

JOSÉ FRANCISCO FIGUEIREDO

ASPECTOS FUNCIONAIS DE DIVERSOS SEGMENTOS DO NEFRON SUBMETIDOS  
A MANOBRAS DE CONSERVAÇÃO COM AS SOLUÇÕES DE COLLINS OU  
EURO-COLLINS, UTILIZADAS NO TRANSPLANTE CLÍNICO E EXPERIMENTAL.

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade Estadual de Campinas para o  
Concurso de Livre Docência no Departamento  
de Clínica Médica - Disciplina de Nefrologia

Campinas

1990



1150012254



FCM  
T/UNICAMP F469a

UNICAMP

Nossos agradecimentos a todas  
às pessoas que direta ou  
indiretamente colaboraram  
nestes trabalhos.

Agradeço às Agências de Auxílio à  
Pesquisa e às Instituições  
Universitárias o reconhecimento  
do nosso trabalho.

## INDICE

|                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1- Introdução.....                                                                             | 4  |
| 1.1- Introdução Geral.....                                                                     | 4  |
| 1.2- Princípios básicos para conservação renal.....                                            | 8  |
| 1.2.1- Hipotermia.....                                                                         | 10 |
| 1.2.2- Comportamento dos eletrólitos celulares<br>durante o processo de conservação renal..... | 12 |
| 1.2.3- Efeitos da conservação sobre as membranas<br>celulares.....                             | 19 |
| 1.2.4- Efeito da conservação sobre a mitocôndria.....                                          | 25 |
| 1.2.5- Comportamento do ATP na conservação renal.....                                          | 31 |
| 1.2.6- Metabolismo aeróbico e conservação de<br>órgãos.....                                    | 36 |
| 1.2.7- Estudo da conservação renal com drogas.....                                             | 40 |
| 1.2.8- Estabilização de membranas celulares na<br>conservação renal.....                       | 42 |
| 1.2.9- Efeitos vasculares da hipotermia.....                                                   | 43 |
| 1.3- Conservação normotérmica de rim.....                                                      | 47 |
| 1.4- Resumo geral da introdução.....                                                           | 48 |

|                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2- Objetivos .....                                                                                                                                       | 51 |
| 3- Estudos da ação da solução conservadora de Collins em<br>túbulos contornados proximais (P1 - P2) de coelhos<br>isolados e perfundidos "in vitro"..... | 53 |
| 3.1- Introdução .....                                                                                                                                    | 54 |
| 3.2- Material e Métodos.....                                                                                                                             | 58 |
| 3.3- Resultados.....                                                                                                                                     | 67 |
| 3.4- Discussão.....                                                                                                                                      | 70 |
| 3.5- Resumo e Conclusões.....                                                                                                                            | 73 |
| 3.6- Tabelas e Gráficos.....                                                                                                                             | 75 |
| 4- Aspectos funcionais da pars recta (P3) submetido a<br>soluções conservadoras com magnésio (Collins) e sem<br>magnésio (Euro-Collins).....             | 79 |
| 4.1- Introdução.....                                                                                                                                     | 80 |
| 4.2- Material e Métodos.....                                                                                                                             | 82 |
| 4.3- Resultados .....                                                                                                                                    | 85 |
| 4.4- Discussão.....                                                                                                                                      | 87 |
| 4.5- Resumo e Conclusões.....                                                                                                                            | 94 |
| 4.6- Tabelas.....                                                                                                                                        | 95 |

|                                                                                                                                              |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5- Efeito das soluções conservadoras de Collins com e sem magnésio no túbulo coletor cortical de coelho isolado e perfundido "in vitro"..... | 97  |
| 5.1- Introdução.....                                                                                                                         | 98  |
| 5.2- Material e Métodos.....                                                                                                                 | 103 |
| 5.3- Resultados.....                                                                                                                         | 110 |
| 5.4- Discussão.....                                                                                                                          | 116 |
| 5.5- Resumo e Conclusões.....                                                                                                                | 129 |
| 5.6- Tabelas e Gráficos.....                                                                                                                 | 131 |
| 6- Efeito de soluções conservadoras de Collins com e sem magnésio no ducto coletor papilar de rato perfundido "in vitro".....                | 138 |
| 6.1- Introdução .....                                                                                                                        | 139 |
| 6.2- Material e Métodos.....                                                                                                                 | 146 |
| 6.3- Resultados.....                                                                                                                         | 154 |
| 6.4- Discussão.....                                                                                                                          | 156 |
| 6.5- Resumo e conclusões.....                                                                                                                | 165 |
| 6.6- Tabelas e Gráficos.....                                                                                                                 | 166 |
| 7- Referências Bibliográficas.....                                                                                                           | 174 |

## 1- INTRODUÇÃO

### 1.1- INTRODUÇÃO GERAL

Nesta introdução geral, apresentamos um painel amplo sobre o assunto e desta forma pretendemos mostrar a situação complexa, divergente e atual da pesquisa na área de conservação de órgãos . Ao lado disto, procuramos enfocar as razões principais pelos quais isto está acontecendo, ou seja, a necessidade de adquirirmos conhecimentos sistematizados e básicos sobre a conservação renal. Naturalmente, estes conhecimentos acumulados serão no futuro de importância fundamental na racionalização do transplante renal e de outros órgãos.

Assim, dados clínicos epidemiológicos grosseiros acham que em nosso país, aproximadamente 10.000 pacientes renais crônicos são candidatos ao transplante renal. A matrícula anual de novos candidatos supera os efetivamente transplantados e amplia a lista de espera . Estima-se que o tempo médio entre o início do tratamento dialítico até o momento do transplante seja superior a quatro anos, e que este período supera a própria sobrevivência média do paciente em tratamento dialítico (213).

A escassez de órgãos, é o principal fator limitador da execução de transplante de cadáver no país, é provocada por problemas afetos a legislação, as prioridades econômicas do setor saúde, e a integração limitada da população. Assim mesmo, existem órgãos coletados que acabam por não serem aproveitados e certamente a extensão do tempo de conservação poderia minimizar estas perdas, ampliando as chances de utilização destes órgãos.

A preservação renal é um campo de estudo relativamente novo, considerando que o transplante precário de órgãos existe desde épocas remotas da antiguidade (35). Desta forma a partir do século XX com o desenvolvimento tecnológico iniciou-se uma melhora nas condições de transplantes, surgindo então os primeiros transplantes renais bem sucedidos (21). No entanto apesar do transplante renal ter-se tornado rotina em clínica, as investigações sobre técnicas ideais de conservação ainda não são suficientes.

O estudo da conservação do parênquima renal tem por objetivo principal desenvolver um método de armazenamento "ex vivo", de rim de doadores cadáveres o qual pode conservar o órgão viável, tão longo quanto possível para a sua transplantação no receptor, de acordo com as necessidades clínico-cirúrgicas.

A grande maioria das pesquisas em preservação renal tem sido no entanto feita por equipes médicas

enoceloides nos grandes programas de transplante clínico. Desta forma, aconteceu que o progresso desta área foi alcançado por um método não científico que é o da tentativa, isto é, do "erro" e do "acerto". Isto significa que estes tipos de experimentos buscam um bom resultado, o mais rápido possível sem estar baseado num programa de trabalho de estudos detalhados e sistematizado nas áreas envolvidas.

No entanto estas técnicas por "tentativas" conseguiram alguns sucessos na conservação de rim de cadáveres e se tornaram rotina nos hospitais por todo o mundo.

Por outro lado, apesar deste sucesso parcial da conservação sobre o ponto de vista clínico, os princípios que estão realmente controlando o processo não estão definidos. Assim, apesar de ter ampliado o tempo e a qualidade da conservação esta continua a mesma desde as descrições técnicas de possíveis viabilidades teciduais renal descritas por Belzer em 1967 (19) e por Collins em 1969 (60).

Baseado nestes aspectos nós sentimos que a melhora da conservação do rim e de outros órgãos não deverá ser alcançada por "tentativas" com técnicas de validade discutível, pois para nossa época este tipo de metodologia chegou ao seu limite máximo de aproveitamento.

Assim, achamos que o verdadeiro progresso na conservação poderá nascer de um estudo minucioso das necessidades fisiológicas e bioquímicas



do parênquima renal guardado em situação "ex vivo", e desta forma poderemos compreender o mecanismo da morte celular e assim conseguirmos "in situ" retardar este acontecimento final da viabilidade de um tecido.

Apesar de existir este enfoque, poucos investigadores tem conduzido seus trabalhos para entender esta complexidade básica envolvida na conservação renal. Assim, reforçando este aspecto, a literatura mostra que a maioria dos estudos recentes ainda tem sido direcionados na feitura empírica de perfusatos ou de soluções eletrolíticas na esperança que estas atinjam uma ótima performance em termos de conservação do parênquima renal como um todo. Desta forma restou-nos nestes anos de positivo apenas comparações entre diversas técnicas de conservação e a sua eficiência (23, 155).

Este aspecto de desenvolvimento tecnológico primário tem sido comentado em inúmeros artigos, livros resumos, os quais não temos a intenção de discutir nesta revisão atualizada do assunto (227).

## 1.2- PRINCIPIOS BASICOS PARA CONSERVAÇÃO RENAL:

Existem dois métodos disponíveis para a conservação renal:

O primeiro método, consiste de uma perfusão hipotérmica com um perfusato constituído de "plasma like" ou de substâncias sintéticas, semelhantes ao plasma em termos de composição eletrolítica e de pressão coloidosmótica, geralmente são perfundidos através do órgão com auxílio de bombas pulsáteis, ou de fluxo contínuo (19).

O segundo método, envolve uma lavagem do parênquima renal com um líquido a frio que tem uma osmolaridade relativamente "maior" que a do meio intracelular, além de conter solutos "impermeáveis" como citrato, fosfato, sulfato, manitol. Além disto, pode também conter o magnésio, assim como concentrações variáveis de potássio e sódio. O rim para ser submetido a estas soluções, deve ser infundido com as mesmas, por pressão hidroestática e depois armazenado envolvido nestes meios sem perfusão entre 5°C a 10°C. Estes métodos podem preservar o rim por tempo prolongado, até 72 horas, embora estes resultados sejam extremamente divergente na literatura (155). No entanto, podemos afirmar que nos rins de animais ou seres humanos recuperados, após conservação prolongada apresentam na maioria das vezes índices elevados de creatinina plasmática o que os levam para o tratamento

dialítico de suporte. Esta conduta clínica, acarreta altos custos e possibilidades de infecções, pois devemos nos lembrar que a estes pacientes se encontram associados processos de imunossupressão.

A importância da composição iônica das soluções é bastante discutida, mas ao que parece a hipotermia atualmente é o ponto principal na conservação do parênquima renal. Nesta situação de baixa temperatura podemos manter de forma adequada a integridade das estruturas químicas enzimáticas intracelulares, da membrana celular e diminuir também as trocas metabólicas de eletrólitos e água entre células, interstícios e vasos (28).

Do ponto de vista clínico existem vantagens e desvantagens em cada método, mas as bases bioquímicas de conservação, a curto e a longo prazo destes métodos não são conhecidas. O que sabemos apenas são as considerações feitas sobre o pH adequado dos perfusatos, a composição das soluções, o tempo de exposição à isquemia quente. Ao lado disto parece que a pressão de perfusão é importante na manutenção da reprodutibilidade na conservação do rim (28, 227).

Um outro aspecto que deve ser levantado é o do estado do parênquima renal que precede a conservação, pois este deve ser um fator importante independentemente do método utilizado.

Assim, deve ser levado em conta o tempo de isquemia quente, a lavagem dos componentes sanguíneos, pois

o frio pode endurecer as hemáceas, obstruir capilares, provocar vasoconstrição e dificultar a distribuição adequada do perfusato por todo o parênquima renal (Tabela 1)

Baseado nestes aspectos práticos, descreveremos agora os diversos processos básicos conhecidos que estão envolvidos na conservação de órgãos.

#### 1.2.1- HIPOTERMIA :

A retirada de um órgão de um animal normotérmico e mudança para a situação de hipotermia produz alterações importantes no metabolismo celular, e consequentemente alterações importantes entre a estrutura e a função de cada grupo celular que compõe este órgão. Isto se deve em parte, ao fato que os animais filogeneticamente, com seus sistemas fisiológicos, estão estruturados para trabalhar com rendimentos adequados, numa pequena faixa de variação da temperatura corporal ou do próprio órgão. Assim, exposições a diferentes temperaturas tem um efeito desproporcional nas reações enzimáticas e na capacidade de transportar cátions e ânions, na energia liberada e dispendida na reação enzimática, assim como alterações importantes na estrutura das membranas celulares. Estes efeitos se prolongados, causam alterações irreversíveis na estrutura celular, quando o órgão da situação de baixa temperatura é conduzido a normotermia o que pode levá-lo a inviabilidade do parênquima por morte celular .

Apesar destes aspectos no entanto, a hipotermia na conservação de órgãos é de valor ainda inestimável pois seguramente causa:

- a) Redução do crescimento de microorganismos.
- b) Redução no metabolismo oxidativo, produzindo desta forma uma menor necessidade de carregadores de  $O_2$  no perfusato que são instáveis e tóxicos para o órgão.
- c) diminui as necessidades de nutrientes.
- d) diminuição da atividade enzimática, prevenindo o não aparecimento de catabólitos enzimáticos, especialmente da fração lisossomal que pode destruir a viabilidade celular.
- e) diminuição da isquemia quente que pode ocorrer no período de pós-conservação.

A limitação na obtenção de períodos longos de conservação em animais normotérmicos, pode no entanto ser dependente do período da hipotermia. Esta ação da hipotermia e os mecanismos pelo qual a hipotermia age em termos fisiológicos, ainda não tem regras científicas definidas. Existem trabalhos, evidenciando que estes estudos deveriam ser conduzidos, se possível tecnicamente no sentido de se observar a ação direta da hipotermia a nível de membrana celular, e da bioquímica celular, pois isto seria de valor inestimável para o entendimento das reações celulares envolvidas no resfriamento. Um outro ponto que ajudaria a compreensão deste fenômeno seria a regulação endócrina do metabolismo em animais poiquilotérmicos

comparados àqueles que podem viver em estado de hibernação. Assim, nos animais que hibernam, recentemente foi demonstrado que este contém isoenzimas com características cinéticas diferentes dos normotérmicos, sendo que estas enzimas suportam bem a baixa temperatura, podendo isto ser a chave do funcionamento em termos de geração de energia durante o processo de hibernação (4).

No entanto, pouco se sabe sobre a ação da hipotermia sobre as células, mas poderíamos supor, que provavelmente atue ou via o metabolismo energético ou alterando a regulação iônica intra e extracelular, por alterar a estrutura das membranas celulares.

#### 1.2.2- COMPORTAMENTO DOS ELETROLITOS CELULARES DURANTE O PROCESSO DE CONSERVAÇÃO RENAL:

Em condições normais existe um estado dinâmico, simultâneo mas constante, nos vários processos de transportes de eletrólitos celulares

Assim, como o meio intracelular possui altas concentrações de potássio e o extracelular altas concentrações de sódio, existe um constante influxo de sódio e efluxo de potássio. Desta forma, o ânion cloreto tem sua entrada na célula facilitada combinado ao sódio e com isto pode carregar moléculas de água, e em determinadas condições facilitar o edema celular.

Ao lado disto a concentração de cálcio ionizável é 1000 a 10.000 vezes maior no extracelular quando comparado ao meio intracelular, daí sua tendência de entrar na célula.

Assim com estas movimentações iônicas, o efeito de Donnan que aparece com a pressão oncótica, produz condições para atrair moléculas de água para dentro da célula. Desta forma, sob este aspecto, a pergunta seria como estas movimentações podem se equilibrar para produzir a homeostasia?

Sob este aspecto, para que ocorra a homeostasia iônica sabemos que a mitocôndria produz energia o bastante através de adenina nucleotídeos, a qual controla as bombas na membrana celular. A bomba ativa de Na-K ATPase coloca três moléculas de sódio para fora da célula e faz penetrar duas moléculas de potássio. Esta situação estabelece uma diferença de potencial de membrana que é positivo fora da célula e negativo dentro. Seria importante relembrar que o potencial de membrana é a única barreira para a entrada de cloreto para dentro da célula. Conjuntamente, a estas passagens o íon cálcio é bombeado pela sódio-cálcio ATPase, íon por íon em troca dependente de íons sódio.

Após estas explicações fisiológicas feitas de forma resumida, seria interessante mostrar o que ocorre com estes sistemas em condições de hipoxia por duas razões:

A primeira, o rim pode ser retirado em condições de isquemia quente, o que significa que o órgão foi coletado em condições de hipoxia.

A segunda razão seria que na conservação em condições de hipotermia por várias razões o órgão está na hipoxia.

Desta forma, em condições de hipoxia sem oxigênio ou com pouco oxigênio não existe a produção de ligações de fosfatos de alta energia, isto significa que as "bombas" estão "paradas", teoricamente, produzindo conseqüentemente alterações importantes na estrutura da membrana celular e no seu comportamento fisiológico em termos de potencial de membrana.

Nestas condições, o cloreto passa livremente pela membrana dirigindo-se para dentro da célula carregando possivelmente o íon sódio. Naturalmente, esta entrada de sódio facilita a saída de potássio, isto, ao que parece não impede o influxo de cálcio. Além disto, o cálcio estocado é liberado das organelas, aumentando sua concentração no citosol. Alguns investigadores, acreditam que este influxo de cálcio consiste no efeito mais importante da hipoxia e este aumento do cálcio intracelular pode levar a morte celular. Este processo, foi revisito em 1986 (110) assim, para resumir, a hipoxia produz queda na produção de ATP, isto leva a uma queda na produção e na atividade da  $\text{Na} - \text{K ATPase}$  e conseqüentemente no efluxo de potássio e influxo de sódio o que ocasiona uma



despolarização da membrana celular. Nestas condições, assim que a membrana é despolarizada, os poros de cálcio voltagem dependentes, são abertos aumentando o influxo de cálcio para a célula. Como não existe ATP, o efluxo de cálcio em troca do sódio está também diminuído. Todos estes fatores levam a um aumento de cálcio citosólico e estes íons de cálcio ativam as fosfolipases A1, A2 e C. Esta ativação, leva a uma hidrólise do componente fosfolipídico da membrana com consequente acúmulo de ácidos graxos livres, estes aumentam ainda mais a permeabilidade das membranas das células e da mitocôndria, causando dano celular irreversível terminando em morte celular. Como existe uma redução de sistema cálcio ATPase, o cálcio é liberado do retículo endoplasmático, e como existe uma perda de ATP há um colapso no potencial das membranas mitocôndriais, causando novamente efluxo de cálcio em troca pelo sódio.

Curiosamente, em condições de hipotermia, especificamente nas células renais, foi demonstrado que áfortunadamente no rim do cão e do homem o sistema de Na - K ATPase é ativo embora reduzido (156). Desta forma, a célula renal mesmo em hipotermia está apta a bombear sódio em troca de potássio mas obviamente de forma reduzida quando comparada a 37°C. Existem, diversas razões para esta queda. Primeiramente, a atividade da enzima Na - K ATPase está diminuída durante a hipotermia, isto se deve ao fato que durante o tempo da perfusão para a conservação renal, existe uma diminuição nos níveis intracelulares de ATP, ADP e AMP

provocado pela diminuição da conversão de ADP em ATP pela enzima ATP sintetase dentro da mitocôndria. No entanto, esta reação é pouco influenciada pela hipotermia nestes sistemas e assim a conversão não está muito alterada, mesmo com o resfriamento da temperatura. Secundariamente acontece que o ATP é transportado através da membrana mitocondrial para o citosol por uma enzima, a adenina nucleotídeo translocase, e este mesmo transporte é o responsável pelo transporte de ADP de volta para dentro da mitocôndria. Verificou-se no entanto, que a adenina nucleotídeo translocase é sensível ao frio, o que limita a sua entrada na mitocôndria (223, 224). Em condições normais a concentração de ATP por algum mecanismo não atinge nível alto no citosol, devido a sua conversão em ATP e AMP pela adeninato kinase, sendo que nestas condições o AMP é quebrado em adenosina que é permeável pela membrana, movendo-se do meio intracelular para o extracelular. Mais adiante, a adenosina deaminase, quebra a adenosina em inosina e finalmente em hipoxantina. Assim, os precursores dos compostos fosfatados de alta energia na conservação são perdidos do meio intracelular para o extracelular o que acarreta uma diminuição da produção de ATP ou ainda mais importante, limita a produção da adenina nucleotídeo no momento do transplante, deixando as células desprotegidas durante as condições normotérmicas. Esta parte seria o assim chamado "inevitável dano ao órgão" que é peculiar e provocado ainda durante o período de conservação, e consiste

num campo aberto que deve ser investigado com o intuito de propor novas técnicas para que não aconteça este tipo de degeneração.

Conhecendo-se estes aspectos peculiares da bioquímica celular e do componente eletrolítico das soluções, tem surgido na literatura as assim chamadas soluções de terceira geração como é o caso da solução de Belzer ou de Wisconsin (28). Estas soluções diferentes das eletrolíticas puras, contam agora com a combinação de fosfatos de alta energia e adenosina, gluconato em lugar de cloreto, lactobionato de potássio, como agente osmótico e rico em potássio e substância coloidosmótica não proteicas que é o hidróxido de amido.

