta do vigésimo primeiro dia e no 120º dias de pós-operatório (GRUPO I).

A avaliação realizada no vigésimo primeiro dia de pós-operatório, foi feita em 30 animais de cada subgrupo (Ia e Ib), verificamos oclusão total das anastomoses em 1/90 (caso 8), ruptura de anastomose em 1/90 (caso 36), em todos os outros casos as anastomoses estavam pervias e sem alterações (TABELA 7).

T A B E L A 7

EXAME DAS ANASTOMOSES ARTERIAIS AO MICROSCÓPIO CIRÚRGICO NO 21 e 120 DIAS DE PÓS-OPERATÓRIO

EXAME DAS ANASTOMOSES	NÚMERO DE ANASTOMOSES
OCLUSÃO	1 (1,11%)
RUPTURA	1 (1,11%)
ANEURISMA	1 (1,11%)
NORMAIS	87 (96,67%)
T O T A L	90 (100%)

A avaliação realizada no 120º dias de pós-operatório, foi feita em 15 animais de cada subgrupo (Ia e Ib), onde verificamos a presença de aneurisma anastomótico em 1/90 (caso 19) . Nas demais anastomoses arteriais, verificou-se anastomoses de aspecto externo normal, ao microscópio cirúrgico (aumento de 12,5 x 25).

3.2. Resultados ao microscópio óptico

O estudo histopatológico foi dividido em duas etapas: uma em que se estudou as características das anastomoses arteriais e outra em que se estudou as alterações morfológicas renais.

3.2.1. Resultados histopatológicos das anastomoses arteriais

Os resultados histopatológicos das anastomoses das artérias renais colhidos no 21º e no 120º dias de pós-operatório foram analisados conjuntamente, pois não houve diferenças significativas nos dois resultados.

A análise histopatológica das anastomoses arteriais renais, ao microscópio óptico, sob o aspecto de coaptação de mostrou que: em 90 anastomoses, foi verificado que 78 anastomoses estavam pêrvias e bem coaptadas; seis anastomoses estavam pêrvias porém com defeito de coaptação das bocas anastomóticas; três anastomoses estavam ocluídas e com defeito de coaptação e três anastomoses estavam ocluídas porém bem coaptadas. Assim, verificou-se que em nove anastomoses, embora houvesse defeito de coaptação, seis mantinham-se pêrvias (TABELA 8).

T A B E L A 8

CARACTERÍSTICA DAS SUTURAS ARTERIAIS QUANTO A COAPTAÇÃO -
GRUPO I

	NÚMERO DE ANASTO MOSES PERVIAS	NÚMERO DE ANASTO MOSES PERVIAS	TOTAL
BEM COAPTADA	78 (86,67%)	3 (3,33%)	91 (90%)
DEFEITO NA COAPTAÇÃO	06 (6,67%)	3 (3,33%)	09 (10%)
T O T A L	84 (93,33%)	6 (6,67%)	90 (100%)

Se analisarmos o aspecto de bordas necróticas e reação inflamatória nas anastomoses arteriais, verificamos que em três anastomoses, embora pèrvias, havia presença de necrose e intenso processo inflamatório.

Em 81 anastomoses pèrvias não havia processo inflamatório significativo, havendo dificuldade para se identificar a linha de sutura; e em três anastomoses pèrvias verificamos a presença de um processo inflamatório intenso, havendo / também dificuldade para se diferenciar a linha de sutura. Em três anastomoses ocluídas e com processo inflamatório presente, o endotélio se apresentava desestruturado e com trombo organizado na região. Em três anastomoses ocluídas não detectamos / alterações na organização celular da parede do vaso, ou reação inflamatória importante que justificasse a oclusão, pois não havia necrose de borda e/ou reação inflamatória nas anastomoses arteriais. Em outras três anastomoses ocluídas, verificamos intenso processo inflamatório e necrose das bordas (TABELA 9).

T A B E L A 9

NECROSE DE BORDA E REAÇÃO INFLAMATÓRIA NAS ANASTOMOSES
ARTERIAIS - GRUPO I

	NÚMERO DE ANASTOMOSES PÈRVIAS	NÚMERO DE ANASTOMOSES OCLUIDAS	TOTAL
PRESENTE	3 (3,33%)	3 (3,33%)	6 (6,67%)
AUSENTE	81 (90%)	3 (3,33%)	84 (93,33%)
TOTAL	84 (93,33%)	6 (6,67%)	90 (100%)

Em relação as características das suturas arteriais sob o aspecto da regularidade do endotélio, verificamos que de 84 (93,33%) anastomoses p rvias, 78 (84,67%) apresentavam regularidade endotelial. Nas seis (6,67%) anastomoses ocluídas ; verificamos que havia regularidade endotelial em 3,33% e em outras três (3,33%) não havia regularidade endotelial. Verificamos portanto que de 90 casos (GRUPO I) operados, a regularidade endotelial estava presente em 81 (90%) dos casos e ausente em nove (10%) dos casos (TABELA 10).

T A B E L A 10

CARACTERÍSTICAS DAS SUTURAS ARTERIAIS QUANTO A REGULARIDADE DO ENDOTÉLIO - GRUPO I

	NÚMERO DE ANASTOMOSSES P�RVIAS	NÚMERO DE ANASTOMOSSES OCL�IDAS	TOTAL
PRESENTE	78 (86,67%)	3 (3,33%)	81 (90%)
AUSENTE	6 (6,67%)	3 (3,33%)	9 (10%)
TOTAL	84 (93,33%)	6 (6,67%)	90 (100%)

3.2.2. Resultados histopatológicos dos rins

Os estudos histopatológicos dos rins foram realizados nas duas fases do experimento. Na primeira fase (GRUPO I) realizamos tomada única por não haver diferenças significativas nas coletas em tempos diferentes (219 e 1209 dias).

Os resultados histopatológicos dos rins, comparativo, entre os dois grupos (Ia e Ib) de perfusão, estão expressos na TABELA 11. Nessa, encontramos nos rins perfundidos com solução fisiológica (GRUPO Ia) e com anastomoses p^{er}vias e sem alterações morfológicas locais, verificamos 27 (60%) rins, cujo histopatologia demonstrou parênquima renal normal; três (6,67%) rins apresentaram pequena área de retração e fibrose, e, 15 (33,33%) rins apresentaram fibrose quase total do órgão, ou seja, igual ou superior a 50% da área (FIGURA 2).