Esta nova solução montada com mais conhecimentos de bioquímica celular parece ser eficiente, sendo no momento ainda submetida a testes para ver sua ação na conservação clínica por tempo mais prolongado de órgãos. Ao lado disto está sendo submetida a diferentes condições experimentais para tentarmos compreender a sua ação, e desta forma, propor aprimoramentos na sua feitura (27).

## PRINCÍPIOS DA CONSERVAÇÃO RENAL

### LAVAGEM DO PARENQUIMA RENAL POR PERFUSÃO CONTÍNUA (BOMBAS DE PERFUSÃO)

| Procedimento                                    | Princípio                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1- Hipotermia (4 - 10°C)                        | a- Diminuir o metabolismo aeróbico<br>b- Diminuir a taxa de catabolismo<br>c- Diminuir o crescimento bacteriano<br>d- Reduzir o tempo de isquemia quente durante o transplante.                                                                                                     |
| 2- Perfusão Contínua                            | a- Fornecer o oxigênio para o metabolismo energético.<br>b- Fornecer substratos e drogas<br>c- Remover produtos inúteis do metabolismo<br>d- Avaliação das características da perfusão, para monitorar o estado do ri-<br>fuso, para monitorar o estado do ri-<br>e- Controlar o pH |
| 3- Proteína (albumina) ou outro agente oncótico | a- Suporte oncótico<br>b- Tampão<br>c- Carregadora de ácidos graxos para oxidação                                                                                                                                                                                                   |
| 4- Solutos impermeáveis                         | Prevenir o edema celular produzido pelo frio                                                                                                                                                                                                                                        |
| 5- Esteróides (Corticosteróides)                | Estabilizadores de membrana                                                                                                                                                                                                                                                         |

### LAVAGEM ELETROLÍTICA DO PARENQUIMA RENAL A FRIO, SEGUIDO DE ARMAZENAMENTO (PRESSÃO HIDROSTÁTICA)

| Procedimento                                                                         | Princípio                                                         |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 1- Hipotermia                                                                        | Depressão do catabolismo aeróbico                                 |
| 2- Manitol (ou outras substâncias impermeáveis, citrato, sulfato, fosfato, glicose). | Prevenir o edema celular                                          |
| 3- Potássio elevado                                                                  | Prevenir o vazamento do potássio intracelular induzido pelo frio. |
| 4- Magnésio                                                                          | a- Estabilizador de membrana<br>b- Inibidor metabólico            |
| 5- Drogas (corticosteróides, procaina, etc)                                          | a- Estabilizador de membrana<br>b- Vasodilatador<br>c- ?          |

### 1.2.3.- EFEITO DA CONSERVAÇÃO NAS MEMBRANAS CELULARES:

As membranas celulares tem um papel importante no metabolismo das células, isto inclui, o controle do meio intracelular e das organelas. Desta forma, ela está estruturada para responder ao meio intracelular e extracelular, através da modulação das reações, que termodinamicamente fornece a energia necessária e eficiente para as enzimas que atuam a nível de membranas, como é o caso da fosforilação com oxidação.

Ao lado disto, conforme a estrutura da membrana, uma determinada enzima pode ser eficiente na sua ação catalítica ou agir de forma diferente quando está atuando por exemplo num sistema aquoso.

As membranas em geral são constituídas de proteínas e lipídeos e existem evidências que a conformação lipídica pode variar na dependência da temperatura. Esta deformação na estrutura da membrana, pode alterar a eficiência de uma enzima que funciona ligada a esta estrutura. O comportamento das reações enzimáticas medidas através do gráfico de Arrhenius (reação do enzima dependente da temperatura) mostram descontinuidade, demonstrando que pode existir um aumento de energia de ativação de um enzima mesmo que esta esteja submetida a baixa temperatura. Nesta categoria inclui-se as reações enzimáticas nas membranas

mitocondriais (110), na membrana celular, como exemplo a Na - K ATPase, enzimas ligadas aos microssomos e enzimas ligadas ao retículo sarcoplasmático, assim como, várias reações enzimáticas catalizadas em diversos sistemas lacrimanos.

Existem diversos métodos para a medida da importância das variações térmicas em membranas e em muitos casos a descontinuidade no gráfico de Arrhenius, parece que se correlaciona razoavelmente com a estrutura lipídica da membrana.

Uma diferença interessante entre células que sobrevivem a hipotermia, contra células que são danificadas pela mesma, são as alterações encontradas nos componentes que constituem a membrana celular. Entretanto, o comportamento da membrana celular ao frio em termos de composição química não está claramente estabelecido, desde que até agora foram detectados apenas alterações qualitativas dependentes dos locais de ligação do componente estudado ou dos locais subcelulares do componente do sistema de membranas.

Assim, diversos trabalhos tem sido publicados comparando os sistemas de membranas em espécies de animais que hibernam com os que não hibernam, ou com outras espécies biológicas que são sensíveis ou insensíveis ao frio (160). Estes trabalhos, tem mostrado que as membranas lipídicas se convertem da forma gel ou de um estado líquido cristalino a um tipo mais rígido de estrutura quando submetida a

temperaturas mais baixas (56). Observou-se também, que este estado mais rígido é alcançado, na dependência do grau de insaturação dos ácidos graxos, e dos fosfolipídeos que compõe a membrana, assim como dependem da capacidade da membrana em fixar colesterol.

Assim, quanto maior for a insaturação e o nível de colesterol, menor será a temperatura necessária para induzir a fase transitória na membrana lipídica. Desta forma, nos animais normotérmicos, os sistema de membranas chegam na fase transitória com temperaturas entre 15 a 22°C. Por outro lado, nos animais que hibernam ou em outros sistemas que estão preparados para sobreviver em hipotermia, para alcançar este estado transitório necessitam de temperaturas muito mais baixas.

Estas considerações físicas com relação ao comportamento das membranas são relevantes, considerando que o gasto energético e a regulação iônica, que são estados críticos para a sobrevivência celular, estão diretamente ligados as respectivas membranas celulares. Assim, algumas das funções que podem ser alteradas incluem diminuição da atividade da Na - K ATPase, que acarreta queda do potencial de membrana, troca de eletrólitos intracelulares por aqueles encontrados no meio extracelular, levando finalmente ao edema celular. Estes fatos ocorrem independentemente do tempo de conservação.

Um outro fato que merece ser citado, é que na presença destas alterações eletrolíticas, o transporte de

aminoácidos permanece viável em fragmentos renais por pelo menos 24 horas, diminuindo a partir deste período de estocagem, e merece ser também citado que a taxa de adenosina difosfato (ADF) transportada para a mitocôndria é temperatura sensível (223).

Desta forma, a hipotermia age nas atividades relacionadas a membrana, alterando a homeostasia celular exercendo em conjunto, com o aumento da permeabilidade celular um papel importante na perda da viabilidade celular renal durante os processos de conservação, sendo que outros fatos colaboram com estas evidências embora observados em outros tecidos. Por exemplo, a fragilidade osmótica dos eritrócitos é maior com a diminuição da temperatura, e parece não estar relacionada com a energia liberada das bombas iônicas da membrana. Demonstra-se também, que grânulos de zimogênio podem liberar proteínas das células inclusive amilase, quando esfriados a 0°C, assim como tem sido demonstrado que enzimas lisossomais provenientes de lisossomas intactos aumentam com a hipotermia. Além disto, tem se observado também edema mitocondrial com a queda da temperatura. Estes achados podem estar relacionados com o efeito da baixa temperatura nos lipídeos das membranas, ou na conformação dos locais de ligação da proteína na sua respectiva membrana celular.

Os efeitos da temperatura nas membranas, podem contribuir para explicar as observações histológicas de retração de células tubulares renais e aumento do lumen



tubular que podem ser observados em rins preservados por períodos curtos. Estas observações foram caracterizadas por Pegg e Farrant (172) como uma "característica marcante", da conservação celular. No entanto, poderia também ocorrer a possibilidade que histologicamente, em condições hipotérmicas no rim isolado, as células pudessem aparecer edemaciada, devido aos efeitos da hipotermia, mesmo quando submetidos a situações isosmóticas (134). Corrobora com esta hipótese o fato de que a hipotermia por agir diminuindo a atividade da "bomba de sódio" a qual diminuiria a produção de ATP em fragmentos renais, facilitaria a entrada de água. Entretanto, durante a perfusão contínua, por vários períodos, as células da cortex não incham, embora exista um acúmulo de água durante a perfusão renal no tecido cortical renal, elevando o peso do órgão de 20% a 30% em água (22). Desta forma, para verificar este achado, investigadores utilizando a inulina como marcador de volume de fluido no espaço intersticial e vascular, observaram-se que este aumento de aproximadamente 30% se deve a um aumento de fluido no espaço extracelular. Notou-se também, que o acúmulo de fluido neste espaço ocorre nas primeiras 24 horas da perfusão e permanece o mesmo pelo resto do tempo medido ou seja até 72 horas. A detecção da situação assim chamada de "característica marcante" da célula conservada, ou seja a conseqüente diminuição do volume intracelular, ainda não está esclarecida, da mesma forma como não se sabe a ação dos agentes osmóticos que não

permitem que as células se edemaciem na perfusão hipotérmica de órgãos. Mas no entanto, o edema aparece quando o tecido é conservado em fragmentos. Portanto, a perda da função do rim não pode ao que parece ser responsabilidade única do fenômeno de redistribuição da água celular, pois estas células não estão inchadas até 72 horas e assim não impediriam o funcionamento tubular renal (154).

Várias teorias tem sido utilizadas e de certa forma sem bases experimentais aparentes para explicar a origem do assim chamado quadro histológico descrito como "característica marcante" do tecido e particularmente da célula renal. Assim atribui-se que durante a perfusão com soluções eletrolíticas a pressão oncótica diminuída e a pressão hidrostática alta, forçaria a entrada de fluidos no espaço extracelular, e nesta situação como ocorre a retirada da pressão oncótica do capilar, isto favorecia a manutenção do edema no espaço intersticial. Outra possibilidade que poderia ser aventada é que no rim perfundido, onde pode faltar fluxo linfático ocorreria acúmulo de proteína ou outras substâncias com força oncótica no meio extravascular, que retiraria água do intracelular aumentando o edema intersticial, com conseqüente diminuição do volume celular.

Entretanto, a contração celular durante a perfusão renal poderia ser conseqüência da perda de componentes osmóticos ativos da célula, devido a um aumento

da permeabilidade da membrana celular induzida pela hipotermia . Substâncias como eletrólitos, aminoácidos , cofatores metabólicos e proteínas, podem " vazar" para fora da célula, diminuindo desta forma a pressão osmótica e coloidosmótica intracelular . Para compensar, esta nova situação a célula perde água para equilibrar o meio interno com o externo em termos de osmolaridade. Desta maneira, o efeito direto da hipotermia na estrutura das membranas biológicas levando a um aumento da permeabilidade , poderia ser o responsável pelo quadro histológico renal relatado por Pegg e Farrant ,durante o fenômeno de preservação.

Além disto, o escape contínuo, através da membrana celular de metabólitos, proteínas, etc e que são necessárias para o metabolismo em situação normotérmica, podem ser os responsáveis pela perda da viabilidade do tecido renal após longos períodos de conservação (227) .

#### 1.2.4.- EFEITO DA CONSERVAÇÃO SOBRE A MITOCONDRIA:

Durante a conservação renal com hipotermia, existe uma perda constante da atividade mitocondrial. A taxa de consumo por respiração com DPNH ligado a substratos e a succinato, decresce em torno de 50% depois de 3 dias (223) e a estimulação da respiração mitocondrial pelo ADP ou por substâncias não ligadas a esta via, também se reduz em torno do mesmo valor (50%). Depois de 5 dias de preservação 80%

ou mais da capacidade de respiração mitocondrial está praticamente ausente e o controle da respiração mitocondrial está praticamente perdido.

Existem diversas causas para a perda da atividade mitocondrial durante a conservação hipotérmica.

Todos estes fatores, podem contribuir em parte para perda da atividade mitocondrial durante a conservação hipotérmica, embora a ação dos ácidos graxos livres possam se constituir em uma causa primária para a perda da atividade mitocondrial. Tem sido demonstrado que os ácidos graxos tem inúmeros efeitos sobre a mitocôndria, sendo que a acumulação do grupo acil, derivados dos ácidos graxos livres, inibem a fosforilação oxidativa pelo bloqueio do transporte de ADP para dentro da mitocôndria (144). Na origem destes ácidos graxos livres, dados obtidos indicam que durante a perfusão para a conservação pelo prazo aproximadamente de 24 horas poderiam causar destruição de cerca de 30% dos lipídeos do órgão (113). Na hidrólise dos fosfolipídeos e gorduras neutras, estes são catalizadas pelas lipases e podem produzir ácidos graxos livres assim como lisofosfatídeos, sendo estes produtos finais do metabolismo lipídico potentes moduladores das funções ligadas a membrana celular(55).

Assim, durante perfusão ou no armazenamento a frio existe um aumento de 56 a 120% de ácidos graxos livres na mitocôndria (225). Este nível é muito maior do que o necessário para alterar a estrutura e a função da

mitocôndria. Portanto, ao que parece o mecanismo da perda da atividade da mitocôndria durante a conservação pode ser devido as altas quantidades destes ácidos graxos livres que seriam produzidos pela ação das fosfolipases (34).

Desse forma, durante a conservação por perfusão contínua com soluções coloidosmóticas por 3 dias, os níveis de ácidos graxos livres chegam a ser 56% maior do que o controle. Durante a conservação pelo frio, com soluções eletrolíticas o nível passa a ser de 120%. Esta diferença poderia ser explicada pelo fato de que a perfusão contínua com perfusatos contendo albumina, estes podem remover uma certa quantidade de ácidos graxos livres das células, o que não ocorre quando o rim é conservado por soluções eletrolíticas a frio sem a perfusão contínua. A remoção de ácidos graxos livres por perfusão contínua podem lesar menos as membranas das células renais e esta talvez, seja em parte a razão pela qual a perfusão produz resultados melhores para alguns investigadores que a conservação estacionária a frio com soluções eletrolíticas.

Entretanto, com o tempo, a perda de fosfolipídeos ligados a membrana e a acumulação de ácidos graxos livres durante a perfusão para conservação, pode também destruir a viabilidade do rim.

Conjuntamente ao efeito destrutivo da conservação sobre a mitocôndria, existe um efeito direto da hipotermia na função destas organelas, assim, abaixo de 10°C a taxa de respiração fica limitada pela taxa de entrada de ADF dentro

da mitocôndria (223). Ao que parece, neste nível de temperatura o transporte de adenina nucleotídeo através da membrana mitocondrial está em grande parte suprimido devido a inibição de uma enzima chamada, adenina nucleotídeo translocase.

As translocases, estão localizadas na parte interior das membranas mitocondriais desta forma a solidificação dos lipídeos da membranas a 10°C ou menos prejudicam em parte o funcionamento da translocase e desta forma previne a rápida síntese de ATP. Consequentemente, a célula acumula ADP que não pode ser rapidamente refosforilada. A acumulação de ADP estimula a atividade da adenilato cinase, produzindo apenas uma molécula de ATP e AMP por duas moléculas de ADP. A acumulação de AMP e a diminuição na célula de compostos fosforilados de alta energia (carga energética) leva a estimulação da formação de oxipurina e a supressão "de novo" da síntese de purina e a perda na célula de precursores para a síntese de ATP (45). Desta forma, a diminuição no nível de ATP pode estimular a desfosforilação das proteínas ligadas a membrana os quais podem alterar a permeabilidade destas estruturas (90).

Considerando o fato que a hipotermia, (<10°C) "per se" limita a síntese de ATP é improvável que se aumentarmos o nível de ATP na célula, esta manobra possa ser efetiva na conservação, considerando o fato de que o fator importante é a perda da função mitocondrial a qual é letal para a sobrevivência da célula.

Por isso, o tempo de retorno da atividade mitocondrial após conservação é importante para a sobrevivência da própria mitocôndria sendo este um dado importante embora no momento ainda continue desconhecido.

Assim, rins que perderam mais de 50% de sua atividade mitocondrial são totalmente viáveis, como pode ser verificado pelos resultados funcionais de rins perfundidos por 3 dias e transplantados. Desta forma, um critério da preservação a longo prazo poderia ser o da manutenção de pelo menos 50% da atividade da mitocôndria. Trabalhos feitos para manter a atividade mitocondrial nestes níveis "in vitro" não conseguiram muito sucesso. Assim, um deles utilizando a nupercaina, um anestésico local, que inibe a fosfolipase endógena mitocondrial se mostrou capaz de preservar o controle da capacidade respiratória na mitocôndria de fígado de rato por mais de 60 horas, a uma temperatura de 0 a 4°C (207). No entanto, estes resultados não foram obtidos por outros laboratórios, inclusive com mitocôndrias isoladas provenientes de diferentes tipos de animais como rim de coelhos e cão e fígado de rato e coelho.

Por outro lado, outros trabalhos tem mostrado que o único meio de conservar mitocôndria ao que parece é a utilização de baixas temperatura. Assim, dados comparando isquemia quente com isquemia fria, em rins conservados por armazenamento a frio não funcionam bem se o tempo de isquemia quente for muito prolongado.

Um outro aspecto do problema é que a perda da atividade mitocondrial, durante a conservação renal ao que parece envolve as fosfolipases, esta afirmação está baseada no fato de que as células renais contém numerosas fontes de fosfolipases e estas enzimas quando originadas de lisossomos são ativas em pH baixos. Desta forma, isto pode não contribuir em proporção significativa para a degradação dos fosfolipídeos em rins perfundidos onde o pH é controlado, mas pode ser importante nas técnicas de conservação com o rim armazenado a frio. No entanto, existem fosfolipases em outras membranas que são ativas em pH altos e tem sido demonstrado que numerosas substâncias podem prevenir a atividade das fosfolipases (161), mas de uma maneira geral, está também demonstrado que altas concentrações destas substâncias são necessárias para atuarem nestes sistemas "in vitro" (242,161).

O mecanismo de ação destas substâncias é desconhecido mas provavelmente a ação seria devido ao seu envolvimento na camada fosfolipídica da membrana não permitindo a ação de outras enzimas, ao lado disto a maioria das fosfolipases necessitam de cálcio para a sua atividade máxima. Considerando, que a conservação pode induzir alterações no nível de cálcio intracelular ou na razão entre cálcio livre e o cálcio ligado, isto pode atuar nas características de ativação das fosfolipases.

Assim, considerando o aspecto conservação, sabe-se que a remoção do cálcio livre na célula é uma manobra



difícil, e existe também o fato de que o cálcio atua em importantes funções celulares, entre elas a manutenção da célula endotelial e por sua vez da integridade vascular. Desta forma, existe dados mostrando que a quelação de cálcio pela adição por exemplo EDTA ao perfusato para conservação produziu destruição em faixa da camada endotelial do vaso. Desta forma, a inibição ou a ativação de fosfolipases e atividade mitocondrial continua ainda um assunto em aberto nos estudos de conservação renal (227).

Finalmente, todos estes dados demonstram de forma inequívoca que a conservação do sistema mitocondrial é de vital importância para a manutenção de um órgão viável para transplante.

#### 1.2.5- COMPORTAMENTO DO ATP NA CONSERVAÇÃO RENAL

Está bem estabelecido o fato de que, o ATP é necessário para a sobrevivência celular. Sabe-se também, que a célula pode sobreviver por vários períodos de tempo com níveis baixos de ATP e no fim de 24 horas este enzima está muito baixo ou seja existe uma diminuição de 90% com relação ao normal.

No entanto, rins conservados com baixos níveis de ATP, em condições hipotérmicas, as células permanecem viáveis por pelo menos 24 a 48 horas, podendo alcançar até 72 horas em alguns casos. Assim, nos rins preservados por

perusão contínua, o nível de ATP frequentemente diminui durante o início deste procedimento e aumenta a níveis de 0,5 para 0,7 M moles/g de peso seco durante a perusão (23). Estes níveis são mantidos por três dias, seguindo-se de uma diminuição total de adenina nucleotídeos durante a perusão.

As medidas da relação entre níveis, de compostos de alta energia em rins conservados e a viabilidade do órgão, surgiu pelo interesse em saber qual a relação entre os níveis de ATP comparado os níveis de adenina nucleotídeos totais (TAN) ou seja a carga de energia para a célula (223), sendo que estes trabalhos sugerem uma correlação entre a viabilidade do rim e o TAN. Espera-se, que a correlação entre a viabilidade do rim e compostos intermediários de alta energia se correlacionem mais de perto aos níveis de TAN do que ao de ATP, desde que a viabilidade depende da capacidade da célula de regenerar ATP após a reperusão e normotermia. Para executar esta tarefa e para que esta manobra seja eficiente a célula deve ter precursores para a síntese de ATP como ADP e o AMP.

Estes achados levantam uma questão que é a da necessidade de manter altos níveis de ATP na célula para uma melhor preservação do órgão. Embora, ainda não haja uma resposta direta para esta questão, existe algumas indicações importantes de que os níveis de ATP devem estar elevados para que exista uma boa conservação. A razão não é só dependente dos níveis disponíveis de ATP para fornecer

energia para as reações, mas também devido a outras possíveis ações do ATP dentro da célula.

O ATP tem um efeito alostérico em várias reações enzimáticas e sobre seus metabólitos ADP e AMP. Desta forma, qualquer modificação na relação destes componentes, deve-se esperar uma alteração nos vários sistemas metabólicos (12). Assim, a quebra no sistema adenina nucleotídeos para oxipurina parece ser dependente de carga energética ( $ATP + 0,5 ADP$ ) / (TAN). Uma diminuição desta razão estimula a produção de adenina nucleotídeos com perda nos precursores de ATP pela célula.

Por outro lado, existem também evidências que o ATP é necessário para a manutenção de forma apropriada de aspectos morfológicos e funcionais do sistema de membranas. Assim características morfológicas e de permeabilidade da mitocôndria podem ser alteradas pelas adenina nucleotídeos (10), mesmo na ausência destes elementos no ciclo energético mitocondrial. Uma interpretação para este efeito da adenina nucleotídeo seria o seu envolvimento na manutenção de uma relação morfológica configuracional entre as várias proteínas da membrana e os seus componentes lipídicos.

Desta forma o ATP tem sido demonstrado, como capaz de diminuir a fragilidade dos lisossomos em várias situações que podem provocar a ruptura e talvez possa ter um papel importante na estabilização da membrana lisossomal, sendo que esta estabilidade dos lisossomos pode ser dependente do nível de ATP intracelular (245).

A indicação mais forte da importância do ATP na célula, vieram de trabalhos em eritrócitos. Em uma série de estudos vários investigadores mostram que a depleção de ATP em eritrócitos, expuseram os fosfolípidos das membranas a fosfolipases. O aumento da hidrólise de fosfolípidos foi também correlacionada com uma queda no nível de fosforilação das proteínas plasmáticas das membranas (90).

Estes dados, são interessantes, tendo em vista que a ação das fosfolipases possam ser as responsáveis pela perda da atividade mitocondrial durante a conservação. Devido a isto sugeriu-se uma explicação para alguns achados recentemente publicados, de que o rim isquêmico de cão era melhor conservado se o perfusato contivesse, ATP. O papel do ATP no caso pode ser devido a manutenção da fosforilação das proteínas da membrana celular, dificultando a lesão da membrana devido ao processo de conservação (149).

Sobre este aspecto seria interessante saber; se os efeitos da ATP na perfusão são mediados fora da membrana ou se o ATP tem primeiro que penetrar na membrana plasmática para ser efetivo nas membranas das células intactas ou se em condições normais não necessitasse entrar no meio intracelular. No entanto este raciocínio pode não ser verdadeiro considerando o fato de que a isquemia ou a conservação induzem lesões no órgão, que poderiam abrir canais para a entrada de ATP. Assim, para que o ATP possa ser eficaz nos processos de conservação por tempo prolongado ele deveria ser suplementado, pois, como foi demonstrado

anteriormente, existe uma quebra de ATP para oxipurinas nas perfusões experimentais de rim. Nestas condições a hidrólise do ATP também libera  $H^+$  e o perfusato terá que ter uma capacidade tamponante para prevenir uma possível queda do pH.

Existem trabalhos, sem sucesso, objetivando aumentar os níveis de ATP nas células renais durante a perfusão hipotérmica. Estes trabalhos sobre suplementação de ATP, estão baseados nos trabalhos de Lund que demonstraram que com um aumento de oito vezes no ATP em células hepáticas incubadas com adenosina em situação de normotermia, estas se mostraram metabolicamente mais ativas (148). Nestas condições, aumentando-se duas vezes o ATP as células tubulares renais também mostraram-se funcionalmente melhores. Estes resultados tem estimulado um grande número de pesquisadores em manter níveis de ATP aumentados em rins perfundidos em situações hipotérmicas ou em fragmentos de cortex, também em hipotermia, pela adição ao meio de adenosina, inosina e hipoxantina (63). Em geral os achados destes experimentos nestas condições tem indicado que a 10°C ou menos existe apenas um pequeno aumento nos níveis de ATP. A razão para que isto ocorra, parece estar relacionada com o fato de que como citado antes a 10°C ou menos a taxa de produção de ATP em mitocôndrias de rim de cão é limitada pela taxa de transporte da adenina nucleotídeo translocase para dentro da mitocôndria.

Em resumo, a capacidade da célula de manter um nível crítico (atualmente desconhecido) de ATP pode ser importante na manutenção da viabilidade por tempo prolongado do rim, por diversos motivos, não totalmente relacionados aos níveis metabólicos dos ATPs. Desta forma, altos níveis de ATP ou proporções adequadas de adenina nucleotídeos podem ser críticos para a manutenção das relações entre as estruturas celulares, como por exemplo a estrutura da membrana celular auxiliando na manutenção de um equilíbrio metabólico viável para a célula renal.

#### 1.2.6- METABOLISMO AERÓBICO E CONSERVAÇÃO DE ÓRGÃO:

Tem sido discutido, embora de forma divergente, que a perfusão contínua do órgão com bomba poderia ser mais benéfica que a perfusão a frio com pressão hidrostática e armazenamento sem perfusão. Assim, nesta condição, acredita-se que a perfusão fornece de forma constante substratos que podem gerar energia por oxidação ao rim, além de um fornecimento constante de oxigênio para a geração aeróbica de ATP. No entanto inúmeras considerações baseado em trabalhos científicos conduzidos adequadamente, demonstram que o metabolismo aeróbico não é particularmente importante para a conservação, podendo ser até um fator limitante na viabilidade celular.

A exposição a altos níveis de oxigênio tem se demonstrado tóxico para muitos órgãos e sistemas celulares (93). O mecanismo de toxicidade ao oxigênio ao que parece está envolvido à formação de radicais ricos em elétrons e de grande reatividade, tais como radicais lipídicos ou os chamados ânions superóxido (217). Os peróxidos livres tem se mostrado tóxicos para as mitocôndrias e outros sistemas de membranas, e existem um grande número de demonstrações da toxicidade do  $O_2$ . Assim, em um destes estudos, os rins foram perfundidos em condições hiperbáricas com o oxigênio ou hélio. Nestas condições o rim perfundido com  $O_2$ , funcionou mal após 24 horas com relação ao hélio. Foi demonstrado também que a perfusão renal do rim por 3 dias com alta concentração de oxigênio diminui a atividade mitocondrial de homogenato de cortex, o que poderia sugerir que o efeito do oxigênio pode limitar de forma importante a conservação renal por tempo prolongado. Isto poderia ser devido ao fato de expor o rim perfundido a concentrações de ar ambiente ou de oxigênio puro, situações estas peculiares e não fisiológicas (224).

Teoricamente, existe um baixo consumo de oxigênio na situação de hipotermia pelo parênquima renal e nestas condições esperava-se que a  $PO_2$  intracelular poderia se aproximar a  $PO_2$  do perfusato. Baseado nestes aspectos observou-se que nas perfusões hipotérmicas com o ar ambiente alcança-se  $PO_2$  de 100 a 150 mm Hg, enquanto que em condições de normotermia encontra-se  $PO_2$  de 5 mm Hg. Por isso,

durante a hipotermia a célula é colocada sobre altas tensões de PO<sub>2</sub> isto é de 20 a 30 vezes além do normal, aumentando a capacidade do oxigênio de induzir peróxidação sensível a temperatura. Desta forma, durante as conservações por 2 ou 3 dias ou mais deve ocorrer um aumento na formação de produtos tóxicos finais resultantes de peroxidação (3). Assim, nestas condições, foi observado um aumento de três vezes, no nível de malonilaldeído no tecido renal cortical conservado na presença de oxigênio por 3 dias. Baseado nestes aspectos foi recentemente desenvolvido um perfusato (24) que permite uma conservação por 3 dias com sucesso usando nitrogênio como fase gasosa do perfusato (24,98). Nestas condições, observou-se que a perfusão nitrogenada com um perfusato contendo uma albumina humana clorada como base, resultou numa redução do pH de 7,5 para 6,7 após 3 dias de perfusão devido a acumulação de ácido láctico, sendo que estes rins expostos a estas condições não funcionaram após o transplante. Por outro lado, a preservação da queda do pH pela mudança do perfusato no segundo dia, resultou na sobrevivência do órgão. Da mesma forma, experimentalmente a substituição do cloreto por gluconato, um ânion grande e impermeável, pode-se obter 3 dias de conservação sem queda do pH e sem mudança no perfusato (16). Estes dados resultaram em pesquisas que mostraram que rins perfundidos com estas soluções funcionaram muito bem até 3 dias de conservação com fases gasosas de nitrogênio ou oxigênio, sendo que nestas condições uma análise do nível de



peroxidação lipídica indicam que perfusões com nitrogênio precipitam melhor a formação de peróxidos de origem lipídica. Por outro lado perfusões com oxigênio induzem um aumento 3 vezes superior de peróxidos - lipídicos quando comparados com rins perfundidos com nitrogênio, sendo que foi também detectado outra alteração metabólica mostrando uma diminuição na formação de malonildialdeído nos rins perfundidos com diferentes tipos de atmosferas gasosas. Nestas condições estudadas, ao que parece o nível de adenina nucleotídeo, eletrólitos e atividade mitocondrial, etc., são relativamente os mesmos em cada pressão atmosférica. Por outro lado, tem sido demonstrado em cortex de coelho que altos níveis de  $O_2$  ( $PO_2$  em torno de 600 mm Hg) aumenta o nível de adenina nucleotídeos em mitocôndrias em condições de perfusão e conservação hipotérmica. Este assunto continua bastante controverso, pois outros autores não observaram estes dados em rins de cão conservados em condições semelhantes. Esta divergência talvez seja devido ao fato de haver comportamentos fisiológicos diferentes entre animais. Assim, sabe-se que o ADP estimula a taxa de respiração da mitocôndria cortical de coelho a qual seria descontinua abaixo de  $10^{\circ}C$ , mas por outro lado no cão esta parada ocorre a mais ou menos  $17^{\circ}C$ . Desta forma, a mitocôndria do rim de coelho pode estar mais capacitada para levar a fosforilação oxidativa mesmo em condições de baixa temperatura quando comparada com a do cão. Corroborando com este fato, existem evidências que o coelho tem um

comportamento mais próximo de animais com características hibernantes, quando comparados a outros animais de experimentação normotérmicos, o que de certa forma dificulta comparações em termos de conservação com o rim humano (226).

#### 1.2.7- ESTUDO DE CONSERVAÇÃO RENAL COM DROGAS:

O conceito de prevenir a perda da viabilidade celular pelas suas perspectivas durante a conservação com o uso de drogas ou outros compostos em animais e no homem, tem sido motivo de muitas investigações. No entanto esta área ainda não está em condições adequadas de avaliação científica. Por outro lado existem trabalhos esparsos mostrando que drogas ou outros agentes químicos colocados em perfusatos eletrolíticos ou bombeados no órgão para conservação, tem mostrado ser capaz de aumentar o tempo de conservação. Baseado nestes aspectos, acredita-se que o melhor efeito benéfico seria o pré-tratamento do doador com drogas na conservação do rim. Nestas condições este procedimento terapêutico deve ser precedido inicialmente, para efeitos práticos, da diminuição da isquemia quente, a qual permitiria uma conservação melhor em condições hipotérmicas (206).

Porisso, muitos centros de transplante fazem um pré-tratamento do doador cadáver com vasodilatadores para

prevenir vasoespasmo, ou utilizam a cloropromazina para induzir vasodilatação e assim por efeito indireto ou direto sobre a célula, protege-la dos danos da isquemia quente (32, 33).

Atualmente, drogas ou outros tratamentos químicos do rim durante a conservação estão baseados na idéia de que durante a conservação do órgão ocorrem alterações celulares que não viabilizam a sua regeneração, mas que poderiam existir substâncias capaz de fazê-las antes ou após o transplante.

Desta forma a supressão de alterações degenerativas nas células por inibidores metabólicos ou por estimuladores ativo do metabolismo são as primeiras manobras para tratamento do rim durante a conservação. As dificuldades nessa linha, esbarram principalmente na nossa falta de conhecimentos básicos, no que se refere aos mecanismos que levam o rim a perder a sua viabilidade durante a conservação. Assim, não sabemos qual o processo metabólico que necessita de inibição ou aquele que necessita de estimulação no processo de conservação. Ao lado disto, drogas que suprimem ou estimulam processos metabólicos na normotermia podem não agir ou não serem eficazes na hipotermia. Outra complicação que surge, é o fato de que as drogas que ativamente suprimem uma reação metabólica podem ser tóxicas para um outro detalhe do metabolismo celular.

### 2.2.8 ESTABILIZAÇÃO DE MEMBRANAS CELULARES NA CONSERVAÇÃO RENAL:

A perda da integridade da membrana pode ser um dos primeiros defeitos provocados pela conservação hipotérmica e pode ser devido as seguintes causas:

1- Degradação de componentes ligados a estrutura da membrana (fosfolipídeos),

2- Ruptura da membrana por produtos finais do metabolismo (ácidos graxos livres) provocada pela hipotermia com consequente aberturas de canais ou poros levando a saída de metabólitos importantes e perda da integridade dos sistemas de membranas plasmática, lisossomal, nuclear e mitocondrial.

Trabalhos nesta área, tem demonstrado que um grande número de substância podem aumentar a estabilidade de membranas dificultando a sua ruptura ou substâncias que podem diminuir a fragilidade de lisossomos expostos a condições líticas (243).

Embora não haja provas suficientes de que a ativação das enzimas lisossomais ocorra durante a hipotermia e se correlacione diretamente com a perda da conservação do tecido renal, existem dados mostrando que há um aumento no perfusato de enzimas do lisossoma durante a conservação (231).

Entre estes estudos, podemos citar, o achado embora em outro sistema, que os eritrócitos são facilmente hemolizados à temperaturas muito baixas e que esta hemólise ao que parece está correlacionada com o efeito do frio sobre os lipídeos da membrana desta célula, e possivelmente com a conformação das proteínas ligadas a membrana. Existem dados na literatura, que demonstram que várias substâncias com composições químicas diferentes são anti hemolíticas a baixas concentrações sendo que entre estas substâncias incluem-se anestésicos e fenotiazínicos que provavelmente agem na estrutura das membranas. Desta forma, imagina-se que os assim chamados modificadores clássicos de lipídeos como os antioxidantes aumentam a fluidibilidade das membranas a baixas temperaturas e em alguns casos aumentam a sobrevivência de cultura de células colocadas em hipotermia (200). No entanto, o mecanismo de ação destes agentes não é conhecido mas poderiam ser investigados se teriam condições de aumentar a qualidade e o tempo de conservação renal.

Baseado nestes aspectos achamos que o uso de drogas na conservação renal, poderá se tornar no futuro um importante instrumento para se conseguir maior viabilidade celular.

#### 1.2.9 EFEITOS VASCULARES DA HIPOTERMIA.

Durante a hipotermia ocorre edema do endotélio vascular, assim como pode ocorrer em outras células, para um

determinado período de isquemia, embora o esfriamento por si consista num fator protetor contra o fenômeno de "no reflow". Estes achados se consistem na seria a maior evidência que o fenômeno de "no reflow" não ocorre por edema endotelial. Ao lado disto as técnicas de conservação utilizando solutos impermeantes auxiliam a proteger do edema endotelial e desta forma as alterações estruturais não são um fato importante na conservação vascular renal, para um grande número de pesquisadores.

Entretanto recentemente Andrews e Coffey (9) descreveram alterações importantes, com ruptura de endotélio glomerular depois deste exposto por 24 horas a 0 - 22°C e necrose endotelial completa depois de 48 horas em rins conservados em soluções utilizadas para culturas de tecido. No entanto estas lesões eram extremamente atenuadas com a solução de Collins, mas mesmo nestas condições após 48 horas as alterações endoteliais eram extensas. Utilizando-se da microscopia de varredura demonstrou-se que as menores alterações do endotélio vascular renal coincidiram com rins funcionantes. Ao lado disto, rins com 24 horas de conservação mostravam uma membrana endotelial normal com 3 dias bastante fenestrada e com 7 dias a membrana endotelial era semelhante a uma "folha de papel" perdendo todas as suas características morfológicas. No entanto os podócitos epiteliais aparentavam estar normais mesmo após 7 dias de conservação (227). Embora outros pesquisadores mostrem por microscopia eletrônica maior número de microvilosidades,

cojetando-se na cápsula de Bowman com os podócito desenvolvendo inúmeras protuberancias deformando as características normais destas células endoteliais (207,20).

Alguns investigadores acham que a escolha do colóide para a perfusão tem um papel importante na proteção do endotélio contra a lesão vascular. Assim, a substituição de albumina por dextrana causa lesão importante no endotélio após 24 horas de perfusão a 10°C, o mesmo não ocorrendo com a gelatina polipeptídica "Haemacel" (175) sendo nestas condições a albumina purificada o melhor meio de proteção (175).

Outros autores, encontraram lesões importantes depois do transplante, com ruptura do endotélio glomerular com deposição de plaquetas e fibrina na membrana basal de rins perfundidos por menos de 20 horas. Estudos realizados posteriormente mostraram que estas lesões eram dependentes da pressão de perfusão isto é, quanto maior a pressão, maior a lesão e que os fluxos são menores na cortex profunda e na medula como na isquemia normotérmica (103,13). Nestas condições ficou também evidenciado que as hemáceas e o endotélio interagem e que as plaquetas são vitais nas perfusões a 37°C para a integridade do endotélio (175, 188, 238).

Desta forma, em termos práticos pós-transplante seria interessante fornecer ao receptor substâncias que diminuíssem a atividade plaquetaria como por exemplo as prostracidinas embora tenha vida média curta (5 minutos) e

produza hipotensão; outros agentes poderiam substituí-la como a uroquinase (ativador do plasminogênio) que previne a deposição de fibrina.

Estes agentes principalmente a uroquinase tem mostrado ser efetiva principalmente com a solução de Collins como conservadora do rim de cão. Nestas condições ainda não foi testada a associação de uroquinase e prostacidina.

Estas considerações morfológicas vasculares renais são importantes, principalmente para a interpretação de quadros histológicos no pós-transplante imediato onde as crises de rejeição são frequentemente descritas como alterações vasculares as quais poderiam ser devida apenas a problemas técnicos na conservação do rim para o transplante.



### 1.3 CONSERVAÇÃO NORMOTÉRMICA DE RINS

O uso da normotermia ou de temperaturas acima de 30° para a conservação renal, não produziu até o momento resultados satisfatórios, mesmo para curtos períodos de conservação. Recentemente, mostrou-se que a combinação de conservação hipotérmica seguido de um período curto de perfusão normotérmica com sangue total teve sucesso na conservação renal. A técnica consiste no seguinte: rins de cão são conservados em bombas pulsáteis em hipotermia por 3 dias e a seguir perfundidos com sangue total através da conexão a outro cão por 4 horas, nestas condições o rim foi auto transplantado com sucesso em cinco de seis cães. Para efeitos de raciocínio poderia se supor ao contrário do afirmado acima, ou seja, fazendo-se 4 horas de perfusão normotérmica com sangue total poderia levar o rim a "condições normais" e assim a conservação por mais 3 dias em condições de hipotermia possa de certa forma ser melhor tolerada em termos de conservação (237).

No entanto, estes procedimentos são complicados e difíceis sob o ponto de vista prático para utilizá-lo no transplante clínico. Assim, se um perfusato pudesse ser desenvolvido para substituir o sangue total e adaptável para perfusões normotérmicas por 4 horas, a manobra citada acima, poderia funcionar como um possível método a ser desenvolvido, para auxiliar na utilização de técnicas adequadas para conservação renal.

#### 1.4 - RESUMO GERAL DA INTRODUÇÃO

Após esta apresentação geral, acreditamos que o desenvolvimento de técnicas de conservação por tempo prolongado ainda necessita do conhecimento dos mecanismos básicos envolvidos na perda da viabilidade do tecido renal sob o aspecto bioquímico e fisiológico.

Uma vez conseguido estes objetivos poderemos "prescrever" o tratamento terapêutico adequado a cada momento para o rim durante o processo de conservação.

Nestas condições, poderíamos incluir durante a conservação manobras, tais como; o uso de drogas ou substâncias que estimulassem ou inibissem as reações celulares, períodos de reaquecimento do rim para regenerar metabólitos para reparar danos celulares, além do desenvolvimento de novos perfusatos baseado na aquisição de conhecimentos das necessidades metabólicas do órgão armazenado em hipotermia.

O desenvolvimento da capacidade para armazenar um rim por 3 dias ou mais teria um grande impacto sobre os pacientes com IRC. Entretanto este objetivo ainda necessita de um incrível nível de conhecimentos, pois além da conservação do rim necessitamos do desenvolvimento de testes rápidos para escolha do melhor doador- receptor cujas análises ainda necessitam de 5 a 7 dias para atingir o nível máximo de acerto na escolha. Além disto, o tempo de

conservação renal por cinco dias ou mais seria importante para podermos utilizar de todos os conhecimentos de tipagem imunonológico, preparar equipes de transplante e desta forma racionalizar os programas de transplante renal clínico.