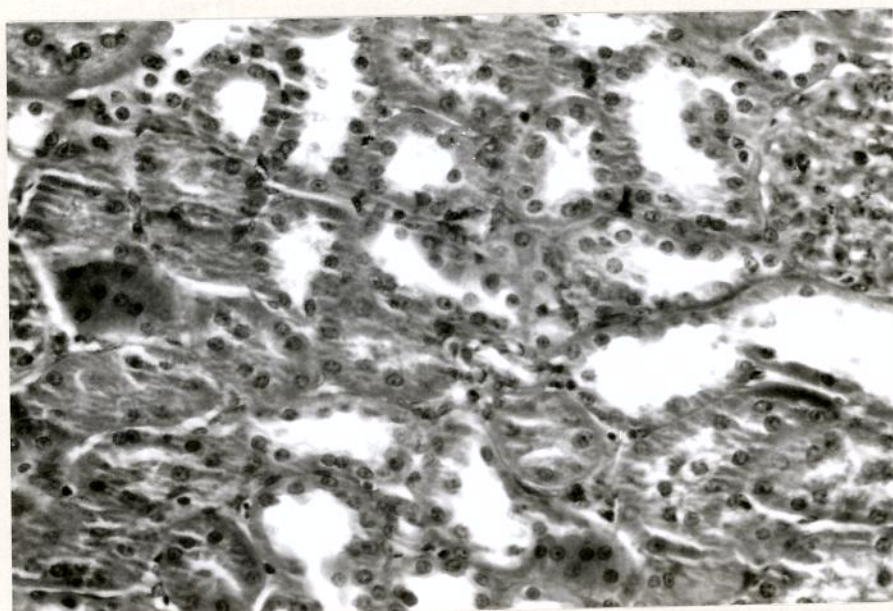


FIGURA 2 - Fotomicrografia óptica do rim - GRUPO IIa - Corante hematoxiliⁿa-eosina. (Aumento de 330 x).

Os rins perfundidos com solução de diálise peritoneal, apresentaram ao exame histopatológico 39 (86,67%) rins com parênquima de aspecto normal e seis (13,33%) rins com pequena área de retração e fibrose (FIGURA 3).

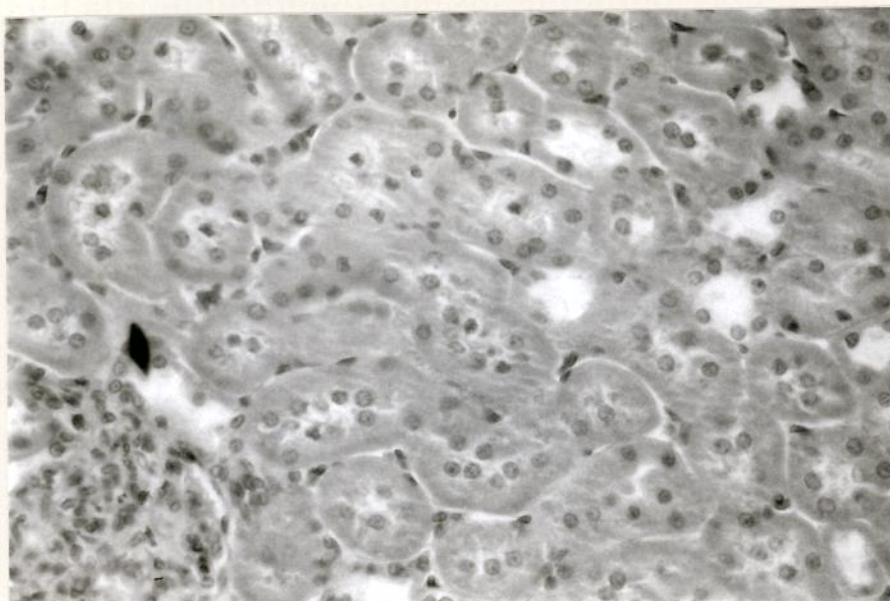


FIGURA 3 - Fotomicrografia óptica do rim GRUPO IIb - Coloração hematoxilina-eosina. (Aumento de 330x).

T A B E L A 11

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DOS RINS - PRIMEIRA FASE DO EXPERIMENTO

	RIM PERFUNDIDO COM S.F. GRUPO Ia	RIM PERFUNDIDO COM S.D. GRUPO Ib	TOTAL
NORMAL	27 (60%)	39 (86,67%)	66 (73,33%)
ÁREAS DE RETRAÇÃO E FIBROSE	03 (6,67%)	06 (12,33%)	09 (10%)
FIBROSE MAIOR OU IGUAL A 50%	15 (3,33%)	-	15 (16,67%)
TOTAL	45	45	90

S.F. = Solução fisiológica a 0,9%

S.D. = Solução de diálise peritoneal a 1,5%

O estudo histopatológico dos rins em uma segunda fase do experimento (GRUPO II) na qual avaliamos conjuntamente a função renal, está representado na TABELA 12.

T A B E L A 12

GRAU DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DOS RINS - FASE II
ESTUDO FUNCIONAL (GRUPOS IIa, IIb, IIc)

GRUPO	GLOMERULO	REGENERAÇÃO TUBULAR	INTERSTÍCIO	VASOS
S. COLLINS	-	3-+RR 2-+R	- -	- -
S.D.	-	5-+F		
S.F.	-	2++FF 3+++FF		
-	Ausência de lesões	PR	Lesões muito raras	
+	Lesões Leves	R	Lesões raras	
++	Lesões moderadas	F	Lesões frequentes	
+++	Lesões intensas	FF	Lesões muito frequentes	

Verificamos que o grupo dos rins cuja perfusão foi feita com solução fisiológica (GRUPO IIa), encontramos glomérulos com volume e celularidade normais. Mesângio e parede capilar sem particularidades. Nos túbulos notamos alterações regenerativas que variam de moderadas a intensas, nas células tubulares de frequentes a muito frequentes. O interstício não apresentou edema ou outras alterações. Os vasos não apresentam particularidades.

Os rins cuja perfusão foi feita com solução de diálise (GRUPO IIb), apresentam glomérulos com volume e celularidade

normais. Mesângio e parede capilar não apresentam particularidades. Os túbulos renais apresentam frequentes áreas de regeneração de leve intensidade nas células tubulares. Os interstício não apresenta edema ou outras alterações. Os vasos não apresentam particularidades.

Os rins perfundidos com solução de Collins (GRUPO IIC) apresentam glomérulos com volume e celularidade normais. O mesângio e a parede capilar não apresentam particularidades. Os túbulos renais apresentam suas células tubulares com regeneração variando de raras áreas de regeneração para frequente e de leve intensidade.

3.2.3. Resultados funcionais

Os resultados funcionais obtidos estão apresentados na TABELA 13. Verificamos que nos três grupos de perfusão, os resultados funcionais foram diferentes, obtendo-se uma melhor preservação do órgão no grupo de rins perfundidos com a solução de Collins, seguido do grupo perfundido com solução de diálise peritoneal a 1,5% e por último pelo grupo perfundido / com solução fisiológica.

T A B E L A 13

APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS FUNCIONAIS DOS GRUPOS DE PERFUSÃO (RITMO DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR - ML./MIN.)