Gostaria de salientar, que nesta introdução discutimos apenas alguns dos princípios básicos da conservação renal, mostrando que por enquanto o ponto principal em que se baseia a conservação é a **hipotermia** através da supressão da taxa de destruição da viabilidade do tecido renal. Além disto, enfocamos que a ação do rebaixamento da temperatura na capacidade celular de gerar energia e manter a estrutura da célula pode ser o ponto crítico na melhora das técnicas de conservação; mas ainda permanece obscuro as razões pelas quais o rim perde a viabilidade durante a conservação hipotérmica.

Acreditamos que os conhecimentos para resolver estes problemas só podem ser conseguidos através de um esforço interdisciplinar que poderia ser conseguido pelo envolvimento de pesquisadores de diversas áreas da medicina, farmacologia, fisiologia, bioquímica e da engenharia biomédica, associada aos incriveis avanços da biologia molecular e da tecnologia como um todo.

Finalmente, na nossa experiência, acreditamos que a conservação de um órgão por tempo prolongado nos "Bancos de Órgãos" possa ser considerada como um estado dinâmico, cujo metabolismo deste seja avaliado por parâmetros bioquímicos e fisiológicos, objetivando-se tratá-lo durante a conservação, simulando a uma situação clínica de doença aguda, utilizando-se de todo um arsenal terapêutico que possa impedir o tecido renal de terminar em morte celular, e assim fornecendo um órgão nas melhores condições para o receptor.

### 3- OBJETIVOS

Os trabalhos que serão apresentados nesta coletânea, envolvem estudos realizados no nosso laboratório sob forma de teses e publicações e dados originais da função do túbulo renal, submetido diretamente a conservação com a solução eletrolítica de Collins com e sem magnésio (Euro Collins). Nestes estudos, iniciamos numa sequência morfológica com os segmentos do túbulo proximal (F1 e F2) e pars recta (F3) seguido do túbulo coletor cortical (TCC) e túbulo coletor papilar (TCP). Todos estes segmentos foram submetidos a diversas manobras experimentais de conservação e estudados em alguns de seus parâmetros funcionais pela microperfusão isolada "in vitro". (Figura 1).

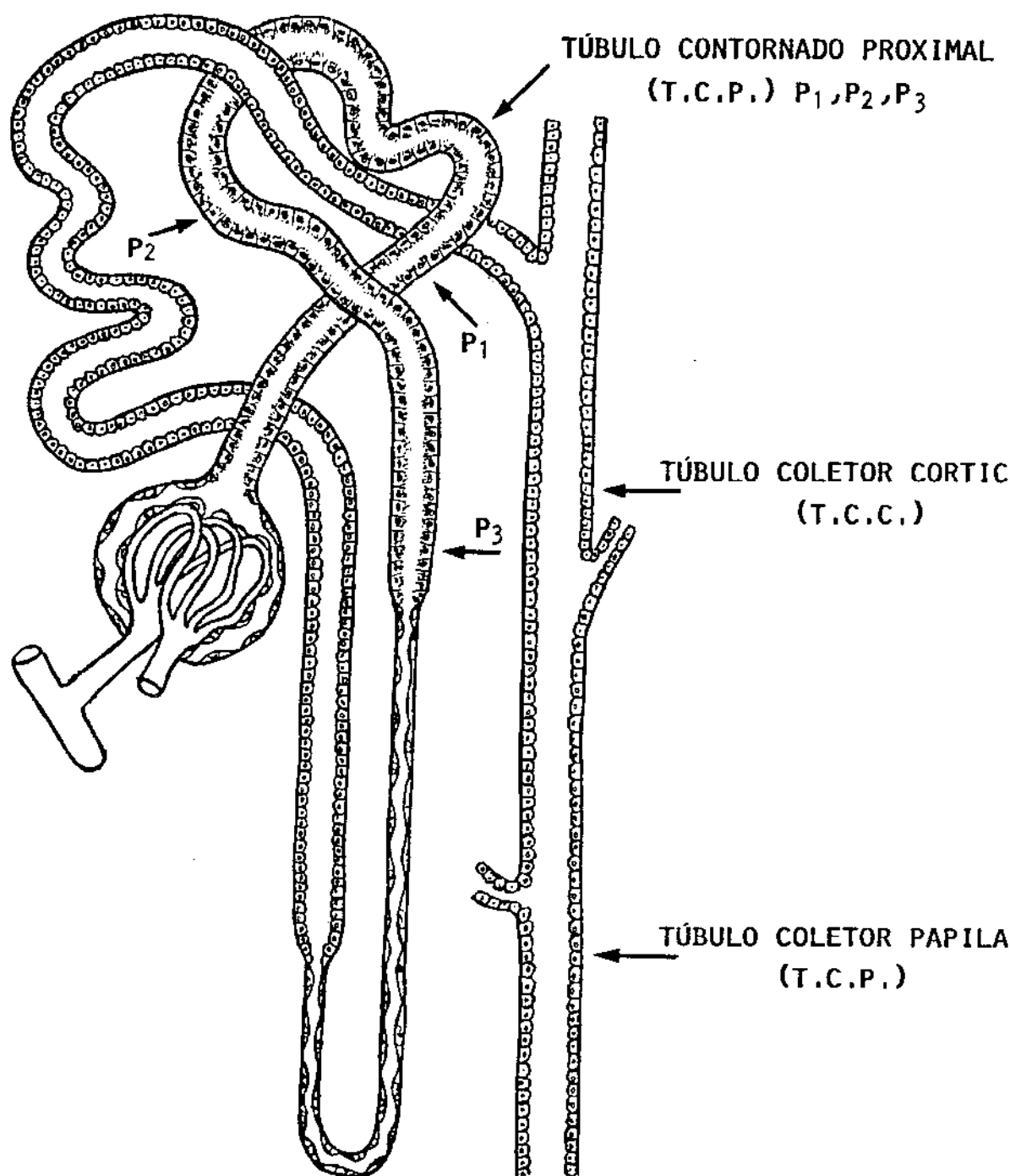


FIGURA 1: ESQUEMA DAS PARTES DO TÚBULO RENAL DE COELHO E RATO ESTUDADAS ATRAVÉS DA TÉCNICA DA MICROPERFUSÃO "IN VITRO".

- 3- ESTUDOS DA AÇÃO DA SOLUÇÃO CONSERVADORA DE COLLINS  
EM TUBULOS CONTORNADOS PROXIMAIS (P1, P2) DE  
COELHOS ISOLADOS E PERFUNDIDOS "IN VITRO"

### 3.1- INTRODUÇÃO:

Em geral, a conservação renal preocupa-se com a preservação da estrutura renal como um todo, isto é, o glomérulo, o túbulo renal, o interstício, o compartimento vascular, e o sistema nervoso assim, como as respectivas células que compõem estes compartimentos, tais como a endotelial, mesangial, epitelial, intersticial muscular e a nervosa. Considerando estes aspectos de preservação, seria de interesse estudar a eficiência das técnicas de preservação sobre as estruturas renais isoladas. Dentre estas, seria interessante inicialmente estudar o túbulo renal através do túbulo contornado proximal e pars recta, pois estes segmentos tubulares apresentam um sistema de alto metabolismo celular para absorção dos íons e moléculas e é um dos segmentos do néfron mais susceptível à ação da preservação (9,70,108,166,194), manifestada pela presença da necrose tubular aguda (NTA).

O estudo de segmentos do túbulo contornado proximal isolado "in vitro" pode ser realizado através da utilização da técnica de microperfusão de túbulo renal. Com esta técnica pode-se avaliar diretamente e de forma dinâmica a ação das soluções preservadoras sobre a função e a morfologia das células de um único segmento do túbulo renal. Desta forma, nesta preparação temos apenas a célula epitelial que possui bem delimitados, dois lados para o acesso das soluções preservadoras. Um seria o lado luminal



através da membrana da borda em escova da célula epitelial do túbulo contornado proximal e o outro o lado peritubular pela membrana basolateral. Assim, considerando que as características funcionais de permeabilidade das duas membranas são diferentes, pode ser também diferente a ação das soluções preservadoras sobre estas estruturas. Devido a estas considerações morfológicas, neste estudo simularemos de forma pioneira manobras de conservação tubular "in vitro" pela passagem da solução preservadora no túbulo, tanto do lado luminal, como do peritubular ou em ambos. Estas manobras são justificadas pelo fato que durante a preservação do rim, quer por lavagem a frio ou por perfusão contínua, não se sabe a real distribuição da solução preservadora pelos compartimentos renais.

Desta forma pode-se imaginar diversas hipóteses para a passagem da solução preservadora durante a preservação. Na primeira hipótese (I) supõe-se que a solução preservadora venha pelo lado peritubular via capilar glomerular, visto que na perfusão do rim para transplante não se observa uma grande drenagem da solução pelo ureter. A segunda hipótese (II) é de que haja a utilização da via peritubular e luminal pela via vascular e por filtração glomerular. Fica ainda em aberto uma terceira hipótese (III) que seria a situação anômala da solução preservadora passar somente no lado luminal por filtração glomerular. Estas hipóteses estão esquematizadas na **Figura 1.**

Simulando estas circunstâncias de perfusão, poder-se-á estudar se existe uma via preferencial na conservação da camada celular epitelial nesta preparação e se os achados poderiam ser utilizados para uma melhor conservação "in vivo".

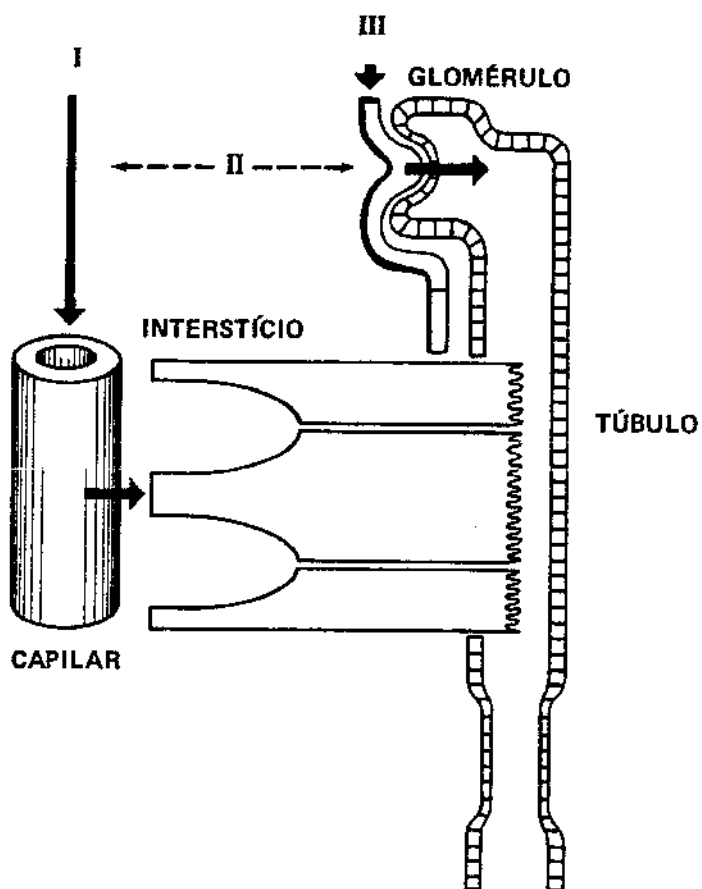


FIGURA 1 - POSSÍVEIS VIAS DE ACESSO DE UMA SOLUÇÃO CONSERVADORA NO TÚBULO RENAL.

### 3.2- MATERIAL E MÉTODOS:

Os estudos de preservação foram desenvolvidos através da técnica de microperfusão do túbulo renal isolado "in vitro" descrita por Burg e cols em 1966 (47), com algumas modificações (77,79). Nesta preparação, coelhos machos brancos mestiços, de aproximadamente 1,5 a 2,6 Kg são sacrificados e retira-se um dos rins. A seguir são feitos cortes horizontais à cortex renal retirando-se fragmentos de aproximadamente 1mm de espessura. Estes fragmentos são transferidos para uma placa de Petri contendo uma solução semelhante ao plasma a 42°C que é gaseificada com O<sub>2</sub> 95% e CO<sub>2</sub> 5%, e nestas condições se efetua a dissecação do túbulo. Túbulos contornados proximais são dissecados com o auxílio de uma lupa (Bausch & Lomb) e por meio de pinças finas (Dumont, nº 5), microestilete e microbisturi (Thomas Co.). Após a dissecação, o túbulo é transferido para uma câmara especial de perfusão e focalizado na base da mesma, através de um microscópio invertido (Reichert). Por meio de micromanipuladores chega-se com o sistema de micropipetas próximo as extremidades do túbulo, e através de sucção, este é colocada no interior da pipeta de suporte do lado perfusor.

Conforme pode ser observado na figura 2 penetra-se com a pipeta perfusora no centro do lúmen tubular, e por meio de pressão hidrostática, fornecida por uma coluna de líquido de altura variável, inicia-se a perfusão do túbulo.

A seguir, aspira-se a outra extremidade do túbulo na pipeta suporte coletora. Esta pipeta está preenchida por um óleo tetradecano hidratado (Fluka A.G.) corado com Sudan Black (Merck) para visualização do volume perfundido, sendo envolvida a sua extremidade com óleo Sylgard nº 184 (Dow Corning) para um bom isolamento elétrico e hidráulico do túbulo no interior da pipeta. Uma vez colocado o túbulo nas pipetas, o banho da câmara é aquecido a 37°C e gaseificado com O<sub>2</sub> 95% e CO<sub>2</sub> 5%. Após aproximadamente 20 minutos de equilíbrio, inicia-se a coleta de amostras do fluido perfundido com uma pipeta especial de coleta de volume constante.

As soluções que banham os túbulos são trocadas constantemente à 0,3 ml/minuto, através da sua infusão contínua na câmara de perfusão, por uma bomba de infusão (Harvard, modelo 975) e a sucção por uma bomba de pressão negativa (Neuoni Ltda.) .

O resfriamento das soluções conservadoras é obtido através da passagem contínua da solução fria por um catéter envolto numa serpentina de cobre, previamente resfriada à 0°C, que está imersa no gelo. Esta solução fria, de aproximadamente 10°C, é infundida e trocada continuamente assim como as outras soluções banhantes.

Dependendo do protocolo experimental a solução perfusora também foi trocada por meio de um sistema de troca de perfusato. Este sistema é constituído por um sistema de troca montado no interior da pipeta perfusora com uma saída

para o escoamento do líquido conectado na extremidade posterior da pipeta perfusora, (50).

Nas soluções perfusoras é adicionado como marcador de volume a  $^{14}\text{C}$ -Carboxi-Inulina (New England Nuclear) para medidas diretas da absorção de fluido. A quantidade absoluta de fluido absorvido ( $J_0$ ) é calculada pela seguinte fórmula (40):

$$J_0 = \frac{VL}{L} \left[ \frac{(14\text{C} - \text{Inulina } L)}{(14\text{C} - \text{Inulina } 0)} \right] - 1$$

onde:  $VL$  (nl/min) é a velocidade de coleção da amostra;  $L$  (mm) é o comprimento do túbulo perfundido, medido por um micrômetro calibrado colocado na ocular do microscópio; e a relação  $(14\text{C} - \text{Inulina}) L / (14\text{C} - \text{Inulina}) 0$  é a razão entre o marcador de volume no coletado comparado com o perfundido e expresso em nl/min.mm. As amostras do perfusato serão colhidas em intervalos determinados e em seguida transferidas para tubos especiais de polipropileno preenchidos com uma mistura de água destilada e líquido cintilador Aquasol L.S.C. (New England Nuclear), na proporção de 1:10. Estes tubos são colocados dentro de frascos de vidro de borossilicato, para que sejam contadas as emissões beta das amostras num contador beta (Beckmann modelo BK 100).

Todos os experimentos foram realizados a temperatura ambiente controlada em torno de 22°C através de ar condicionado.

Os resultados obtidos são representados em média ( $\bar{X}$ ) e erro padrão da média ( $\pm$  EPM). Estes dados foram analisados pelo teste t de Student pareado e não pareado. O índice de significância utilizado foi de 5% ( $p < 0,05$ ). (248)

A composição das soluções utilizadas são as seguintes:

#### I-) SOLUÇÃO CONTROLE

KREBS HENSELETT MODIFICADO -(Solução semelhante ao plasma) : utilizada de rotina na técnica como solução que banha o túbulo):

|                                                      |                                 |
|------------------------------------------------------|---------------------------------|
| NaCl.....                                            | 105 mM                          |
| NaHCO <sub>3</sub> .....                             | 25 mM                           |
| NaC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ..... | 10 mM                           |
| KCl.....                                             | 5 mM                            |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....               | 1 mM                            |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....                | 0,6 mM                          |
| MgSO <sub>4</sub> .....                              | 0,6 mM                          |
| CaCl <sub>2</sub> .....                              | 2 mM                            |
| Alanina.....                                         | 5 mM                            |
| Glicose.....                                         | 8 mM                            |
| Albumina Bovina.....                                 | 6.5 g/dl                        |
| pH.....                                              | 7,4 a 37°C                      |
| Osmolaridade.....                                    | 290 mOsmoles/KgH <sub>2</sub> O |

## II- ) SOLUÇÃO CONSERVADORA

### COLLINS MODIFICADO SEM ADITIVOS:

|                                       |                                |
|---------------------------------------|--------------------------------|
| NaHCO <sub>3</sub> .....              | 10 mM                          |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ..... | 15 mM                          |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ..... | 40 mM                          |
| KCl .....                             | 15 mM                          |
| MgSO <sub>4</sub> .....               | 28 mM                          |
| Glicose .....                         | 139 mM                         |
| pH .....                              | 7,0 a 25°C                     |
| Osmolaridade .....                    | 330mOsmoles/KgH <sub>2</sub> O |

O perfusato, que é a solução que irá atravessar o lúmen celular, consiste da solução banhante ultrafiltrada através de uma membrana Millipore PTGC 04710, a qual retém moléculas com peso acima 10.000 daltons. Esta ultrafiltração é feita sob pressão positiva de nitrogênio a 5,0 psig numa câmara especial de ultrafiltração. Esta manobra procura simular a filtração glomerular "in vitro".

Assim nestas condições de perfusão tubular, realizamos os seguintes experimentos:



## ESTUDO DAS VIAS PREFERENCIAIS PARA A PRESERVAÇÃO DA CAMADA CELULAR:

A distribuição das soluções preservadoras através das estruturas renais, durante a perfusão do rim na preservação, e o efeito do contato direto da solução preservadora sobre as vias celulares do túbulo renal ainda não é conhecido. Portanto, desenvolvemos neste protocolo experimental várias manobras, nas quais tentamos simular os diversos compartimentos que poderiam ser preenchidos com a solução preservadora. Desta maneira, neste protocolo experimental, coelhos foram sacrificados, o rim retirado e os fragmentos corticais foram imediatamente transferidos para a placa de dissecação. Estes fragmentos foram dissecados em uma solução semelhante ao plasma a 40°C gaseificada com O<sub>2</sub> 95% e CO<sub>2</sub> 5%. Os túbulos contornados proximais obtidos destes fragmentos foram perfundidos, durante o período controle, com uma solução semelhante ao plasma do lado peritubular e luminal. Esta solução era aquecida a 37°C e gaseificada com O<sub>2</sub> 95% e CO<sub>2</sub> 5%. Após este período, se realizava o período **experimental**, que consistia na preservação do túbulo renal "in vitro". Neste período colocou-se diretamente em contato do túbulo a solução preservadora de Collins a 10°C sem gaseificação no lado peritubular ou luminal ou ambos e não se utilizou a pressão hidrostática para a perfusão. A seguir voltou-se a perfundir o túbulo do lado peritubular e intraluminal com

solução semelhante a do plasma, para avaliar a função tubular residual pós período de conservação (período de recuperação). Durante o período controle e de recuperação foram coletadas amostras de fluido para análise de absorção de fluído. Assim os grupos experimentais desenvolvidos neste protocolo foram os seguintes:

#### GRUPO I

Neste grupo (n=7) no período experimental foi simulada uma situação de ausência de filtração glomerular durante a perfusão do rim para o transplante com a solução preservadora. Portanto, a solução preservadora de Collins a 10°C foi colocada só do lado peritubular, sendo que o lado intraluminal está preenchido com solução semelhante ao plasma, porém sem pressão de perfusão (perfusão estacionária).

#### GRUPO II

Neste grupo (n=6) foi simulada uma situação experimental na qual há passagem da solução preservadora por filtração glomerular e pelo capilar peritubular. Portanto, a solução de Collins a 10°C foi colocada do lado peritubular e intraluminal do túbulo. Após o preenchimento do lúmen com solução de Collins, diminuiu-se a pressão de perfusão.

GRUPO III

Neste grupo (n=5) simulou-se uma situação anômala de filtração glomerular logo no início da perfusão do rim sem a perfusão perivascular. Assim, colocamos a solução de Collins a 10°C só do lado intraluminal e do lado peritubular perfundimos com solução semelhante ao plasma a 10°C sem gaseificação, após o preenchimento do lúmen com a solução de Collins.

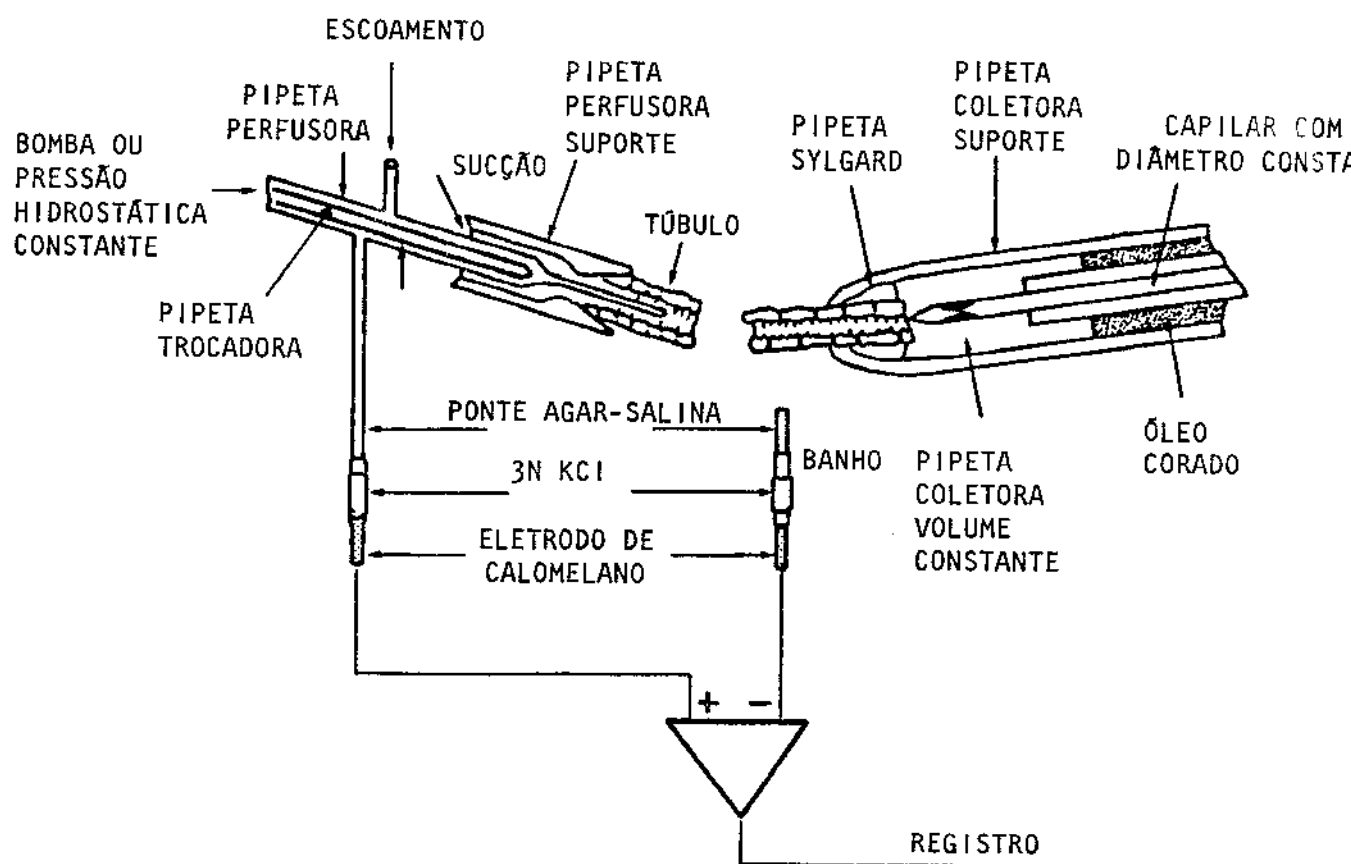


FIGURA 2 - ESQUEMA DO SISTEMA DE MICROPIPETAS UTILIZADAS NA TÉCNICA DE MICROPERFUSÃO DE TUBULO ISOLADO "in vitro".

### 3.3- RESULTADOS:

Foram desenvolvidos 3 grupos experimentais com perfusão estacionária com a solução de Collins em contato com uma das vias delimitantes da camada celular epitelial de túbulos contornados proximais provenientes de fragmentos renais não preservados. Na tabela 1 e gráfico 1 estão representados os valores médios dos parâmetros funcionais observados no grupo I (n=7). Neste grupo durante o período controle de  $60 \pm 4$  minutos foi observado uma absorção de fluido (Jo) de  $1,15 \pm 0,24$  nl/min.mm quando o túbulo foi perfundido a uma velocidade de  $12,1 \pm 0,7$  nl/mm. Após a perfusão experimental de  $20 \pm 1$  minutos com solução de Collins a 109C do lado peritubular e solução semelhante ao plasma do lado luminal sem pressão hidrostática, passou-se para o período de recuperação com perfusão de solução semelhante ao plasma de ambos os lados do túbulo, como no período controle.

No período de recuperação observou-se uma absorção de fluido de  $1,05 \pm 0,17$  nl/min.mm quando os túbulos foram perfundidos a uma velocidade de  $13,0 \pm 0,8$  nl/mm durante  $55 \pm 3$  minutos. Não houve diferenças significantes na absorção de fluido e na velocidade de perfusão entre o período controle e o de recuperação, sugerindo que esta condição de passagem de solução de Collins do lado peritubular não prejudica a função tubular.

Na tabela 2 e gráfico 1 estão representados os valores médios dos parâmetros funcionais observados no grupo

II (n=6). Assim, durante o período controle foi observada uma absorção de fluido de  $1,21 \pm 0,31$  nl/min.mm quando os túbulos foram perfundidos a uma velocidade de  $17,0 \pm 1,5$  nl/min durante  $48 \pm 3,5$  minutos. No período experimental de  $27 \pm 0,3$  minutos perfundiu-se o túbulo à baixa pressão com a solução de Collins a 10°C do lado peritubular e luminal. Assim, no período de recuperação, sem alterar significativamente a velocidade de perfusão de  $14,4 \pm 0,1$  nl/min em comparação ao controle, verificou-se uma queda significativa ( $p(0,05)$ ) na absorção de fluido de  $0,38 \pm 0,22$  nl/min.mm quando o túbulo foi perfundido durante  $50 \pm 0,9$  minutos. Esta queda na absorção de fluido mostra que esta manobra experimental não é eficiente na preservação da função tubular.

Na **tabela 3** e **gráfico 1** observa-se os valores médios dos parâmetros funcionais obtidos no grupo III (n=5). Este grupo apresentou durante o período controle uma absorção de fluido de  $0,83 \pm 0,18$  nl/min.mm quando a perfusão foi a uma velocidade de  $13,6 \pm 0,5$  nl/min por  $48 \pm 2$  minutos. No período experimental de  $28 \pm 3$  min., perfundiu-se o túbulo com solução de Collins a 10°C só do lado luminal, permanecendo uma solução semelhante ao plasma a 10°C do lado peritubular. A seguir realizou-se o período de recuperação onde se observou uma queda significativa ( $p(0,05)$ ) na absorção de fluido em comparação ao período controle, com um JV de  $0,14 \pm 0,09$  nl/min.mm. Esta queda da absorção foi acompanhada de uma queda significativa da

velocidade de perfusão, a qual foi de  $11,4 \pm 0,6$  nl/min com um tempo total de perfusão de  $51 \pm 4$  minutos. Estes dados sugerem que esta condição experimental de passagem de solução de Collins só do lado luminal foi a que mais lesou estes parâmetros de função celular, indicando que a via luminal não é eficiente para a conservação celular com a solução de Collins.

### 3.4- DISCUSSÃO:

Estes resultados, indicam que os diferentes lados da célula tubular reagem diferentemente a conservação depois da perfusão dependendo da superfície do túbulo contornado proximal (TCF) que tem contato com a solução de Collins. (C2).

Observou-se que o contacto com a solução C2 apenas com a superfície basolateral tubular (grupo I) resultou numa melhor conservação da função tubular. Uma explicação possível para isto, poderia ser que a estrutura da superfície celular basolateral que é pouco permeável a ions e moléculas, poderia dificultar o influxo de ions da solução para a célula (23). Ao mesmo tempo, a temperatura de 10°C e a composição iônica da solução C2, poderia inibir as "bombas" e trocas iônicas ficando somente dependente do fluxo passivo devido aos gradientes iônicos. Por outro lado, o contato da solução C2 com o lado luminal (Grupo 2 e 3) poderia levar a uma absorção dos ions da solução C2 pela célula, o que poderia mudar o meio interno celular e o seu metabolismo (227). Este fenómeno provavelmente causaria dano celular, o que poderia ser reversível ou não após a reperfusão do túbulo.

A condição experimental na qual a solução apenas entra em contato com o lado basolateral do TCF poderia ser semelhante à aquela na situação clínica, quando o rim é lavado por pressão hidrostática com a solução C2, durante a



preparação para transplante. Sob estas condições a solução conservadora provavelmente alcança o néfron via capilar peritubular, sendo a filtração glomerular possivelmente abolida durante a lavagem renal à frio com soluções iônicas, o que pode ser demonstrado pelo fato de ao que parece existe uma facilitação para que o fluxo da solução iônica venha mais pelo lado venoso do que pelo ureter, durante a conservação clínica, pois o lado venoso apresentaria menor resistência ao fluxo da solução conservadora a 10°C.

Assim, nossos dados indicam que a filtração glomerular poderia ocorrer durante a conservação renal, mas se isto acontecer em grande escala poderia levar funcionalmente a célula tubular conforme mostrado nos grupos II e III. Estes dados mostram uma diminuição importante no fluxo de perfusão através do túbulo e uma queda na reabsorção de fluido através da célula, além de alterações tubulares à microscopia ótica dinâmica, a qual lembra um quadro de necrose tubular aguda. Esta queda no fluxo de perfusão tubular pode indicar edema celular, ou obstrução tubular por agregados de células originados da descamação celular tubular como as observadas por Nörten em rim de ratos conservados e transplantados (167).

Estes achados, embora no túbulo isolado, teoricamente poderiam ser utilizados para explicar algumas das condutas e manobras bem estabelecidas em clínica para obter a melhor conservação renal no momento do transplante. Desta forma, por exemplo, para soluções iônicas hipotérmicas

utilizadas para lavagem do parênquima renal para conservação ficou estabelecido que a melhor altura para desenvolver a pressão hidrostática de perfusão seria 1 metro. Esta manobra embora empírica, poderia de alguma forma diminuir a pressão de filtração glomerular. Uma outra conclusão teórica destes experimentos "in vitro" seria a explicação da razão do porque não se utilizar soluções iônicas tipo Collins ou outras, em bombas pulsáteis, pois estas filtrariam por pressão a solução iônica provocando desta forma lesão do epitélio tubular. Para transpormos estes riscos, empiricamente passamos a utilizar em bombas pulsáteis soluções "plasma like" as quais estariam muito mais adaptadas para a filtração glomerular e ao "milieu" tubular.

Nossos resultados funcionais obtidos com esta técnica, mostram a necessidade de investigações mais detalhadas do efeito das soluções conservadoras diretamente sobre a camada epitelial dos segmentos do néfron.

Finalmente, estes estudos mostram as características dos vários compartimentos do rim que deveriam ser levados em consideração com a finalidade de se obter a melhor conservação do órgão.

### 3.5- RESUMO E CONCLUSÕES:

A análise dos resultados, do comportamento dos túbulos obtidos com estas manobras experimentais, que deram acesso a solução de Collins às diferentes vias de preservação da camada celular epitelial do túbulo contornado proximal de coelho, indicam que:

1-) Os estudos desenvolvidos sobre o contato direto da solução de Collins a 102C sobre uma das vias da camada delimitante de célula epitelial tubular, sugerem que a via peritubular é aquela que melhor preserva funcionalmente o túbulo contornado proximal.

2-) Ao que parece, existe uma heterogeneidade na sensibilidade da população de néfrons à preservação, avaliadas pelos comportamentos funcionais diferentes dos túbulos durante a exposição à solução de Collins.

Estes resultados funcionais encontrados com esta técnica, mostram que existe necessidade de investigações mais detalhadas do fenômeno de preservação nos diversos segmentos do néfron.

Pelas nossas evidências experimentais, podemos sugerir que o fenômeno de melhor preservação renal provavelmente poderá ser atingido, se não considerarmos na conservação, o rim como um todo, mas levarmos em conta os seus diversos compartimentos, quais sejam: o vascular e capilar, o intersticial, o nervoso e o linfático. Possivelmente, nesta linha de raciocínio, com estes estudos poder-se-á no futuro, aprimorar as técnicas de conservação para o transplante renal.

TABELA 1:

VALORES REPRESENTATIVOS DO GRUPO I QUE CONSISTE NO ESTUDO DO EFEITO CONSERVAÇÃO DIRETA COM A SOLUÇÃO DE COLLINS DO LADO PERITUBULAR EM TUBULOS CONTORNADOS PROXIMAIS DE COELHO PROVENIENTES DE FRAGMENTOS INJUNDO PRESERVADOS

| TEMPO DE PERFUSÃO<br>(min)        |         |         | VELOCIDADE DE PERFUSÃO<br>(ml/min) |           | J <sub>0</sub><br>(ml/min.mm) |            |
|-----------------------------------|---------|---------|------------------------------------|-----------|-------------------------------|------------|
| CONTROLE EXPERIMENTAL RECUPERAÇÃO |         |         | CONTROLE RECUPERAÇÃO               |           | CONTROLE RECUPERAÇÃO          |            |
| 71                                | 16      | 53      | 9,9                                | 15,5      | 1,37                          | 1,48       |
| 49                                | 19      | 54      | 13,6                               | 10,5      | 1,43                          | 0,91       |
| 73                                | 20      | 64      | 10,8                               | 10,9      | 0,66                          | 0,81       |
| 65                                | 20      | 54      | 13,7                               | 12,4      | 0,87                          | 0,61       |
| 48                                | 22      | 43      | 12,9                               | 15,2      | 2,36                          | 1,85       |
| 67                                | 20      | 67      | 10,0                               | 11,1      | 0,82                          | 0,85       |
| 50                                | 21      | 49      | 13,7                               | 15,1      | 0,57                          | 0,86       |
| $\bar{x}$ 60                      | 20      | 55      | 12,1                               | 13,0      | 1,15                          | 1,05       |
| $\pm 4$                           | $\pm 1$ | $\pm 3$ | $\pm 0,7$                          | $\pm 0,8$ | $\pm 0,24$                    | $\pm 0,17$ |

$\bar{x} \pm \text{EPM}$

\* Teste t pareado  $p < 0,05$

TABELA 2:

VALORES REPRESENTATIVOS DO GRUPO II QUE CONSISTE NO ESTUDO DO EFEITO SOLUÇÃO DE COLLINS DO LADO PERITUBULAR E PERFUSÃO LUMINAL ESTACIONÁRIA COM A MESMA SOLUÇÃO SOBRE TUBULOS CONTORNADOS PROXIMAIS DE COEL PROVENIENTES DE FRAGMENTOS NÃO PRESERVADOS. VALORES MÉDIOS INDIVIDUAIS PARÂMETROS FUNCIONAIS OBSERVADOS NO GRUPO II (N=6) NO PERÍODO CONTROLE RECUPERAÇÃO.

| TEMPO DE PERFUSÃO<br>(min) |                 |                 | VELOCIDADE DE PERFUSÃO<br>(nl/min) |                   | Jv<br>(nl/min)     |                  |
|----------------------------|-----------------|-----------------|------------------------------------|-------------------|--------------------|------------------|
| CONTROLE                   | EXPERIMENTAL    | RECUPERAÇÃO     | CONTROLE                           | RECUPERAÇÃO       | CONTROLE           | RECUPERAÇÃO      |
| 37                         | 27              | 49              | 17,5                               | 14,2              | 1,38               | 0,0              |
| 50                         | 27              | 47              | 23,7                               | 14,4              | 1,93               | 0,2              |
| 55                         | 26              | 53              | 15,4                               | 14,3              | 0,74               | 0,0              |
| 55                         | 28              | 52              | 15,1                               | 14,3              | 2,26               | 0,5              |
| 55                         | 28              | 48              | 12,6                               | 14,5              | 0,51               | 1,4              |
| 38                         | 27              | 50              | 18,2                               | 14,8              | 0,45               | 0,0              |
| $\bar{x}$ 48<br>$\pm 3,5$  | 27<br>$\pm 0,3$ | 50<br>$\pm 0,9$ | 17,0<br>$\pm 1,5$                  | 14,4<br>$\pm 0,1$ | 1,21<br>$\pm 0,31$ | 0,3<br>$\pm 0,2$ |

$\bar{x} \pm \text{EPM}$

\* teste t pareado,  $p < 0,05$

TABELA 3:

VALORES REPRESENTATIVOS DO GRUPO III QUE CONSISTE NO ESTUDO DA PERFUSÃO ESTACIONÁRIA COM SOLUÇÃO DE COLLINS DO LADO LUMINAL E COM UMA SOLUÇÃO SEMELHANTE AO PLASMA DO LADO PERITUBULAR SOBRE TUBULOS CONTORNADOS PROXIMAIS DE COELHO DE FRAGMENTOS NÃO PRESERVADOS.

| TEMPO DE PERFUSÃO<br>(min) |         | VELOCIDADE DE PERFUSÃO<br>(nl/min) |           | Jv<br>(nl/min.mm)    |            |            |
|----------------------------|---------|------------------------------------|-----------|----------------------|------------|------------|
| CONTROLE EXPERIMENTAL      |         | RECUPERAÇÃO                        |           | CONTROLE RECUPERAÇÃO |            |            |
| 41                         | 23      | 48                                 | 14,3      | 13,1                 | 0,43       | 0,40       |
| 52                         | 33      | 57                                 | 12,8      | 9,6                  | 0,83       | 0,00       |
| 44                         | 20      | 59                                 | 12,4      | 10,3                 | 0,43       | 0,31       |
| 51                         | 34      | 52                                 | 13,7      | 12,2                 | 1,33       | 0,00       |
| 53                         | 21      | 38                                 | 15,0      | 11,8                 | 1,15       | 0,00       |
| $\bar{x}$ 48               | 28      | 51                                 | 13,6      | 11,4*                | 0,83       | 0,14*      |
| $\pm 2$                    | $\pm 3$ | $\pm 4$                            | $\pm 0,5$ | $\pm 0,6$            | $\pm 0,18$ | $\pm 0,09$ |
| $\bar{x}$                  | ±EPM    |                                    |           |                      |            |            |

\* Teste t pareado  $p < 0,05$

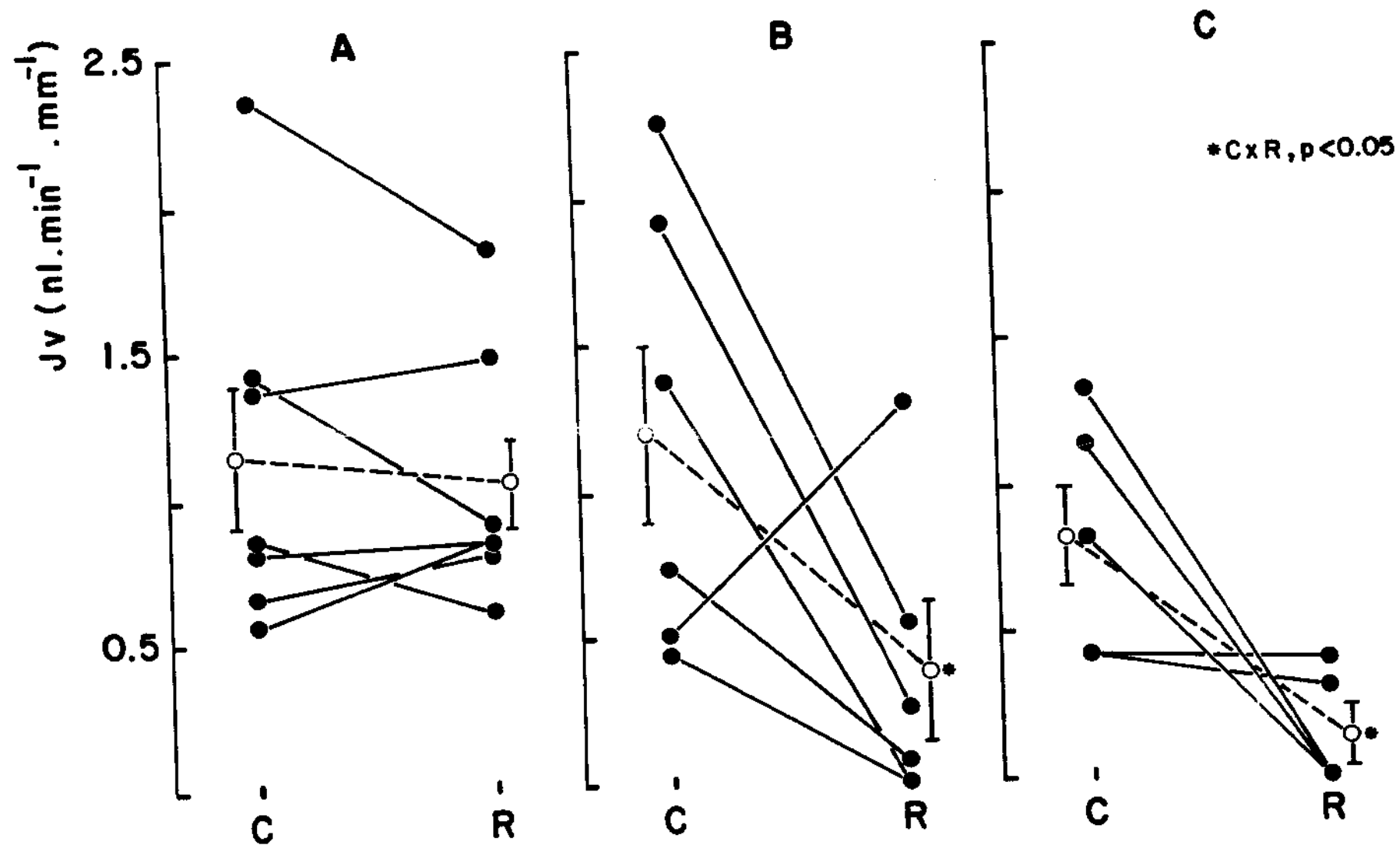


GRÁFICO 1 - VALORES INDIVIDUAIS E MÉDIOS DO EFEITO DA SOLUÇÃO DE COLLINS A 10 C SOBRE A ABSORÇÃO DE FLUIDO ( $J_v$ ) DE TÚBULOS CONTORNADOS PROXIMAIS QUANDO ADICIONADA DO(S) LADO(S): (A) PERITUBULAR; (B) PERITUBULAR E LUMINAL; (C) LUMINAL.