EXP.£	SF		EXP.£	SD		EXP.£	SC	
	N	O		N	O		N	O
SFI	0,62	0,31	SD1	1,13	0,69	SC1	1,30	0,54
SFA	1,16	0,48	SD4	0,72	0,43	SC11	1,24	1,02
SFB	0,68	0,03	SDB	1,59	0,78	SC12	0,39	0,43
SFE	1,59	1,20	SDC	1,62	1,37	SC14	1,28	1,46
SFG	1,01	0,86	SDE	1,02	0,92	SC17	2,34	2,05
SFD	1,74	0,77	SDF	1,07	0,84	SC20	1,41	1,39
M	1,13	0,61(a)		1,20	0,84(b)		1,33	1,15(c)
EPM	0,19	0,17		0,15	0,13		0,25	0,25

N = Rins direitos, rins normais (controles)

O = Rins esquerdos, rins operados e conservados

SF = Solução fisiológica a 0,9%

SD = Solução de diálise peritoneal a 1,5%

SC = Solução de Collins

M = Média aritmética

EPM = Erro padrão da média

EXP.£ = Código do animal experimental

a = média do grupo IIa (sol.fisiológica)

b = média do grupo IIb (sol.de diálise)

c = média do grupo IIc (sol.de Collins)

TESTE T não pareado, $p < 0,05$ c x b

c x a

O grupo de animais cujos rins foram perfundidos com solução fisiológica (GRUPO IIa) a baixa temperatura, heparinizada, apresentou entre os rins supostamente normais (e não perfundidos), "clearance" médio de $1,13 \pm 0,19$ ml./min. Quando analisamos os rins operados, em que fizemos a perfusão do órgão com solução fisiológica (GRUPO IIa), verificamos que o "Clearance" médio foi de $0,61 \pm 0,17$ ml./min.

O grupo de animais cujos rins foram perfundidos com solução de diálise peritoneal a 1,5% (GRUPO IIb), verificamos/que os rins contralaterais e supostamente normais, o "clearance" médio foi de $1,19 \pm 0,15$ ml./min. Os rins perfundidos com solução de diálise peritoneal (1,5%) apresentaram "clearance" médio de $0,84 \pm 0,13$ ml./min.

Por outro lado, os animais cujos rins foram perfundidos com solução de Collins (GRUPO IIc), os rins contralaterais (controle) e supostamente normais apresentaram "clearance" médio de $0,33 \pm 0,25$ ml./min; e os conservados a 10°C por um período de tempo de 30 minutos por perfusão, com a solução de Collins, apresentaram um "clearance" médio de $1,15 \pm 0,25$ ml./min.

IV - ANÁLISE GLOBAL DOS RESULTADOS

4.1. Resultados

a. Análise das características de cicatrização das anastomoses

O exame das anastomoses renais, ao microscópio ci rúrgico, intra-operatôriamente, evidenciou vasos de aspectos normais em 84/90 (93,33%) e estenose em 6/90 (6,67%) (TABELA 6).

O exame dessas mesmas anastomoses no pós-operatório ao microscópio cirúrgico, evidenciou em 1/90 (1,11%) oclusão , em 1/90 (1,11%) ruptura, em 1/90 (1,11%) aneurisma e em 87/ 90 (96,67%) anastomoses normais (TABELA 7).

Dessa forma, a medida que passa a fase aguda inflamatória cicatricial, o aspecto das alterações até então sofridas se manterão ou poderão sofrer alterações discretas. Assim podemos depreender que se não houve alterações no estado pêr vio das anastomoses nas primeiras 72 horas de pós-operatório , com pequena probabilidade encontramos alterações posteriores / no vaso, concernentes provavelmente a um defeito técnico na feitura da anastomose.

A interpretação das tabelas 8, 9, 10, que sumarizam as características arteriais ao microscópio óptico, mostra que não houve alterações importantes, comparativamente, no vigésimo primeiro dia de Pós-operatório e o 120º dia de pós-operatório de evolução, quanto ao aspecto da coaptação da linha de sutura, reação inflamatória nas bordas e regularidade do endotélio. Assim sendo, a coaptação das bordas se fez de forma anatômica, com bordas coincidentes e coaptantes em 81 casos (90%) e coaptação com defeito em nove casos (10%). Embora, verificamos que as anastomoses estavam pèrvias em 93,33% dos casos e ocluídas em 6,67% dos casos.

Quanto a reação inflamatória e necrose de borda, temos três casos (3,33%) e ausência desses parâmetros em 81 casos (90%), com coaptação e regeneração do tecido conjuntivo. Alguns fios de sutura foram encontrados, porém, não havia processo inflamatório exuberante que alterasse a linha anastomótica e sua regularidade, comprometendo o estado pèrvio e o fluxo arterial.

Quanto a regularidade do endotélio, verificamos que nas anastomoses pèrvias esse se apresentava presente em 78/90 (86,67%) e com alterações em 6/90 (6,67%). Nas anastomoses obstruídas verificamos que em 3/90 (3,33%) havia regularidade do endotélio e 3/90 (3,33%) não havia regularidade endotelial.

A boa evolução da cicatrização com as anastomoses arteriais renais microcirúrgicas pèrvias (93,33%) se deve provavelmente à coaptação coincidente das bordas com consequente manutenção da regularidade do endotélio.

Os resultados inadequados verificados foram atribuídos a dificuldades técnicas de forma a proporcionar uma boa coaptação do vaso e consequentemente manutenção da regularidade

endotelial. Dessa forma, a obstrução arterial foi verificada em seis casos, embora o vaso tivesse se mantido p $\acute{e}$ r $\acute{v}$ io no p $\acute{o}$ s-operat $\acute{o}$ rio imediato, intra-operat $\acute{o}$ rio.

b. An $\acute{a}$ lise comparativa das altera $\mathfrak{c}$ ões do par $\acute{e}$ nquima renal sofridas pelos dois rins nos grupos de perfus $\acute{a}$ o (solu $\mathfrak{c}$ ão fisiol $\acute{o}$ gica e de di $\acute{a}$ lise peritoneal a 1,5%).

b.1. Primeira fase do experimento

O exame histopatol $\acute{o}$ gico dos rins, tanto no vig $\acute{e}$ simo primeiro dia de p $\acute{o}$ s-operat $\acute{o}$ rio como no 120 $^{\circ}$ dias de p $\acute{o}$ s-operat $\acute{o}$ rio, n $\acute{a}$ o demonstrou diferen $\mathfrak{c}$ a significativa de resultados, assim analisaremos o conjunto como um todo. Dessa forma, os animais que foram submetidos ao transplante renal, tendo como solu $\mathfrak{c}$ ão de perfus $\acute{a}$ o a solu $\mathfrak{c}$ ão fisiol $\acute{o}$ gica, apresentaram 27/45 casos (60%), ao microsc $\acute{o}$ pio $\acute{o}$ ptico, par $\acute{e}$ nquimas com aspectos normais; em 3/45 rins verificamos $\acute{a}$ reas de retra $\mathfrak{c}$ ão e fibrose inferior a 50% e em 15/45 dos casos (33,33%), verificamos $\acute{a}$ reas de fibrose igual ou maior que 50%.