- 4- ASPECTOS FUNCIONAIS DA PARS RECTA (SEGMENTO P3)  
SUBMETIDO A SOLUÇÕES CONSERVADORAS COM MAGNÉSIO  
(COLLINS) E SEM MAGNÉSIO (EURO COLLINS).

#### 4.1- INTRODUÇÃO:

Normalmente no transplante renal são utilizadas soluções isotônicas ou discretamente hipertônicas , que podem apresentar uma composição iônica semelhante ao meio intracelular (60,62).

A eficiência destas soluções em preservar o rim, no caso a de Collins, parece ser a presença de solutos pouco permeáveis à membrana que previne a formação do edema. A alta concentração de magnésio, ao que parece, serve para proteger a célula da perda tanto do magnésio como de potássio por inibição do metabolismo celular, além de possuir potente ação conservadora e vasodilatadora (23,155).

No entanto, ainda existem muitas controvérsias quanto ao aspecto da composição iônica destas soluções. Uma delas é o uso do magnésio nestas soluções, o qual pode trazer problemas por causar a formação de precipitados em forma de cristais, que podem danificar o parênquima renal. Assim, surgiu uma variante da solução de Collins, o Euro Collins, na qual não se adiciona o sulfato de magnésio, sendo que esta solução também é eficaz na preservação renal e utilizada na rotina clínica (65,72).

Diante destas observações, resolvemos estudar a eficiência das diferentes soluções de conservação sobre a viabilidade renal, utilizando-se as soluções de Collins e Iuro-Collins (Collins sem magnésio), avaliando a função do segmentos de néfrons isolados pela técnica de microperfusão.

Assim, estudos realizados em nosso laboratório e em outros, foi observado que a técnica de microperfusão do túbulo isolado "in vitro" é um instrumento útil para avaliar a eficiência do uso de diferentes métodos e soluções preservadoras diretamente sobre a estrutura e função de diferentes segmentos do néfron (77,78,83,179).

Nestas condições, escolhemos para o desenvolvimento deste estudo, o segmento pars recta (P3) do túbulo proximal, por ser este um dos segmentos do néfron mais suscetível à ação da preservação, e o local onde mais ocorre o fenômeno da necrose tubular aguda (NTA), durante os processos de preservação.

Considerando que trabalhos recentes são controversos na demonstração de que a ausência ou a presença de magnésio na solução de Collins, seria importante na preservação celular, resolvemos observar diretamente a ação do magnésio sobre este segmento do túbulo contornado proximal (TCP).

#### 4.2- MATERIAL E MÉTODOS:

Como na parte I, inicialmente, o coelho é sacrificado por deslocamento cervical e o rim é rapidamente removido e descapsulado e então cortado em fatias finas de aproximadamente 1mm de espessura verticais à cortex. Alguns fragmentos são colocados numa placa de Petri contendo uma solução semelhante ao plasma a 10% . A seguir isola-se um túbulo cuja característica é ser reto e preceder os segmentos P2 e P1 que são contornados . Após o túbulo ser dissecado e transferido para a câmara de perfusão, procede-se a microp perfusão como na descrição anterior (Parte 3.2) para túbulos em geral.

A composição das soluções utilizadas são as seguintes:

A-) COMPOSIÇÃO DO BANHO E ULTRAFILTRADO: CONTROLE  
(Semelhante ao Plasma)

|                                        |                              |
|----------------------------------------|------------------------------|
| NaCl.....                              | 105 mM                       |
| NaHCO <sub>3</sub> .....               | 25 mM                        |
| NaAc.....                              | 10 mM                        |
| KCl.....                               | 4,84 mM                      |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ..... | 0,92 mM                      |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....  | 0,60 mM                      |
| MgSO <sub>4</sub> .....                | 0,81 mM                      |
| CaCl <sub>2</sub> .....                | 1,97 mM                      |
| Alanina.....                           | 5,0 mM                       |
| Glicose.....                           | 8,0 mM                       |
| Albumina Bovina.....                   | 6,5g/dl                      |
| Osmolaridade -                         | 290 mOsm/Kg H <sub>2</sub> O |
| pH :                                   | 7,40                         |

B-) COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES EXPERIMENTAIS:

1-) COLLINS:

|                                       |                              |
|---------------------------------------|------------------------------|
| NaHCO <sub>3</sub> .....              | 10 mM                        |
| KCl.....                              | 15 mM                        |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ..... | 15 mM                        |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ..... | 40 mM                        |
| MgSO <sub>4</sub> .....               | 28 mM                        |
| Glicose.....                          | 139 mM                       |
| Osmolaridade :                        | 330 mOsm/Kg H <sub>2</sub> O |
| pH =                                  | 7,0                          |

### 2- ) EURO-COLLINS:

Mesma fórmula do Collins com ausência de  $MgSO_4$

Osmolaridade : 320 mOsm/Kg  $H_2O$

pH = 7,0

### PROTOCOLO EXPERIMENTAL :

A seguir os túbulos foram divididos em dois grupos:

**Grupo I-** Pars recta (P3) dissecados de fragmentos frescos após um período controle, conservados "in vitro" sem perfusão pelo lado peritubular com a solução de Collins (com magnésio) por aproximadamente 30 minutos a 10°C, após o qual segue-se um período de recuperação.

**Grupo II-** Pars recta (P3) dissecados de fragmentos frescos, são submetidos a um período controle, conservados "in vitro" sem perfusão pelo lado peritubular com a solução de Euro-Collins (Collins sem magnésio) por 30 minutos a 10°C, após o qual segue-se um período de recuperação.

Estes grupos experimentais foram submetidos a análise estatística utilizando-se o teste t de Student (pareado e não pareado) com nível de significancia maior que 95% (248).

#### 4.3- RESULTADOS:

Na tabela 1 estão representados os valores individuais e suas respectivas médias e erro padrão da média dos parâmetros funcionais de pars recta (P3) provenientes de fragmentos não preservados, dissecados em uma solução semelhante ao plasma (Krebs Henseleit modificado) à 42°C e perfundidos com a mesma solução a 37°C com gaseificação, onde foram obtidas amostras no período controle e após preservação por aproximadamente 30 minutos na solução de Collins com magnésio a 42°C, seguida de amostras no período de recuperação.

Neste grupo de túbulos (n=5), encontramos no período controle uma absorção de fluido (Jv) de  $0,64 \pm 0,09$  ml/min.mm quando os túbulos foram perfundidos a uma velocidade de  $6,7 \pm 0,3$  nl/min com um tempo de perfusão após equilíbrio de  $71 \pm 3$  minutos.

Após a conservação em Collins (com magnésio) seguiu-se um período de recuperação em que verificamos uma absorção de fluido (Jv) de  $0,58 \pm 0,11$  nl/min. mm com uma velocidade de perfusão de  $7,3 \pm 0,7$  nl/min com um tempo de perfusão após equilíbrio de  $35 \pm 2$  minutos.

Não existe neste grupo diferença estatística entre velocidade de perfusão e absorção de fluido pré e pós conservação com a solução de Collins.

Na tabela 2 estão representados os valores de segmentos de pars recta (P3) submetidos as mesmas condições

experimentais que os da **tabela 1** diferindo apenas na conservação em que utilizamos Collins (sem magnésio) = Euro-Collins.

Neste grupo de túbulos, encontramos no período controle uma absorção de fluido (Jo) de  $0,49 \pm 0,14$  nl/ min. mm com uma velocidade de perfusão de  $5,6$  nl/ min. mm com um tempo de perfusão de  $70 \pm 6$  minutos.

Após o período de conservação no Euro-Collins (Collins sem magnésio) por aproximadamente 30 minutos seguiu-se um período de recuperação.

Na recuperação observamos uma absorção de fluido (Jo) de  $0,52 \pm 0,12$  nl/ min. mm com uma velocidade de perfusão de  $6,1 \pm 0,5$  nl/min, com um tempo de perfusão de  $41 \pm 4$  minutos.

Não houve variações estatisticamente significantes entre velocidade de perfusão e absorção de fluido neste grupo para os dois períodos.

Além disto também não houve variações significantes entre os parâmetros do grupo 1 e do grupo 2.

Como podemos observar a solução de Collins e o Euro Collins tem a mesma propriedade conservadora medidas pela absorção de fluido na pars recta (P3) em ambos os grupos.



#### 4.4- DISCUSSÃO:

No transplante renal e na técnica de investigação utilizando a microperfusão isolada do túbulo renal "in vitro", o tecido renal é esfriado e armazenado, por período variável e espera-se que funcione adequadamente o órgão ou o túbulo após perfusão quando colocado em condições normotérmicas.

O nosso Laboratório, pioneiramente e depois outros investigadores relataram de formas diferentes a conservação por soluções eletrolíticas da camada epitelial renal com a técnica da microperfusão isolada do túbulo "in vitro", avaliando a função do túbulo diretamente conservado na câmara ou dissecado do rim após conservação (77,79,83). Nestes trabalhos, demonstrou-se que a absorção de fluido (sódio e água), o potencial transepitelial e o cotransporte glicose e alanina estão mantidos para o túbulo contornado proximal (178), sendo a via peritubular o melhor local para a solução de Collins entrar em contacto em termos de conservação para deste segmento do nefron (83).

No presente trabalho procuramos verificar o que acontece com o segmento P3 do túbulo proximal (Fars recta) após a manobra de conservação direta pelo lado peritubular com a solução de Collins (C2) e Euro-Collins, sendo como parâmetro funcional a absorção de fluido.

Além disto, a técnica de perfusão isolada do túbulo renal "in vitro" permite observações detalhadas de

propriedades específicas dos segmentos do néfron, tais como, variações morfológicas dinâmicas, edema e descamação da camada epitelial renal (83,175).

A escolha do lado peritubular da camada epitelial da pars recta para conservação se deve ao fato de que em trabalhos anteriores, demonstramos como citado acima que este é o local do néfron que melhor se comporta funcionalmente quando submetido a conservação com a solução de Collins (83).

Neste estudo, utilizamos a conservação direta do segmento tubular (P3) na câmara de perfusão. A vantagem da conservação direta do túbulo renal na câmara é que eliminamos a possibilidade do fator sorteio, pois o túbulo é dissecado, submetido ao período controle, conservado sem gaseificação a 10°C e depois submetido ao período de recuperação (83) em condições de normotermia e aerobiose. No entanto outros investigadores, perfundem primeiramente o rim com a solução conservadora e depois retiram o túbulo do fragmento e avaliam imediatamente parâmetros funcionais do túbulo conservado com a mesma técnica (178, 179).

Estas técnicas, independentemente da forma de se conservar néfron, nos fornecem de forma objetiva, a descrição dinâmica das alterações celulares que podem estar envoltas na necrose tubular aguda (NTA) durante a conservação e os possíveis fatores intercorrentes. Além disto esta técnica permite o estudo do túbulo renal na ausência de fatores vasculares e outros, intra e extrarrenais.

O segmento P3 (pars recta) foi o escolhido por se tratar de um túbulo com alta taxa de metabolismo aeróbico o que o torna sensível a anoxia e consequentemente a NTA (77,101,239).

Assim, embora possa existir heterogeneidade na população de néfrons com relação a ação das soluções conservadoras, este segmento pode ser um dos mais sensíveis, e se constituiria em um indicador adequado como detector da eficiência de soluções conservadoras.

Sabe-se que a absorção de fluido no túbulo proximal (segmentos P1, P2 e P3) é dependente de um complexo transporte de sódio transepitelial que depende da extrusão de sódio através da assim chamada "membrana basolateral" pela enzima Na - K ATPase (48,49,137).

Em condições controles de acordo com a literatura o segmento P3 estudado (Pars recta) absorve fluido entre valores de 0,42 a 0,62 nl/ min/mm.

Com relação aos resultados, nas nossas condições experimentais, os túbulos conservados em Collins ou Euro-Collins por aproximadamente 30 minutos apresentaram valores de absorção de fluido semelhantes e de acordo com a literatura. Estes resultados indicam que para estas condições a presença ou ausência do magnésio não influi na absorção de fluido para este segmento do túbulo proximal.

Por outro lado investigadores utilizando variantes desta técnica, isto é coletando túbulos provenientes de rim global perfundido com Collins e Euro-

Collins observaram em segmentos (P1, P2) e não em P3 (Pars recta) , que ocorrem danos celulares importantes com descamação de células intratubulares e vazamento importante do marcador de volume, do lumen para o banho, sendo estas alterações proporcionais ao tempo de conservação. Neste trabalho mostram também para estes segmentos do néfron(P1, P2) que o Euro-Collins (Collins sem magnésio) mostrou-se mais efetivo quando comparado com o Collins (com magnésio) por até 48 horas (179).

Assim nas nossas condições experimentais, isto é trabalhando com o túbulo conservado diretamente na câmara de perfusão, tanto para os segmentos P1 e P2 como para o segmento P3 (pars recta) não observamos para conservação de até 30 minutos, variações na absorção de fluido (JV), nas características morfológicas, assim como no vazamento de inulina lumen-banho (vazamento menor que 5%). Cumpre novamente salientar que estes túbulos foram conservados na câmara de perfusão apenas pelo lado peritubular com a solução de Collins nos segmentos P1 e P2 e com as soluções de Collins e Euro-Collins no segmento P3 (Pars recta).

Acreditamos, que os achados de outros investigadores, mostrando diferenças de comportamento para as soluções Collins e Euro-Collins nos segmentos P1 e P2, talvez se deva ao fato deles terem perfundido o rim total e só depois retirado o túbulo para a perfusão. Neste tipo de procedimento, o rim total é perfundido com as soluções eletrolíticas a frio, retira-se um fragmento, dissecar-se um

túbulo que vai ser perfundido. Embora esta manobra esteja mais próxima do transplante clínico, nestas condições poderiam ocorrer os seguintes artefatos técnicos:

1-) As soluções conservadoras podem não alcançar de forma uniforme todo o parênquima renal.

2-) As soluções conservadoras pela sua constituição química (sem magnésio), podem ter distribuição diferente pelos constituintes do parênquima renal, isto é, os diversos compartimentos quais sejam o lado luminal e peritubular do néfron, o vascular e o intersticial, considerando apenas a ação vasodilatadora do magnésio (246,247).

3-) Durante o processo de dissecação do túbulo, de acordo com o item acima poderia propiciar a possibilidade da seleção do melhor túbulo ou seja daquele que a solução conservante conseguiu alcançá-lo ou não no parênquima renal e exercer as suas propriedades conservadoras.

4-) Por característica da solução no aspecto conservação ela não propiciou ao investigador o "melhor" túbulo no momento da dissecação e perfusão.

5-) Por não existir ainda estudos do comportamento da distribuição química e térmica no parênquima renal das soluções conservadoras, poderia dependendo dos constituintes da solução, variar fluxo das soluções ou sanguíneo e conseqüentemente a temperatura da cortex para a medula, fornecendo túbulos metabolicamente funcionante mas ineficiente pela anaerobiose.

6-) Outro fator que poderia influenciar a conservação do parênquima, seria as variações bioquímicas celulares que poderiam inativar ou alterar propriedades conservadoras da solução.

7-) Durante a conservação do rim global poderia ocorrer também filtração glomerular da solução conservadora rica em potássio e magnésio, o que levaria, conforme demonstrado no trabalho anterior a uma lesão importante da célula epitelial pelo lado luminal (83).

Baseado nestes possíveis aspectos existem diferentes estudos publicados pelo nosso grupo sobre a distribuição de algumas soluções conservadoras, como a de Collins. Nestes estudos, utilizando a técnica de Hanssen observamos que existe uma certa irregularidade na distribuição da solução no parênquima renal. Este achado pode indicar que as soluções conservadoras atuais podem não proteger totalmente a população de néfrons, mas que para efeito clínico não seria detectável pelas medidas atuais de clearance global (168).

Estes dados colocados em conjunto, poderiam de certa forma explicar porque os resultados são diferentes, quando se comparam néfrons obtidos do rim perfundido, com néfrons diretamente conservado na câmara de perfusão, apenas pelo lado peritubular, de acordo com o nosso protocolo experimental.

Nas nossas condições experimentais, não existem diferenças de conservação por 30 minutos entre Collins e

Euro-Collins, sobre a função do segmento P3 (pars recta) no túbulo isolado de coelho.

Desta forma, sabendo-se que na solução de Collins existe  $\text{HPO}_4^{--}$ , que na presença de magnésio poderia precipitar fosfato de magnésio ( $\text{MgHPO}_4$ ) estes cristais poderiam se constituir na reperfusão do rim, numa agressão mecânica aos vasos renais e ao próprio túbulo. Assim, nestas condições de conservação achamos que o Euro Collins como solução mais simples deveria ser utilizada na racionalização do transplante clínico de doador vivo, ou para tempo curto de conservação para doador cadáver. (203, 210).

Por outro lado para conservação mais prolongada ainda há a necessidade de se verificar se existem diferenças por esta técnica e por outras entre estas duas soluções.

#### 4.5- CONCLUSÕES:

I-) A microperfusão isolada "in vitro" pode se constituir numa técnica importante para medir diretamente a eficiência de uma solução conservadora.

II-) A técnica da conservação tubular, diretamente na câmara de perfusão com soluções conservadoras pode ser importante para "screening" de soluções conservadoras pela verificação de variações funcionais e morfológicas direta da solução sobre a camada epitelial onde ocorre durante a conservação, o quadro de necrose tubular aguda (NTA).

III-) Os nossos achados podem indicar que o Euro-Collins no momento pode substituir o Collins para conservação de curto prazo.

IV-) Existe necessidade de verificar ainda por esta técnica se existem diferenças entre estas soluções para conservação mais prolongada (trabalho em andamento).

V-) Estes achados não excluem de forma alguma a possibilidade que outras estruturas do parênquima renal estejam envolvidas numa boa conservação do órgão. (Ex. endotélio capilar, interstício, sistema nervoso autônomo e outras estruturas do néfron.



Tabela 1:

VALORES REPRESENTATIVOS DA FUNÇÃO DE PARS RECTA (P3), GRUPO 01 ( n=5 ),  
 CONSERVADAS DIRETAMENTE DO LADO PERITUBULAR COM A SOLUÇÃO DE COLLINS  
 (COM  $Mg SO_4$ ) .

| TEMPO DE PERFUSÃO<br>(min) |         | VELOCIDADE DE PERFUSÃO<br>(nl/min) |             | ABSORÇÃO DE FLUIDO<br>(Jv = nl/min.mm) |             |
|----------------------------|---------|------------------------------------|-------------|----------------------------------------|-------------|
| CONTROLE RECUPERAÇÃO       |         | CONTROLE                           | RECUPERAÇÃO | CONTROLE                               | RECUPERAÇÃO |
| 69                         | 30      | 5,9                                | 6,8         | 0,42                                   | 0,54        |
| 75                         | 28      | 7,0                                | 10,0        | 0,76                                   | 1,01        |
| 58                         | 35      | 6,5                                | 6,3         | 0,46                                   | 0,48        |
| 74                         | 38      | 6,3                                | 7,1         | 0,68                                   | 0,52        |
| 76                         | 41      | 7,9                                | 6,5         | 0,89                                   | 0,38        |
| 71                         | 35      | 6,7                                | 7,3         | 0,64                                   | 0,58        |
| $\pm 3$                    | $\pm 2$ | $\pm 0,3$                          | $\pm 0,7$   | $\pm 0,09$                             | $\pm 0,11$  |

$\bar{x} \pm EPM$

n = 5

Teste t pareado ( $p > 0,05$ ), Controle x Recuperação .

Tabela 2:

VALORES REPRESENTATIVOS DA FUNÇÃO DE PARS RECTA (PS), GRUPO 02 ( N=5 ), CONSERVADAS DIRETAMENTE DO LADO PERITUBULAR COM A SOLUÇÃO DE COLLINS SEM MgSO<sub>4</sub>.

| TEMPO DE PERFUSÃO<br>(min) |         | VELOCIDADE DE PERFUSÃO<br>(nl/min) |           | ABSORÇÃO DE FLUIDO<br>(Jv = nl/min.mm) |            |
|----------------------------|---------|------------------------------------|-----------|----------------------------------------|------------|
| CONTROLE RECUPERAÇÃO       |         | CONTROLE RECUPERAÇÃO               |           | CONTROLE RECUPERAÇÃO                   |            |
| 55                         | 40      | 7,0                                | 6,9       | 0,27                                   | 0,29       |
| 82                         | 53      | 4,6                                | 5,3       | 0,82                                   | 0,75       |
| 73                         | 42      | 5,2                                | 6,3       | 0,10                                   | 0,20       |
| 56                         | 28      | 6,6                                | 7,5       | 0,50                                   | 0,59       |
| 83                         | 44      | 4,5                                | 4,5       | 0,77                                   | 0,76       |
| 70                         | 41      | 5,6                                | 6,1       | 0,49                                   | 0,52       |
| $\pm 6$                    | $\pm 4$ | $\pm 0,5$                          | $\pm 0,5$ | $\pm 0,14$                             | $\pm 0,12$ |

$\bar{x} \pm \text{EPM}$

n = 5

Teste t pareado (p>0,05), Controle x Recuperação

Teste t não pareado (p>0,05): Grupo 1 x Grupo 2.

5- EFEITO DAS SOLUÇÕES CONSERVADORAS DE COLLINS COM E SEM  
MAGNÉSIO NO TUBULO COLETOR CORTICAL DE COELHO  
ISOLADO E PERFUNDIDO "IN VITRO".

### 5.1- INTRODUÇÃO

Considerando os aspectos complexos da conservação e os poucos conhecimentos existentes no campo tecidual e celular renal seria interessante estudar a ação direta da hipotermia e das soluções conservadoras sobre o epitélio de outros túbulos renais. Isto se deve ao fato de que a função ou lesão tubular é raramente testada na rotina clínica no pós transplante e pouco se sabe a respeito da função tubular pós conservação (9,104,166,183). Alguns estudos originais nesta área, foram desenvolvidos por Figueiredo & Falkenstein (77,83,84, ), Oishi (168) , Pirie e col.(178,179) , Ribeiro (184,185) e Helou (106) que utilizando a técnica da microperfusão de túbulo isolado "in vitro" ou estudos enzimáticos de fragmentos renais, mediram a função de túbulos proximais de coelho e ductos papilares de rato após diversas manobras de conservação com diferentes soluções conservadoras.

Considerando-se que a susceptibilidade e as respostas morfológicas e funcionais à isquemia são diferentes nos diversos segmentos do néfron (42,101,104), existe ainda a necessidade de estudos complementares da ação da conservação à frio neste segmentos . Assim, após o transplante renal clínico ou experimental , vários defeitos tubulares renais podem ser detectados, entre eles a diminuição da capacidade de concentração e de acidificação urinária, assim como da reabsorção de fosfato, bicarbonato,

magnésio, aminoácidos, ácido úrico e glicose . Nestas condições, ocorre com frequência uma poliúria nas primeiras horas pós transplante renal, a qual gera cuidados com o monitoramento do balanço hídrico e eletrolítico do paciente. A causa desta diurese elevada ainda não é conhecida e poderia estar relacionada com a expansão do volume extracelular pré operatória; a natriurese de desnervação; a uma diurese osmótica por uréia; uma alteração na reabsorção de fluido nos túbulos proximais ou ainda a uma alteração da reabsorção de água no túbulo coletor (108,183).

O túbulo distal e coletor é raramente avaliado na prática clínica por não estar diretamente envolvido, no radiocínio clínico e experimental por exemplo, no que se refere a necrose tubular aguda como ocorre com o túbulo proximal. As duas principais funções testadas em clínica em relação a esta porção do néfron é a secreção de íons hidrogênio e a reabsorção de água que quando alterada leva a uma acidose e/ou poliúria (166).

Durante as últimas duas décadas tem aumentado muito os conhecimentos relativos à estrutura e função dos vários segmentos do néfron e do sistema de ductos coletores . Em 1951, Homer Smith afirmava que o ducto coletor não tinha uma função especializada exceto a de servir como um condutor do fluido tubular (99). Com o desenvolvimento da técnica de microperfusão de túbulo isolado (47) , da técnica de localização específica de receptores hormonais tubulares (162,165,198,199) e de estudos detalhados da ultraestrutura

morfológica da célula tubular (52,126,151), verificou-se que o túbulo coletor não era um segmento com características morfológicas e funcionais uniformes. Este túbulo divide-se em quatro segmentos diferentes baseados na sua localização e função. Nestes estudos observou-se ainda que o túbulo coletor cortical era composto por uma população heterogênea de células, as células principais e as intercaladas (61,68). O túbulo coletor está relacionado com o reajuste fino da reabsorção e secreção de vários íons. Este túbulo reabsorve sódio, cloreto, bicarbonato e secreta potássio, hidrogênio, bicarbonato e amônia conforme as necessidades do organismo (135,139,232).

Além disso, os vários segmentos do túbulo coletor desempenham papéis importantes e interessantes no mecanismo de concentração urinária e na homeostase hídrica do organismo. O epitélio do túbulo coletor é responsivo à vasopressina e portanto desempenha um papel fundamental na concentração e diluição urinária (106,137,151). Sob a influência da vasopressina o epitélio torna-se permeável à água o que permite a formação de uma urina concentrada. A resposta à vasopressina à 37°C ocorre dentro de minutos e também é revertida em questão de minutos quando é retirada do meio. Este hormônio se liga aos receptores da membrana basal enquanto que a sua ação se dá na permeabilidade da membrana apical. A vasopressina age estimulando a produção intracelular de monofosfato 3' 5' adenosina cíclica (AMPC) que através de uma complexa via de substâncias

intracelulares conduz à fusão de agregados de partículas na membrana apical, sendo que estes agregados de partículas incluem minúsculos canais de água, vide figura 1 (1,14,92,106,164). Um grande número de substâncias químicas tem demonstrado alterar a resposta celular à vasopressina, entre eles estão as prostaglandinas E2, o cálcio, a proteína quinase C, a aldosterona, certos amino ácidos, o GMPc, a noradrenalina, o lítio, a acetilcolina, a calmodulina, a bradicinina, a somatostatina, o fator natriurético atrial, a toxina da cólera, a toxina Pertussis, a citochalassina B, a colchicina, a endotelina (1,106,165,169).

Assim, levando em conta todas estas características da conservação hipotérmica e do túbulo coletor cortical e dando continuidade aos nossos estudos de "mapeamento" funcional pós conservação, dos diversos segmentos do néfron através da técnica da microperfusão de túbulo isolado "in vitro", resolvemos estudar a ação de soluções conservadoras sobre o epitélio tubular deste segmento do néfron. Por outro lado, sabendo-se da controvérsia que existe a respeito do uso do íon magnésio nestas soluções e que a solução conservadora de Collins com e sem (Euro-Collins) a adição deste cátion é amplamente utilizada nos centros clínicos de transplante; procuramos testar o efeito desta duas soluções sobre a conservação da viabilidade funcional do epitélio do túbulo coletor cortical de coelho submetidos à diversas manobras experimentais.

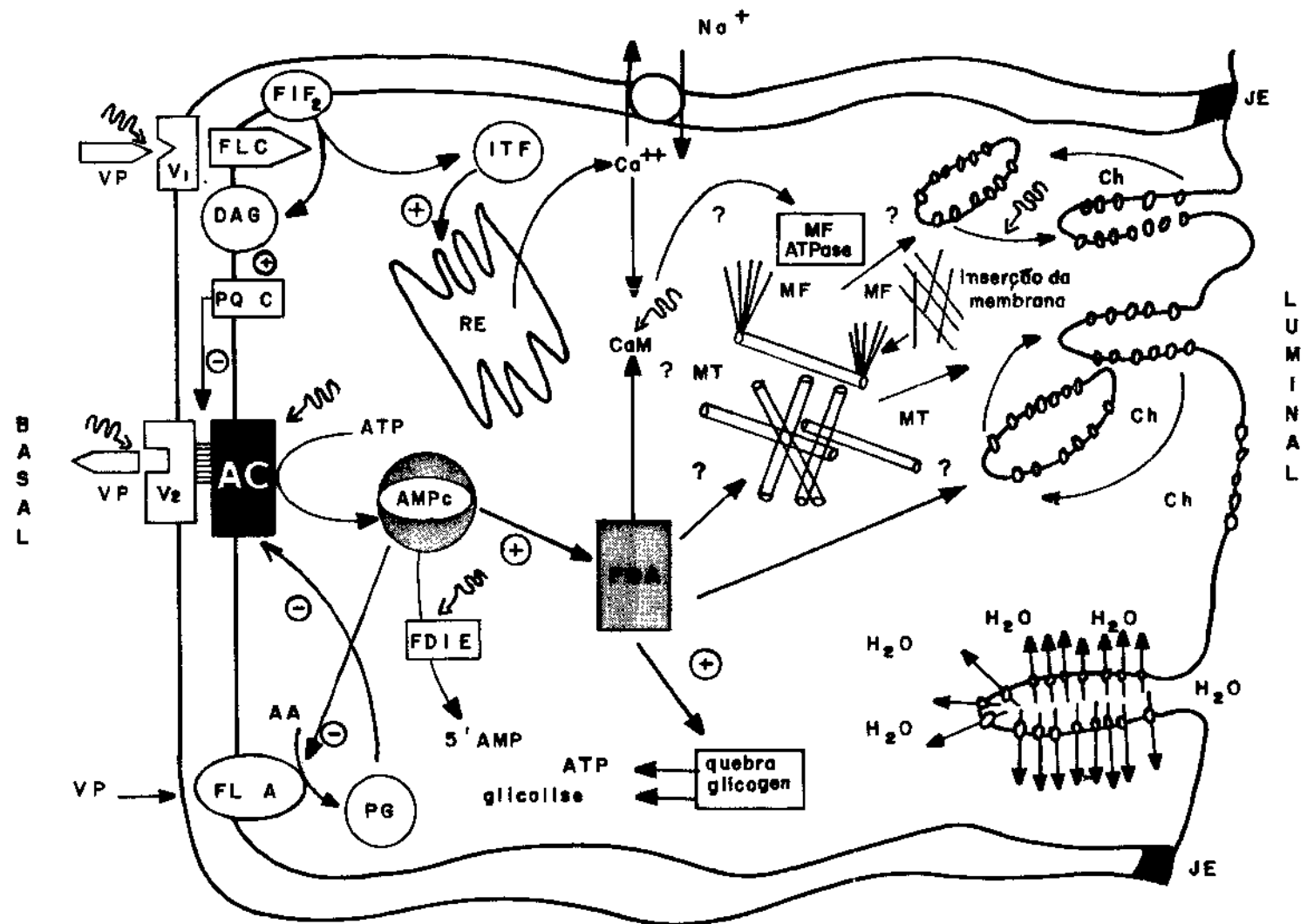


FIGURA 1 - MODELO HIPOTÉTICO DOS EVENTOS CELULARES ENVOLVIDOS NA AÇÃO DA AVP SOBRE A RESPOSTA HIDROSMÓTICA EM EPITÉLIOS E AS POSSÍVEIS VIAS DE AÇÃO DO  $MgSO_4$ .

FIGURA REPRODUZIDA DE ABRAMOW, M. E COL. (1).



## 5.2- MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos de conservação tubular renal foram desenvolvidos através da técnica da microperfusão de túbulos isolados "in vitro" descrita por Burg e colaboradores em 1966 (47), Horster e col. em 1984 (112) e modificada por Figueiredo e col. (83). Vide a descrição da técnica na parte 3.2. Nestas condições separa-se um túbulo coletor cortical de finas estrias corticoyuxtamedulares de rins de coelho e o adapta ao sistema de microperfusão para iniciar os estudos controles e de conservação tubular "in vitro".

### COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO BANHANTE E PERFUSORA:

A solução utilizada para dissecar e banhar o túbulo coletor cortical de coelho consiste de um Ringer-bicarbonato modificado com a seguinte composição: Na Cl 105 mM, Na HCO<sub>3</sub> 25 mM, Na C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 10 mM, Na H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,3 mM, K Cl 5 mM, Mg SO<sub>4</sub> 1 mM, Ca Cl<sub>2</sub> 1,8 mM, glicose 8,3 mM e alanina 5 mM. A osmolalidade desta solução é de  $286 \pm 4$  mOsmoles/Kg H<sub>2</sub>O e foi medida pelo ponto de congelamento num osmômetro Advance mod. 3WII. O pH desta solução é de 7,38 após a gaseificação com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>.

Para os estudos de condutividade hidráulica à água utiliza-se um perfusato hipotônico com a mesma composição da solução banhante com exceção do Na Cl que é diminuído para 15 mM. Este perfusato apresenta uma osmolalidade de  $126 \pm 5$  mOsmoles/ Kg H<sub>2</sub>O e um pH de 7,38. A este perfusato é

adicionado 5 a 10  $\mu\text{Ci/ml}$  de  $^{14}\text{C}$ -Carboxi-inulina (New England Nuclear) que serve como marcador de volume para as medidas diretas da absorção de fluido tubular e condutividade hidráulica.

A avaliação dos parâmetros funcionais de condutividade hidráulica são realizadas através das medidas das amostras coletadas num período basal (que serve como controle da integridade da preparação) e no período após a adição de 200  $\mu\text{UI/ml}$ , que equivale a concentração de 460 picomolar (pM), de arginina-vasopressina (Parke Davis ou Sigma Co.) à solução banhante peritubular (5).

#### MEDIDAS DE CONDUTIVIDADE HIDRÁULICA:

A condutividade hidráulica ( $L_p = 10^{-7} \text{ cm/seg.atm}$ ) é a medida de permeabilidade à água de um epitélio quando se impõem um gradiente osmótico entre a solução banhante (isotônica) e a solução perfusora (hipotônica) e é calculada pela fórmula desenvolvida por DuBois em 1976 (73):

$$L_p = \frac{V_i \cdot C_i}{R \cdot T \cdot A} \left[ \frac{C_i - C_o + \frac{1}{C_b} \cdot \ln \frac{(C_o - C_b) \cdot C_i}{C_i \cdot C_o \cdot C_b}}{(C_b)^2} \cdot \frac{(C_i - C_b) \cdot C_o}{(C_i - C_b) \cdot C_o} \right]$$

onde:

**R** é a constante universal dos gases.

**T** é a temperatura absoluta em graus  $^{\circ}\text{K}$ .

**A** é a área do túbulo perfundido ( $\text{cm}^2$ ), que é obtida através da medida do comprimento e do diâmetro tubular no final do experimento através de um micrômetro adaptado na ocular do microscópio.

**Vi** é o fluxo infundido ( $\text{cm}^3/\text{seg}$ ), calculado através da razão de  $[(14\text{C-inulina}) \text{ coletada}/(14\text{C-inulina}) \text{ perfundida}] \times \text{Vo}$ .

**Vo** é o volume da amostra coletada num determinado período de tempo ( $\text{cm}^3/\text{seg}$ ).

**Ci** é a osmolaridade da solução perfusora (atm).

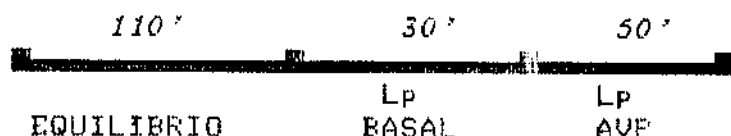
**Co** é a osmolaridade da solução coletada, calculada à partir da razão  $[(14\text{C-inulina}) \text{ coletada}/(14\text{C-inulina}) \text{ perfundida}] \times \text{Ci}(\text{atm})$ .

**Cb** é a osmolaridade da solução banhante (atm).

#### PROTÓCOLOS EXPERIMENTAIS:

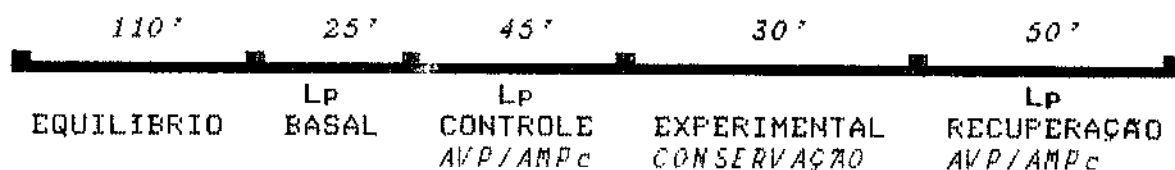
Com esta preparação foram estudados um grupo controle, para as nossas condições experimentais, e quatro grupos experimentais de acordo com o protocolo de conservação "in vitro" desenvolvido:

# I - ESTUDOS CONTROLES EM CONDIÇÕES NORMOTÉRMICAS



Grupo Controle (n=21) - Túbulos coletores corticais (TCCs) provenientes de fragmentos renais de coelho foram banhados e perfundidos com Ringer-bicarbonato (RB) isosmótico e hiposmótico respectivamente, gaseificados com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub> à 37°C. Nestas condições, após um período de equilíbrio de aproximadamente 110 minutos, cronometrados a partir da morte do animal e incluindo o período de dissecação à 4°C e de perfusão à 37°C, foram coletadas 3 amostras do período basal. A seguir adicionou-se ao banho peritubular 200 uU/ml de arginina vasopressina (AVP) e estudou-se a condutividade hidráulica (Lp) durante aproximadamente 50 minutos.

## II- ESTUDOS DE CONSERVAÇÃO TUBULAR APÓS UM PERÍODO CONTROLE COM ESTIMULAÇÃO HORMONAL



Neste protocolo experimental, os TCCs foram banhados e perfundidos como no grupo controle seguidos de um período de equilíbrio de 110 minutos, um período basal e um período controle com estimulação hormonal de AVP. Após este período controle passou-se para o período experimental no qual efetuou-se a preservação com a solução conservadora do lado peritubular à 10°C, sem gaseificação e sem perfusão tubular, durante 30 min. . A seguir, no período de recuperação voltou-se a perfundir os túbulos com Ringer-bicarbonato à 37°C mais estimulação hormonal. Os grupos experimentais desenvolvidos neste protocolo foram:

Grupo I (n=5) - TCCs foram conservados com Ringer-bicarbonato (RB) à 10°C, do lado peritubular. No período controle e de recuperação foram estimulados com AVP.

Grupo II (n=5) - TCCs foram conservados com solução de Collins (contendo Mg SO<sub>4</sub>) à 10°C do lado peritubular. No período controle e de recuperação foram estimulados com AVP.

Grupo III (n=4) - TCCs foram conservados com solução de Collins (contendo Mg SO<sub>4</sub>) à 10°C, do lado peritubular. No período controle e de recuperação foram estimulados com AMPcíclico (CB-(4-chlorophenylthio) adenosine 3': 5' cyclic monophosphate), Sigma) 10<sup>-4</sup> M.

Grupo IV (n=6) - TCCs foram conservados com solução de Euro-Collins (sem Mg SO<sub>4</sub>) à 10°C, do lado peritubular. No período controle e de recuperação foram estimulados com AVP.

### COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES CONSERVADORAS

**Solução de Ringer bicarbonato (RB):** Na Cl 105 mM; Na HCO<sub>3</sub> 25mM; Na C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 10 mM; Na H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,3 mM; K Cl 5 mM; Mg SO<sub>4</sub> 1,0 mM; Ca Cl<sub>2</sub> 1,8 mM; Glicose 8,3 mM e Alanina 5 mM. A osmolalidade desta solução é de  $286 \pm 4$  mOsmoles/kg H<sub>2</sub>O e o pH é de 7,38 após a gaseificação.

**Solução de Collins (com Magnésio):** Na HCO<sub>3</sub> 10 mM; K H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15 mM; K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 42 mM; K Cl 15 mM; glicose 139 mM e Mg SO<sub>4</sub> 28 mM. A osmolalidade desta solução foi de  $320 \pm 5$  mOsmoles/ Kg H<sub>2</sub>O e o pH foi ajustado com HCl 1 N para 7,0.

**Solução de Euro-Collins modificada (sem magnésio) :** Esta solução possui a mesma composição da solução de Collins, diferindo somente na omissão do Mg SO<sub>4</sub>. A omissão deste componente não foi corrigida osmoticamente pela pequena variação obtida na medida da osmolalidade final desta solução a qual foi de  $318 \pm 4$  contra  $320 \pm 5$  mOsmoles/ Kg H<sub>2</sub>O da solução de Collins com Mg SO<sub>4</sub>.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nos grupos experimentais foram expressos pela média e o erro padrão da média.