Nos rins perfundidos com solu $\mathfrak{c}$ ão de di $\acute{a}$ lise peritoneal (1,5%) verificamos, quanto ao aspecto histopatol $\acute{o}$ gico, ao microsc $\acute{o}$ pio $\acute{o}$ ptico, par $\acute{e}$ nquima com aspecto normal em 39/45 casos (86,67%) e em 6/45 casos (13,33%), $\acute{a}$ reas de retra $\mathfrak{c}$ ão e fibrose, inferiores a 50%.

Assim sendo, comparando-se os resultados dos exames an $\acute{a}$ tomo-patol $\acute{o}$ gicos dos dois grupos perfundidos com solu $\mathfrak{c}$ ão fisiol $\acute{o}$ gica e solu $\mathfrak{c}$ ão de di $\acute{a}$ lise peritoneal (1,5%) verificamos / que existem diferen $\mathfrak{c}$ as significativas entre eles, ou seja, o grupo perfundido com solu $\mathfrak{c}$ ão de di $\acute{a}$ lise peritoneal apresenta

melhor resultado que o grupo perfundido com solução fisiológica.

A análise estatística dos resultados, feita pelo Teste Exato de Fisher, obtidos da análise histológica das anastomoses vasculares (TABELA 8), demonstrou que existe uma associação clara entre a melhor coaptação e as anastomoses pervias, $p = 0,01213$, $x = 11,43$, $p = 0,00072$; isto é, quanto melhor a coaptação na anastomose vascular, maior será a probabilidade de se manter o vaso pervio.

Se analisamos estatisticamente os resultados expressos na TABELA 9, através do Teste Exato de Fisher, verificamos que há associação entre o aspecto de bordas necróticas e reação inflamatória e a patência das anastomoses, conforme $p = 0,00315$, $x = 19,40$, $p = 0,0000106$; isto é, quanto maior a reação inflamatória ou a presença de bordas necróticas, pior é a probabilidade de se manter o vaso pervio.

Ao analisarmos as características das suturas arteriais quanto a regularidade do endotélio, estatisticamente, verificamos que há uma associação concordante entre estes dois parâmetros conforme demonstrou o Teste Exato de Fisher em que $p = 0,00329$, $x = 11,43$; isto é quanto mais regular foi o endotélio na região de anastomose, maior é a possibilidade da manutenção da patência vascular.

b.2. Segunda fase do experimento

Partindo comparativamente para uma análise histológica, na segunda fase do experimento (GRUPO II), verificamos que existe concordância entre os resultados obtidos e analisados

na primeira fase do experimento. Assim, verificamos que o grupo cujos rins foram perfundidos por solução de Collins apresentam melhores resultados funcionais; anátomo-patologicamente, o tecido tem preservação próxima a igualdade dos rins perfundidos com solução de diálise peritoneal (1,5%).

Os rins perfundidos com solução fisiológica apresentaram conservação precária em relação à preservação renal tanto funcional como no exame anátomo-patológico.

b.3. Análise dos resultados funcionais

Neste grupo, de acordo com o protocolo, os resultados funcionais foram obtidos na segunda fase do experimento (GRUPO II).

A análise estatística, usando o teste T pareado de Student, verificamos que nos mesmos animais cujos rins foram perfundidos com solução fisiológica versus os rins controles (contralaterais), $T = p < 0,001$, demonstrando que existe significância na diferença de função observada nos mesmos.

Da mesma forma, verificamos que nos rins perfundidos com solução de diálise peritoneal versus os rins controles (contralaterais), existe uma queda significativa ($p < 0,05$) de função nos rins conservados com esta solução.

A análise estatística, usando o teste T de Student, pareado, verificamos que nos rins perfundidos com solução de Collins versus os rins controles (contralaterais), dessa forma, ficou demonstrado que não existe diferença significativa $p > 0,05$.

Comparando os três grupos de perfusão, verificamos que no grupo perfundido com solução fisiológica, os rins operados, apresentaram um "clearance" baixo se comparado com o grupo de diálise peritoneal e, a diferença é mais acentuada ainda, se comparado ao grupo de solução de Collins ($p < 0,05$).

A análise estatística inter-grupos, com teste T não pareado, demonstrou que, se compararmos o grupo perfundido com solução fisiológica ao grupo perfundido com solução de Collins, verificamos haver uma significância estatística em relação aos resultados obtidos. Assim, descarta-se de certa forma a possibilidade do uso de solução fisiológica heparinizada, a baixa temperatura, na conservação do órgão.

Em relação ao grupo perfundido com solução de diálise peritoneal (1,5%), se comparado a função com o grupo perfundido com solução de Collins, verificamos que a solução de diálise peritoneal é inferior a de Collins na conservação; embora os resultados apresentados não tem diferença significativa entre os dois grupos ($p > 0,05$).

Desta forma podemos depreender que apenas os exames anátomo-patológicos não são suficientes quando analisamos a preservação renal, necessitando de provas funcionais para caracterizar melhor a conservação do órgão.

Concluindo, o presente trabalho permite analisar na primeira fase (GRUPO I) as características gerais e histológicas da cicatrização de uma anastomose microcirúrgica em vaso de pequeno calibre (média de 0,65mm. de diâmetro externo), bem como as alterações sofridas pelo órgão, na dependência dos líquidos de perfusão usados para a prevenção tecidual e compará-los inter-grupos. Ao lado disto, permitiu, no (GRUPO II), o estudo comparativo da função dos rins submetidos a perfusão por

diversas soluções conservadoras sobre o ritmo de filtração glomerular, concluindo que a solução de Collins foi a que melhor preservou funcionalmente o órgão, e, provavelmente a estrutura do parênquima renal. Embora estatisticamente não haja diferença entre esta solução e a de diálise.

V. DISCUSSÃO

A análise do trabalho desenvolvido deve ser enfocada sob dois aspectos principais: a técnica da microcirurgia vascular na aplicação em cirurgia experimental e a preservação morfo-funcional do órgão.

A técnica básica das anastomoses arteriais se delineou em 1902 quando ALEX CARRELL e GUTHRIE, C.C. (1902), a aplicaram, de forma circular na parede de grandes vasos, entretanto a aplicação em larga escala ocupou espaço quando em 1945 CRAWFORD reportou tratamento em vasos arteriais com sucesso.

Com o passar do tempo e com o advento de tecnologia mais delicada, os vasos arteriais microscópicos passaram a ser estudados em sua forma, fisiologia, restauração e como realizar e preservar sua integridade funcional (COBBET, J.R., 1967 ; FUJINO, T., 1972; ACLAND, R., 1972; O'BRIEN, Mc C. 1973).

A feitura de anastomoses microcirúrgicas para a realização dos transplantes renais, experimentais, em ratos Wistar, nos levou a um treinamento adequado para tal fim. Assim, o treinamento, o instrumental e o microscópio adequado, nem sempre garantem a patência vascular pós-microcirúrgica. Dessa forma, (SCHUMAKER, H.B. & LOWENBERG, R.J., 1948 e SAIDENBERG, B. e col., 1958) discutem em seus trabalhos os fatores técnicos que poderiam influir na manutenção do estado pervio das

anastomoses em vasos menores que 3,2mm de diâmetro externo. As oclusões vasculares têm um índice de 50%, coincidindo com os achados de ABSOLON, K.J.B. & AUST, R.L. 1972 ; BUNCKE, H.J. & MURRAY, D.E. 1971; THAL, W., 1956; INOBUCHI, K. e col., 1961.

Os trabalhos relativos a prevenção de trombose arterial também se multiplicam tendo seu início com MURRAY, G. (1940) e na microcirurgia com os trabalhos de INOBUCHI, K. e col., 1961 e de ABAXTER, T.J. e col., 1972 quando faz estudos histológicos pós-reparo microvascular.

Quando em 1960, JACOBSON, J.H. & SUAREZ, E.L. definem os princípios básicos da microcirurgia, os trabalhos experimentais se multiplicam demonstrando uma capacidade inequívoca / de eficácia cirúrgica, não tendo como limitação por tanto o tamanho dos vasos.

O presente trabalho exigiu um treinamento técnico / bastante disciplinado, tendo em vista que os vasos operados a apresentavam, aproximadamente, um calibre externo de 0,5 a 0,8 mm para a artéria e 0,8 a 2,0 mm para a veia (JACOBSON J.H. & SUAREZ, E.L. 1960; BALLINGER, W.F. e col., 1961; HALLER, E.R., J.D. e col., 1965; O'BRIEN, B.Mc C. e col., 1970 e 1973, BUNCKE, H.J. & MURRAY, D.E., 1971; ACLAND, R., 1972a, 1972b, 1973, 1975; ELCOK, H.W. & FREDERICKSON, J.M., 1972; HAYHURST, J.W. & O'BRIEN, B.Mc C., 1975; FUJIMAKI, A. e col., 1977).

O uso da microcirurgia experimental em transplante de órgãos foi proposta por FISHER, B.S., (1965), LEE, S. (1967); FABRI, J. e col., (1971), com larga escala porém de difícil aplicação nos centros de pesquisa experimental, embora permita a feitura de transplantes em pequenos animais o que de certa forma torna o procedimento menos dispendioso e de fácil controle em laboratório. Atualmente ainda se discute a melhor técnica cirúrgica para implante do órgão, como discute DANILLER, A. e col.,

(1968); OESTERWITIZ, H. e col., (1983); JIMENEZ, G. e col. , (1988); KORBER, K.E. & KRAEMER, B.A. (1988).

O presente trabalho apresentou dados concordantes com a escassa literatura ora existente em relação a aplicação da microcirurgia experimental para os transplantes de órgãos; tanto em relação aos achados cirúrgicos relativos a técnica microcirúrgica, como as dificuldades vencidas pelo primor do treinamento microcirúrgico. Se analisarmos a técnica microcirúrgica aplicada, verificamos que tanto a técnica proposta por COBBET, J.R. (1967) como a proposta por FUJINO, T. & AOYAGI, F. (1972) são imprescindíveis para o conhecimento do microcirurgião, pois cada uma delas tem sua aplicação dependendo da possibilidade oferecida pelo campo cirúrgico. Utilizamos neste experimento um misto das duas, pois fizemos uma sutura sequencial, da parede posterior para a parede anterior, com pontos separados. Assim o resultado obtido foi bastante animador indicando o seu uso em todo o decorrer do experimento, e, mesmo repeti-la em outros procedimentos que exijam a aplicação da microcirurgia, onde a limitação na manipulação do vaso em sua rotação para a sutura da parede posterior.

A preservação tecidual e funcional adequada dos órgãos, no caso os rins, deve ser abordada sob o aspecto técnico tempo e qualidade. O tempo de preservação prolongado é um quesito importante num transplante de órgãos, pois das condições de selecionar doentes para a recepção, bem como acionar a equipe clínico-cirúrgica para a implantação do órgão em condições de viabilidade e sem grandes transtornos e sacrifício do doente, independente daqueles inerentes aos procedimentos clínico-cirúrgicos em si. Além disso, permite que haja um intercâmbio entre os centros de transplantes, de modo a aproveitar melhor os

órgãos disponíveis. Analisando o aspecto qualidade, sabemos que existem diversas técnicas para o transplante de rim, no entanto, atualmente, os centros transplantadores de forma progressiva tendem a utilizar somente rins de cadáver. Para isso as técnicas de conservação são diversas (BELZER, F.O. & SOUTHARD, J.H. 1980; MARSHALL, V.C. 1980), sendo usadas soluções conservadoras hipotermicas, para a lavagem do órgão, soluções iônicas ou então a perfusão contínua com bombas e perfusão com crioprecipitados de plasma a frio. Estas técnicas tem permitido uma melhor preservação tecidual e consequentemente funcional. Porém, essas técnicas tem falhado principalmente quando o período de conservação ultrapassa 24 horas, por poder causar deterioração do órgão, levando a lesões vasculares (NORLEN, B.J. e col., 1978a) e hipóxia (ENGBERGER, A. e col., 1983), e glomérulo tubulares com consequente N.T.A. (DONOHUE, J.F. e col., 1978; HENDERSON, L.W. e col., 1968; MORGAN, D.B., 1982; NORLEN, B.J. e col., 1978b; HARVING, G. e col., 1980). Considerando ainda este aspecto temos verificado que às vezes a deterioração funcional fica difícil de ser detectada pela possível presença de um processo agudo de rejeição, que agrava o quadro de insuficiência renal aguda por N.T.A. (BESARAB, B. e col., 1982).

Existe um grande número de soluções preservadoras, porém alguns investigadores demonstraram que a inibição do edema celular mais do que a manutenção do conteúdo celular de potássio pode ser o fator mais importante do efeito preservador das assim chamadas soluções que mimetizam o meio "intracelular", durante o armazenamento a frio (SIMÕES, J.D. e col., 1984; DOWNES, G. e col., 1973; COLLINS, G.M. e col., 1969; COLLINS, G.M. e col., 1980). Considerando estes aspectos, uma série de técnicas de avaliação experimental foram utilizadas na avaliação da eficiência das soluções conservadoras.

Assim a preparação do rim isolado foi testada também com diversas soluções de conservação a frio (AQUACTELLA, H. e col., 1972; DOWNES, G. e col., 1973; JABLONSKI, P. e col., 1980) e se concluiu parcialmente que soluções como a de citrato hipertônico, pouco utilizada, mantêm níveis altos de adenina nucleotídeo produzindo uma função renal melhor em condições normotécnicas, do que a solução de Collins, Sacks ou Perfudex (BISHOP, M.C. e col., 1978), no entanto nas avaliações clínicas com esta solução não se obteve resultados condizentes com os dados experimentais.

Existem afirmativas que a presença de colóides são importantes na perfusão hipotérmica contínua com bomba, e que as soluções hipotérmicas eletrolíticas a frio, só não são mais efetivas pela falta destas substâncias coloidais (TOLEDO-PEREYRA, L.H. & CONDIE, R.M. 1978; SWANSON, J.W. e col., 1981). Ao lado disto também tem sido bastante incentivado o uso do tampão sulfato hipertônico, pois diversos estudos com estas soluções demonstraram que a atividade tamponante delas protege o rim durante o processo isquêmico (BORE, P.J. e col., 1981, COLLINS, G. M. e col., 1984).

Assim a proliferação de estudos com o intuito de melhor preservar o tecido e a função do órgão, tem levado os investigadores a pesquisar novas soluções como a solução U.W.S. ou solução de Belzer (BELZER, F.O.; SOUTHAR, J.H., 1988), cuja feitura envolve novos conceitos de bioquímica celular, introduzindo nestas colóides não protéicos, potássio hipertônico e substratos energéticos. Além disso foram introduzidas as substâncias chamadas "scavengers" ou incorporadoras de peróxidos / que tem demonstrado auxiliarem na estabilidade da membrana celular e no funcionamento de cadeias enzimáticas evitando a N.T.A.

Apesar destes estudos, mundialmente os Centros Transplantadores tem utilizado as soluções de Collins e Euro-Collins para promover a perfusão do órgão. Assim sendo, procuramos tomar como padrão básico de normalidade, para comparação, a solução de Collins, em nossos experimentos, pois esta é a solução mais antiga, a mais utilizada até pouco tempo e com grande quantidade de trabalhos comparativos em diversos trabalhos experimentais. Desta forma o uso da solução de diálise para a perfusão renal mostrou existir diferença com a solução de Collins, porém sem significância estatística. Por outro lado, analisando a composição desta solução verificamos que a quantidade de glicose presente é bem inferior a encontrada na solução de Collins, porém a de sódio e cálcio é bem superior e o potássio não está presente nesta solução. Portanto fica difícil atribuímos o sucesso da preservação apenas à quantidade de potássio existente ou que apenas o íon magnésio foi suficientemente eficaz na preservação funcional do rim, quando usamos uma solução de Collins; tendo em vista que na solução Euro-Collins o magnésio foi retirado por levar a uma possível lesão glomerular devido a formação de cristais por precipitação ao magnésio, pela presença do íon sulfato também na solução de Collins; formando portanto cristais de sulfato de magnésio que poderiam lesar glomérulos e túbulos renais (COLLINS, G.M. e col., 1969; COLLINS, G.M. e col., 1980).

Contudo não devemos desprezar outras alterações do metabolismo celular, pois todos os fatores agindo em conjunto nestas soluções, acrescida da baixa temperatura, poderiam dessa forma corroborar para o sucesso da conservação tecidual renal em sua arquitetura e função.

Por outro lado, nos nossos experimentos também

utilizamos a assim chamada solução fisiológica que perde seu "status" de solução conservadora quando comparada à solução de diálise e de Collins, pois estas demonstram serem mais fisiológicas em eficiência do ponto de vista conservação tecidual. Isto provavelmente se deve ao fato de que nessa solução (solução fisiológica) faltam, portanto, possíveis componentes eletrolíticos e energéticos e de estabilização da membrana. Além disso, esta solução contém alto conteúdo de sódio (145mEq/l.) e que está próximo da isotonicidade, o que deve facilitar a formação de edema intersticial e celular, facilitando a ruptura celular em condições de hipóxia e isquemia e o aparecimento de N.T.A. por deficiência iônica estabilizadora para conservar o órgão.

Estes achados importantes nos levam a comentar os achados morfo funcionais obtidos para uma análise global dos transtornos da conservação do órgão para o transplante renal.

Assim, a solução fisiológica quando usada para a perfusão do órgão, forneceu uma característica histológica de intensa regeneração celular. Baseado apenas neste aspecto, a solução teria características conservadoras, pois propicia a proliferação celular. No entanto estes rins com proliferação celular são os que apresentaram os piores índices funcionais, demonstrando de certa forma que embora as células estejam se regenerando, simulando uma regeneração pós N.T.A.; a função não corresponde aos achados histológicos. Estes achados poderiam também nos levar a raciocinar que estes rins estariam mais propícios ao envelhecimento precoce por glomeruloesclerose dos néfrons funcionantes, provocada pelo aumento do fluxo plasmático renal e do ritmo de filtração glomerular pela queda da reserva renal funcional.

Da mesma forma, Observamos uma regeneração celular intermediária quando usamos como solução conservadora a solução de diálise, correlacionando-se também com a função intermediária encontrada neste grupo de animais. Embora haja diferença numérica, estatisticamente não há significado quando comparamos com a solução de Collins, tida como padrão de normalidade, para este tipo de procedimento experimental e para a conservação utilizada neste protocolo de aproximadamente uma hora.

A solução de Collins, no entanto, foi a que apresentou um parênquima renal mais estável com relação as suas células epiteliais. Este fato provavelmente se deve a propriedade conservadora da solução sobre as estruturas do parênquima, pois além de pouca regeneração encontramos os melhores índices funcionais.

Baseado nestes achados podemos inferir que uma solução terá características conservadoras quanto menores forem os índices de atividade celular no parênquima renal e melhor se correlacionar com os índices funcionais.

VI - CONCLUSÕES

O estudo experimental, em ratos, para analisar as anastomoses microcirúrgicas em vasos de pequeno calibre, bem como, as alterações apresentadas pelo rim, sob o ponto de vista anatômico e funcional, quando submetido a perfusão com diversas soluções eletrolíticas por pressão hidrostática, a baixa temperatura (10°C), seguida do auto transplante renal por técnica microcirúrgica, permite as seguintes conclusões:

1. O estudo das anastomoses microcirúrgicas em vasos de pequeno calibre de diâmetro externo (0,5 mm. aproximadamente), mostrou uma boa patência do vaso, mesmo quando comparado a anastomoses microcirúrgicas de vasos de diâmetro consideravelmente maior.

2. O líquido de perfusão, solução de diálise peritoneal heparinizada, a baixa temperatura, se mostrou de melhor qualidade na conservação dos tecidos que a solução fisiológica heparinizada, sob o ponto de vista funcional à microscopia óptica.

3. A solução de diálise peritoneal, embora anatomico - patologicamente mostre conservação do parênquima renal, ao analisarmos sua função, verificamos que tendem a ser menores que a solução de Collins, embora estatisticamente não apresente diferença significativa.

4. A solução de Collins foi a que mostrou níveis de filtração glomerular mais próximos do grupo controle (considerado normal) e um quadro histológico também próximo a normalidade do rim controle (contralateral).

VII - RESUMO

O estudo experimental foi elaborado com a finalidade de analisar as características gerais e histológicas da cicatrização de uma anastomose microscópica em vasos de calibre externo médio de 0,65mm, bem como as alterações apresentadas pelo rim, sob o ponto de vista anatômico e funcional, quando submetidos à perfusão com diversas soluções eletrolíticas, por pressão hidrostática, a baixa temperatura, seguida de auto-transplante renal. Os vasos apresentaram boa taxa de patência mesmo quando comparados a vasos de maior calibre.

Os líquidos de perfusão são importantes na conservação tecidual do órgão, em sua arquitetura e função. Assim, o grupo perfundido com solução de Collins mostrou melhor qualidade de conservação que o perfundido com solução de diálise peritoneal (1,5%) e solução fisiológica.

VIII - BIBLIOGRAFIA

ABSOLON, K.J.B.; AUST, R.L. - Surgical Treatment of Occlusive Coronary Artery Disease by Endarterectomy of Anastomotic Replacement. Surg.Gynec. & Obst., 103: 180, 1956.

ACLAND, R. - A new neddle for microvascular surgery. Surgery, 71: 130-131, 1972a.

ACLAND, R. - Prevention of thrombosis in microvascular surgery by the use of magnesium sulphate. Briths Journal of Plastic Surgery, 25: 292-299, 1972b.

ACLAND, R. - Trombus formation in microvascular surgery: an experimental study of the effects of surgical trauma. Surgery, 73: 766-771, 1973.

ACLAND, R. - The histopathology of small arteries following experimental microvascular anastomosis. Plastic Reconstructive Surg., 59: 12868-75, 1975.

- ACQUATELLA, H.; PEREZ-GONZALES, M.; MORALES, J.M.; WHITTERMBURY, G. - Ionic and histological changes in the kidney after perfusion and storage for transplantation - Transplantation, 14 : 480-489, 1972.
- BALLINGER, W.F.; FINEBERG, C. and FIGLIO, D. - Repair of small blood vessel with minimal interruption of flow. J.Surg. Res . 3: 475, 1963.
- BAXTER, T.J.; O'BRIEN, B.M.; HENDERSON, P.N.; BENNETT, R.C. - The histopatology of small vessels following microvascular repair. British. Journal of Surg. 59: 617-622, 1972.
- BELZER, F.O. & SOUTHARD, J.H. - The future of kidney preservation. Transplantation, 30: 161-165, 1980.
- BELZER, F.O. & SOUTHARD, J.H. - Organ preservation and transplantation. Approaches to graft rejection. Allan, R. Liss. Inc : 291-303, 1986.
- BELZER, F.O. & SOUTHARD, J.H. - Principles of solid-organ preservation by cold storage. Transplantation, 45: 673-676, 1988.
- BESARAB, A.; JARREL, B.; IHLE, B.; COLEBERG., J.E.; BURKE, J.F. ; WESSON, L. - Adverse effects of prophylatic irradiation and acute tubular necrosis on renal graft function and survival. Nephron, 31: 347, 1982.

- BISHOP, M.C. & ROSS, B.D. - Evaluation of hypertronic citrate flushing solution for kidney preservation using the isolated perfused rat kidney. Transplantation 25: 235-238, 1978.
- BORE, P.J.; SEHR, P.A.; THURBORN, K.R.; ROSS, B.D.; RADD, G.K.
- The importance of pH in renal preservation. Transplantation, 13: 707, 1981.
- BRENER, B.J.; RAINES, J.K.; DARLING, R.C. - The end to end anastomosis of blood vessels of different diameters. Surg.Gynecol. & Obstet. 138: 249-250, 1974.
- BUNCKE, H-J. & MURRAY, D.E. - Autogenous arterial interposition of grafts of less than 1mm. in external diameter in rats. Transactions of the Sixth International Congress of Plastic and Reconstructive Surgery. pp. 572. London: Butterworths, 1971.
- CARREL, A. - La technique operative des anastomoses vasculaires et la transplantation des visceres. Lyon Medical, 98: 859 - 864, 1902.
- COBBET, J.R. - Small vessel anastomosis. British Journal of Plastic Surgery, 20: 16-20, 1967.
- COLLINS, G.M.; BARRY, J.M.; MAXWELL, J.G.; SAMPSON, D.; WANDERWERF, B.A. - The value of magnesium in flush solutions for human cadaveric kidney preservation. The J.Urol., 131:220 - 222, 1984.

COLLINS, G.M.; BRAVO-SHUGARMAN, M.B.; TERASHI, P.L. - Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hour ice storage. Lancet, 2: 1219-1222, 1969.

COLLINS, G.M.; GREEN, R.D.; BOYER, D.; HALASZ, N.A. - Production of kidneys from warm ischemic injury. Transplantation, 29 : (1) 83-84, 1980.

DANILLER, A.; BUCHOLZ, R.; CHASE, R.A. - Renal transplantation in rats with the use of microsurgical techniques: a new method. Surgery, 63: 956-961, 1968.

DONOHUE, J.F.; VENKATACHALAM, M.A.; BERNARD, D.B.; LEVINSKY, N . G. - Tubular leakage and obstruction after renal ischemia : structural-function correlations. kidney Inter. 13: 208-222 , 1978.

DOWNES, G.; HOFFMAN, R.; HUONG, J.; BELZER, F.O. - Mechanism of Action washout solutions for kidney preservation. Transplantation, 16: 46, 1973.

ELCOCK, H.W. & FREDERICKSON, J.M. - The effect of repair on thrombosis at microvenous anastomotic sites. Archives of otolarungology, 95: 68-71, 1972.

ENGBERG, A.; NORLEN, B.J.; KALLSKOG, O.; WOLGAST, M. - Pathophysiology of renal ischemia. In: Renal preservation , vol. 8; MARBERGER, M.M.; DRECKORN, K. (edits); Williams & Wilkins. Baltimore: 1, 1983.

- FABRE, J.M LIM, S.M.; MORRIS, P.J. - Renal transplantation in the rat: details of a technique . The Australian and New Zealand Journal of Surgery, 69-75, 1971.
- FINN, W.F. - Recovery from acute renal failure. In: Acute renal failures: BRENNER, B.M.; LAZARUS, J.M. (edits): W.S. Saunders Co.: 753, 1983.
- FISHER, B.S. - Microvascular surgical techniques in research with special reference to renal transplantation in the rat . Surgery, 58: 904-914, 1965.
- FRENCH, M.E. & BACHELOR, J.R. - Lancet, 2: 1103, 1969.
- FUJIMAKI, A.; O'BRIEN, B. Mc C.; KURATA, T. & THREEFALL, G. N . Experimental Micro-anastomosis of 0,4 - 0,5 mm. vessels. British Journal of Plastic Surgery, 30: 269-272, 1977.
- FUJINO, T. & AOYAGI, F. - A method of successive interrupted suturing in microvascular anastomoses - Microvascular Suturing, vol. 55, 2: 240-241, 1972.
- GUTHRIE, C.C. - Blood vessel surgery and its Applications. Reprinted by University of Pittsburg Press, 1959.
- HALLER, J.D.; KRIPKE, D.C.; STEPHEN, S.R.; DEE, R.; ROBERTS, T.; ROHMAN, M.; GOETZ, R.H. - Long term results of small vessels anastomoses with a ring technic. Ann. Surg., 67-72, 1965.

HARVING, G.; ENGBERG, A.; ERICKSSON, J.L.E. - Effects of coloischemia on the preserved and transplanted rat kidney. Structural changes of the proximal tubule, Virchows Arch., 34: 153, 1980.

HARVING, B.; NORLEN, B.J. - A technique for in vivo and in vitro studies on the preserved and transplanted rat kidney. - Urol. Res., 8: 107, 1980.

HAYHURST, J.W. & O'BRIEN, B. Mc C. - An experimental study of microvascular technique patency rats and related factors . British Journal of Plastic Surgery, 28: 128-132, 1975.

HENDERSON, L.W.; NOLPH, K.D.; PUSCHETT, J.B.; GOLDBERG, M. - Proximal tubular malformation as a mechanism for douresis after penal homotransplantation. N.Engl. J.Med., 278(9) : 467-473, 1968.

INOBUCHI, K.; KONISHI, T.; YAGI, H.; NAKAMURA, T.; SAKAGUCHI, M.; NAKAMURA, N. - Trombogenic properties at the site of anastomoses studied by a new technique for measuring platelet adherence. Surgery, 50: 493-496, 1961.

JACOBSON, J.H. & SUAREZ, E.L. - Microsurgery in anastomosis of small vessels. Surgical Forum, 11: 243-245, 1960.

JIMENEZ, G.; RODRIGUEZ, J.; LORENTE, L.; DE PEDRO, J.A.; ALLER, M.A.; ARIAS, J.; BRANDAU, D.; DURAN, H. - Técnicas microquirúrgicas de transplante ortóptico renal en la rata. Rev. Quir.Esp., 15 (3): 148-152, 1988.

- KOLAN, L.; WIEBERDINK, J. & RENEMAN, R.S. - Anticoagulation in microvascular surgery. *European Surgical Research*, 5: 52 - 57, 1973.
- KORBER, K.E. & KRAEMER, B.A. - Heterotopic renal transplantation in the rat: an advanced microsurgical training exercise. *Microsurgery*, 9(4): 286-291, 1988.
- LEE, S. - An improved technique of renal transplantation in the rat. *Surgery*, 61 (5): 771-773, 1967.
- MARSHALL, V.C. - Renal preservation prior to transplantation. *Transplantation*, 30: 165-166, 1980.
- MORGAN, D.B. - Assessment of renal tubular function and damage their clinical significance - *Annals Clin. Biochem.* 19: 307-319, 1982.
- MURRAY, G. - Heparin in surgical treatment of blood vessels. *Arch.Surg.*, 40: 307, 1940.
- NORLEN, B.J.; ENGBERG, A.; KALLSKOG, O.; WOLGAST, M. - Intrarenal hemodynamics in the transplanted rat kidneys. *Kidney Int.* 14; 10, 1978a.
- NORLEN, B.J.; ENGBERG, A.; KALLSKOG, O.; WOLGAST, M. - Nephron function of the transplanted rat kidney. *Kidney Int.*, 14:10, 1978b.

NYLEN, C.O. - The otomicroscope and microsurgery 1921 - 1971 .
Acta Otolaryngology 73: 453-454, 1972.

O'BRIEN, B. Mc C; HENDERSON, P.N.; BENNETT, R.C.; CROCK, G.W. -
Microvascular surgical technique. Medical Journal of Australia
- 1: 722-725, 1970.

O'BRIEN, B. Mc C.; MAC LEOD, A.M.; MILLER, G.D.H.; NEWING, R.H.;
HAYHURST, J.W.; MORRISON, W.A. - Clinical replantation of
digits. Plastic and Reconstructive Surgery, 82: 490-502, 1973.

O'BRIEN, B. Mc C. - Cirurgia Reconstructiva Microvascular. Cap.4,
45-55; Cap. 5, 56-87. Editorial El Manual Moderno S.A. -
México, 1980.

OESTERWITZ, H.; ALTHAUS, P.; SCHRODER, K.; STROBELT, V.; KADEN ,
J. - Microvascular surgery in experimental and clinical Kidney
transplantation. Int. Urol. Nephrol. 14 (4): 347-357, 1983.

PEGG, D.E. - Progress in transplantation - Cap. 4 - Principles of
tissue preservation. In: Progress in transplantation. Morris,
Churchill livingstone. Edimburg. - London - N. York, pp 69 -
105, 1986.

PERRIT, R.A. - Recent advances in corneal surgery. In American
Academy of Ophtalmology and otolaringology. Course NQ. 280 ,
1950.

- SACKS, S.A.; PETRITSCH, P.H.; KAUFMAN, J.J. - Canine kidney preservation using a new perfusate. Lancet I: 1024-1028, 1973.
- SASAKI, A. & HARIH, K. - Everting method: A new modification to obtain reliable microvascular anastomosis. Surgery, 89 (5) : 558-564, 1981.
- SCHUMAKER, H.B. & LOWENBERG, R.J. - Experimental studies in vascular repairs. Surgerym 24: 79-89, 1948.
- SEIDENBERG, B.; HURWITT, E.S.; CARTON, C.A. - The technique of anastomosing small arteries surgery. Gynecology and Obstetrics, 106: 743-746, 1958.
- SIMÕES, J.D.; SIGULEM, D.; AJZEN, H.; FIGUEIREDO, J.F. - Functional behavior of the isolated rat kidney submitted to different renal preservation solutions. kidney Int., 26: 634, 1984.
- SWANSON, J.W.; BESARAB, B.; POMERANTZ, P.; De GUZMAN, A. - Effect of erythrocytes and globulin on renal functions of isolated rat kidney. Am. J. Physiol., 241: 139, 1981.
- THAL, W. - Direct Suture Anastomoses of the Coronary Arteries. Surgery, 40: 1023, 1956.
- TOLEDO-PEREYRA, L.A. & CONDIE, R.W. - A comparisom of sacks and a new colloid hyperosmolar solution for hypotermic renal storage. Transplantation. 26: 166-168, 1978.
- VAN DER WIJK; RIJKMANS, B.G.; KOOTSTRA, G. - Six day kidney preservation in a canine model. Influence of a 1-4 hour "ex-vivo" perfusion interval. Transplantation 35: 408-411, 1983.