Os testes estatísticos utilizados foram: o teste *t* pareado de Student para comparações intragrupos. Análise de variância com teste de contrastes múltiplos de Newman-Keuls ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparações inter-grupos (248). O nível de significância utilizado para a rejeição da hipótese de nulidade foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

### 5.3- RESULTADOS:

Nas nossas condições experimentais, nas quais foram testados a ação de diversas soluções conservadoras à 10°C sobre a função do túbulo coletor cortical de coelho isolado e perfundido "in vitro", encontramos os seguintes resultados :

#### 1- ESTUDOS CONTROLES EM CONDIÇÕES NORMOTÉRMICAS

O primeiro passo realizado no protocolo experimental de conservação tubular foi um estudo **controle** com os túbulos coletores corticais de coelho em condições de normotermia, para avaliar as nossas condições experimentais com relação à literatura e obter o grupo controle (G C).

Os parâmetros funcionais dos túbulos coletores corticais isolados e perfundidos "in vitro" foram avaliados à 37°C, utilizando-se os procedimentos de rotina para esta técnica e comparados com os parâmetros encontrados na literatura . Os parâmetros do nosso Laboratório estão representados na Tabela 1 com os valores médios e o seu respectivo erro padrão da média (n=21). Desta forma, túbulos coletores corticais de aproximadamente  $1,98 \pm 0,10$  mm de



comprimento foram perfundidos com um gradiente osmótico médio de  $159 \pm 1$  mOsm/l, entre a solução banhante e a perfusora, e nestas condições experimentais apresentaram após um período de equilíbrio médio de  $110 \pm 3$  minutos, um período basal com uma condutividade hidráulica ( $L_p$ ) de  $27 \pm 5 \times 10^{-7}$  cm/seg.atm e uma diferença de potencial transepitelial de  $-12 \pm 3$  mV quando perfundidos à um fluxo de  $14,3 \pm 1,1$  nl/min. A seguir, quando se adicionou 200  $\mu$ U/ml de arginina-vasopressina à solução banhante, houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na condutividade hidráulica atingindo o valor médio de  $225 \pm 23 \times 10^{-7}$  cm/seg.atm, por um período que durou  $47 \pm 2$  minutos. Neste período não houve uma variação significativa no fluxo de perfusão que foi de  $15,3 \pm 1,0$  nl/min, nem no registro da diferença de potencial transepitelial que foi de  $-12 \pm 2$  mV. Assim, estes resultados obtidos nas nossas condições controles de normotermia estão de acordo com a literatura e dentro da faixa de valores encontrados com esta técnica neste segmento do néfron por diversos Laboratórios (7,8).

## II- ESTUDOS DE CONSERVAÇÃO TUBULAR APÓS UM PERÍODO CONTROLE COM ESTIMULAÇÃO HORMONAL

Nesta estratégia experimental observamos diversos grupos nas seguintes condições :

Assim, primeiro realizou-se os estudos controles à 37°C, e a seguir passou-se a estudar o efeito da conservação a frio sobre a função tubular, com diversas soluções conservadoras adicionadas do lado peritubular.

Desta forma, nas tabelas 3,3,4,5 estão representados os valores individuais e médios e o respectivo erro padrão da média dos parâmetros funcionais encontrados em túbulos coletores corticais preservados com as diversas soluções conservadoras . Deve-se considerar que nestes grupos de túbulos a conservação foi realizada após um período prévio de equilíbrio de aproximadamente 110 min., seguido de um período basal e um período controle com estimulação hormonal com AVP ou AMPc. Os parâmetros encontrados com esta manobra de conservação foram os seguintes:

No grupo I (n=5), tabela 2 e gráfico 1, os túbulos apresentaram durante o período controle com AVP uma condutividade hidráulica média de  $297,5 \pm 59,7 \times 10^{-7} \text{ cm/seg.atm}$  a qual foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que a  $L_p$  média de  $228,9 \pm 42,4 \times 10^{-7} \text{ cm/seg.atm}$  encontrada, no período de recuperação, após a conservação com a solução fisiológica de Ringer-bicarbonato (RI) . Estes

dados indicam que a solução de Ringer-bicarbonato não conserva a condutividade hidráulica ( $L_p$ ) quando comparada ao controle representando uma inibição de  $20 \pm 7\%$  da função tubular.

Proseguindo, no grupo II ( $n=5$ ), tabela 3 gráfico 1, os túbulos foram agora conservados com solução de Collins (contendo sulfato de magnésio) e estimulados, durante o período controle e de recuperação com AVP. Nestas condições observamos neste grupo de túbulos uma queda significativa ( $p < 0,05$ ) da condutividade hidráulica passando de  $180,0 \pm 19,9$  para  $99,5 \pm 12,8 \times 10^{-7} \text{cm/seg.atm}$  após a conservação. Esta queda representou uma inibição de  $45 \pm 2\%$  na  $L_p$  em resposta ao estímulo da AVP e foi significantemente ( $P < 0,05$ ) menor que a encontrada no grupo I de  $20 \pm 7\%$ , indicando que esta solução conservadora de Collins (contendo magnésio) não mantém a função tubular, expresso pela  $L_p$ , durante este tempo de avaliação experimental.

O grupo III ( $n=4$ ), tabela 4 e gráfico 1, apresentou um comportamento semelhante ao grupo II em relação à condutividade hidráulica quando foi estimulado com AMP cíclico. Neste grupo de túbulos observou-se uma queda significativa na resposta da condutividade hidráulica entre o período controle com AMP cíclico,  $L_p = 133,0 \pm 21,6 \times 10^{-7} \text{cm/seg.atm}$ , e o de recuperação estimulado também com AMP cíclico, após a conservação com Collins (com  $\text{Mg SO}_4$ ), que

apresentou uma  $L_p$  de  $56,2 \pm 9,3 \times 10^{-7} \text{ cm/seg.atm}$ , ( $p < 0,05$ ). Esta queda na  $L_p$  em resposta ao AMPc foi diferente estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do grupo I e representou uma inibição de  $57 \pm 7\%$ , indicando que o AMPc não reverteu e/ou até agravou a alteração da resposta de permeabilidade hidráulica sofrida após a conservação com a solução de Collins (contendo sulfato de magnésio) seguida de estimulação pela AVP.

No grupo IV ( $n=6$ ), tabela 5 e gráfico 1, os túbulos coletores corticais foram conservados com solução de Euro-Collins (sem Mg SO4) e estimulados com AVP. Neste grupo se observou uma diminuição significativa na condutividade hidráulica entre o período controle,  $L_p = 194,8 \pm 36,6$  e o de recuperação,  $L_p = 146,7 \pm 29,1 \times 10^{-7} \text{ cm/seg.atm}$  após a conservação ( $p < 0,05$ ).

No entanto, esta diminuição da  $L_p$  pós conservação não foi diferente estatisticamente dos outros grupos estudados, sendo que a porcentagem de inibição da  $L_p$  foi de  $23 \pm 9\%$  e semelhante ao encontrado no grupo conservado com Ringer-bicarbonato (GI).

Sumarizando, ( gráfico 2) estes dados sugerem que a conservação com a solução de Collins (com Mg SO4) de alguma forma altera a resposta hormonal à arginina vasopressina (AVP), a qual não é revertida com o AMPc, diminuindo a condutividade hidráulica nestes túbulos coletores corticais

após a conservação. A solução de Euro-Collins (sem a adição de  $Mg\ SO_4$ ) também inibiu a condutividade hidráulica pós conservação, mas de maneira mais branda mostrando-se mais eficaz que a solução com sulfato magnésio, produzindo uma inibição de apenas 24% em relação aos 45% da conservação com a solução de Collins (com sulfato de magnésio), além de não produzir alterações morfológicas relevantes. Deve-se considerar que a solução controle de Ringer-bicarbonato à 100C "per se" produziu uma pequena inibição ( $20 \pm 7\%$ ) na resposta ao AVF.

#### 5.4- DISCUSSÃO:

No transplante renal assim como na investigação experimental com a técnica da microperfusão de túbulo isolado "in vitro", o tecido renal é resfriado, armazenado por períodos variáveis, reaquecido e então espera-se que o tecido funcione adequadamente nos padrões de normalidade. Devido a essa semelhança no manuseio técnico do tecido renal por estas duas técnicas, pioneiramente o nosso Laboratório (77,83,168,185) e depois o de Pirie e Potts (178,179) tem utilizado a microperfusão de túbulo isolado "in vitro" no monitoramento funcional da eficácia de soluções conservadoras renais, tanto clínicas como experimentais. Nestes estudos de conservação, esta técnica permite a observação detalhada das propriedades morfológicas e funcionais dos túbulos logo após a sua restauração às condições normotérmicas. Além disso, esta técnica permite um estudo direto da resposta epitelial à conservação, sem a interferência do sistema vascular e dos fatores intra e extra renais.

O túbulo coletor cortical foi escolhido para os nossos estudos de conservação pelo seu envolvimento com os mecanismos de concentração e diluição urinária, através da ação hormonal da arginino-vasopressina (AVP)(135,139).

Assim, observando a literatura, considera-se que a atividade antidiurética emergente da vasopressina foi um evento chave na evolução dos vertebrados, contribuindo para

a colonização do ambiente terrestre. Pensava-se que a sua função era restrita aos néfrons terminais. No entanto, atualmente sabe-se que há um grande número de tecidos renais e não renais que são sensíveis à atividade do AVP (133,196).

Deste modo, sabe-se que a atividade antidiurética da AVP está relacionada ao segundo mensageiro, o AMPc (92). Vários autores demonstraram correlações entre os níveis de AVP com a atividade da adenil ciclase e os níveis de AMPc; a inserção de agregados de microtúbulos na membrana plasmática apical e o fluxo hidro-osmótico de água (1,14,99,126,133,165).

Os receptores epiteliais renais da vasopressina responsáveis pelos efeitos hidro-osmóticos são do tipo V<sub>2</sub> e estão situados na membrana basal do túbulo coletor. Estes receptores quando estimulados agem via a adenil ciclase e produção de AMPc, ativando uma proteína fosfoquinase (vide esquema da figura 1). No entanto, há também indícios de que no epitélio tubular existam receptores do tipo V<sub>1</sub>, que são habitualmente encontrados em musculatura lisa e no tecido hepático (133). Estes receptores V<sub>1</sub> não estão acoplados à adenil ciclase, mas à hidrólise de polifosfatidilinositol (PI) e a formação de trifosfato inositol (IP<sub>3</sub>) que causa um aumento no cálcio livre citosólico e na produção da proteína quinase C. Estas duas substâncias resultantes da quebra do PI são potentes inibidores da formação de AMPc e do efeito hidro-osmótico da AVP no túbulo coletor cortical. Baseado nestes fatos propõe-se que a AVP pode autoregular seu

próprio efeito hidro-osmótico no túbulo via a ativação de prostaglandinas e/ou acoplamento do receptor Vi e quebra de PI.

A resposta estimulatória da AVP pode ser regulada nos diversos passos celulares como: a) a ligação do hormônio ao receptor de membrana que é dependente da integridade da mesma; b) a inibição da enzima adenil ciclase envolvendo a denominada sub-unidade inibitória do complexo de acoplamento proteína-GTP dependente; c) uma diminuição no conteúdo de AMPc celular resultante da ativação da fosfodiesterase; d) da modulação da resposta celular devido a alterações na concentração de cálcio livre no citosol; e) alteração nas estruturas do citoesqueleto celular, translocação e inserção dos agregados de partículas à membrana luminal (1,87,165,198).

Não há informações na literatura de como o aumento do AMPc celular, em resposta à AVP, pode causar a movimentação dos agregados de partículas e a fusão dos mesmos na membrana plasmática apical para a formação de microcanais de água. O citoesqueleto celular deve estar envolvido e o processo deve requerer o uso de energia metabólica. Portanto, não é de se surpreender que experimentos nos quais se estudam a permeabilidade hídrica em vigência da AVP requerem um sistema de citoesqueleto e de metabolismo energético íntato (99).

Os nossos estudos de conservação hipotérmica foram realizados durante a perfusão do túbulo isolado "in vitro",



através da exposição direta do epitélio, do lado peritubular, às soluções conservadoras à 10°C. Este tipo de conduta experimental está baseado no interesse de se observar a ação direta destas soluções sobre o tecido epitelial, evitando a utilização de túbulos provenientes de rins ou fragmentos preservados que poderiam estar mal conservados por terem sido mal perfundidos e não estarem em contato com a solução conservadora (9,77,104,168,170). Além disto trabalhos nossos anteriores mostraram que a via peritubular é a que melhor conserva o túbulo proximal (83,84).

Os resultados obtidos com esta manobra experimental evidenciaram que o comportamento funcional pós conservação foi heterogêneo e que poderia depender do estado metabólico e da composição da solução conservadora.

Nos grupos do protocolo experimental (tabela 3) em que a conservação foi realizada após um estudo controle prévio que incluía um período de equilíbrio médio de 114 min., um período basal e um período com estimulação com a AVF; observou-se que a conservação com a solução de Collins (contendo Mg SO<sub>4</sub>) levava a uma inibição de 45% da condutividade hidráulica (Lp) em resposta à AVF. Esta diminuição da responsividade à AVF parece não ser a nível de receptor, nem de atividade da adenil ciclase, uma vez que não é revertida com a adição de AMPC na preparação. Por outro lado, a solução de Euro-Collins(sem o Mg SO<sub>4</sub>), parece ter conservado melhor a função da resposta hidro-oscótica,

uma vez que após a conservação observou-se apenas uma inibição de 23% na Lp em resposta à AVP. Este comportamento foi semelhante ao encontrado no grupo em que os túbulos foram conservados com a solução de Ringer-bicarbonato (RB). Neste grupo (8 l, tabela 2) verificou-se que o próprio resfriamento do epitélio durante a conservação, produzia uma discreta inibição da Lp em resposta à AVP.

De fato, é descrito na literatura o efeito e a dependência da ação da AVP em túbulos coletores de coelho em relação à temperatura. A resposta à AVP em túbulos coletores corticais de coelho isolados e perfundidos "in vitro" é caracterizada por um aumento na condutividade hidráulica, que é estável e prolongada quando o experimento é conduzido à 25°C. No entanto, à temperaturas mais próximas à fisiológica de 37°C, há uma resposta máxima na Lp entre 30-40 min., após a estimulação com a AVP, que então sofre um declínio lento e progressivo até chegar aos níveis basais após 150 min. da estimulação (97,182). Hall e col. demonstraram que a temperatura "per se" na ausência da AVP pode afetar a subsequente responsividade da mesma em túbulos coletores corticais de coelho. Estes autores observaram que aquecendo o túbulo previamente à 37°C sem estímulo com a AVP, e após resfriando os túbulos à 25°C com estímulo hormonal, acarretava uma inibição da Lp. Este efeito da temperatura no declínio da resposta hidro-osmótica está além da geração do AMPC, pois não reverteu com a adição do mesmo à preparação (97).

Provavelmente esta inibição da resposta hidro-osmótica deve estar ligada ao resfriamento e não ao fato do túbulo não responder a doses consecutivas de AVP pela dessensibilização dos receptores ao hormônio.

Vários autores tem demonstrado a dessensibilização do receptor e da atividade da adenil ciclase à doses elevadas ou consecutivas da AVP na linhagem de células epiteliais renais LLC-PK1, que são provenientes de rim de porco e respondem à AVP com o aumento da produção de AMPc (13,198); e em epitélio de bexiga de sapo (145) com redução dos níveis de AMPc e da resposta hidro-osmótica. Nas nossas condições experimentais utilizamos doses supramáximas de AVP ( $200 \mu\text{U/ml} = 460 \times 10^{-12} \text{ M}$  ou  $460 \text{ pM}$ ), no entanto, Lorenzen e col. (147) mostraram dados com o túbulo coletor cortical de coelho onde não havia diferença na magnitude da condutividade hidráulica ( $L_p$ ) em resposta a uma segunda dose de AVP, após 30 minutos da retirada da primeira dose do hormônio. Por outro lado, Dublineu e col. (75) demonstraram que ratos normais ou com diabetes insipidus quando tratados com doses elevadas e subsequentes de AVP não apresentavam dessensibilização à estimulação da mesma e na produção de AMPc nos túbulos coletores corticais, mas somente na produção de AMPc a nível da porção espessa ascendente de Henle.

Outro fator que poderia estar relacionado com esta discreta queda da  $L_p$  à estimulação da AVP no grupo I é que durante a conservação o túbulo é submetido a um período de

aproximadamente 30 minutos de isquemia fria. Hanley em 1980 (101) demonstrou que 60 minutos de isquemia renal à 37°C, provocava uma queda de 59% na condutividade hidráulica em resposta à AVP em túbulos coletores corticais de coelho sem contudo produzir alterações na morfologia celular. Sabe-se que o frio diminui a atividade metabólica mas não a inibe completamente (80,142,156). Por outro lado, a Na-K-ATPase do coelho é menos sensível ao frio (156,221). Assim, provavelmente durante o período de conservação continuou a haver um consumo de ATP, o qual não foi totalmente repostado por causa da isquemia. Isto levaria a célula a uma diminuição nos níveis de produção de AMPc e diminuição da resposta hidro-osmótica ao AVP. Além disso, o resfriamento e a isquemia alteram as estruturas lipídicas da membrana causando lesões e mudanças na permeabilidade celular (20,23,110,157,180). Baseando-se nos mecanismos de ação celular da AVP, a conservação do epitélio do túbulo coletor à 10°C pode conduzir a alterações no metabolismo energético, do citoesqueleto e dos componentes da membrana e com isto sofrer uma deficiência da AVP em estimular a condutividade hidráulica deste epitélio.

Considerando que, durante a conservação tenha havido uma diminuição da síntese de ATP e que este também estivesse diminuído pela ação anterior da AVP sobre o túbulo, é de se esperar que haja uma queda na formação de AMPc na segunda estimulação com a AVP, após a conservação. Esta possível diminuição nos níveis de ATP pode levar a uma diminuição da

atividade das bombas ATP dependentes; isto resultaria num aumento de sódio intracelular e consequentemente também de cálcio citosólico (20,44,110,153,220). Há trabalhos mostrando que na linhagem de células epiteliais renais LLC-MK2 a anoxia leva a um aumento do cálcio citosólico e uma diminuição dos níveis de ATP (110,220). Por outro lado, é descrito na literatura que o ATP tem um papel fundamental como quelante de cálcio e/ou magnésio (66,201,220). Estas alterações descritas se ocorrerem durante a conservação poderiam, de certa forma, influenciar a ação da AVP.

Assim, também está descrito na literatura que o aumento de cálcio citosólico conduz a uma inibição da Lp em resposta à estimulação da AVP (7,13,52,87). O cálcio elevado age inibindo os diversos passos do desencadeamento da resposta hidro-osmótica via: a) inibição da adenil ciclase; b) estimulação da fosfodiesterase e quebra de AMPc; c) estimulação da síntese de prostaglandinas; d) inibição da formação de microtúbulos e microfilamentos; e) inibição da inserção ou/e indução da recuperação dos componentes dos agregados de partículas na membrana (1,13,14,43,52,87,99,126). O aumento de cálcio pode estimular a fosfolipase A<sub>2</sub> que degrada os fosfolípidos da membrana celular levando a alterações da estrutura e permeabilidade da mesma (110,220).

Todos estes fatores poderiam, de alguma forma, estar envolvidos na inibição parcial que se observou na Lp em

resposta à AVF, após a conservação com a solução de Ringer-bicarbonato (G I) e de Euro-Collins (sem Mg SO<sub>4</sub>) (G IV).

No grupo de túbulos onde a conservação foi feita com a solução de Collins contendo uma elevada concentração de magnésio (G II) observou-se uma inibição muito maior da Lp em resposta à AVF. Isto sugere que além da ação inibitória da hipotermia ainda há a influência da composição da solução conservadora sobre a ação da AVF na célula epitelial do túbulo coletor cortical.

O magnésio tem sido o cátion esquecido nos estudos de função celular. No entanto, este cátion é necessário para as transformações energéticas e do metabolismo celular (5,36). Assim, o magnésio participa ativamente na operação de diversas "bombas" das células animais tanto como um co-substrato essencial como um inibidor (91,128,129,201). Em geral o magnésio acopla-se ao ATP e forma o Mg-ATP, sendo que tanto o ATP como o Mg<sup>2+</sup> livre parecem se comportar como inibidores das ATPases. A atividade da Na-K-ATPase de hemácias humanas é estimulada com concentrações de magnésio livre menores que 1 mM, acima desta concentração há inibição da mesma (91,201). A Ca<sup>2+</sup>ATPase de túbulos coletores e proximais é inibida com concentrações de Mg<sup>2+</sup> acima de 4,6 mM (128).

Existem evidências que o íon magnésio está ligado ao movimento de outros cátions celulares. Ele bloqueia a entrada de Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> e a saída de K<sup>+</sup> do meio intracelular. Além disso, ele está ligado à fluidez e ao metabolismo

lipídico da membrana celular (236). O magnésio também está envolvido no controle fisiológico de certos hormônios pois inibe a ação dos glicocorticóides, mineralocorticóides, a formação de aldosterona, a função tireoidiana; ativa o paratormônio e pode ser um cofator no transporte de glicose mediado pela insulina (11,87).

Considerando outros aspectos deste cátion, existem dados mostrando que no músculo liso e no cardíaco o aumento de magnésio bloqueia a ação do cálcio e a deficiência de  $Mg^{+2}$  potencia a ação do  $Ca^{+2}$ . O magnésio age nestes tecidos ao nível do retículo sarcoplasmático ligando-se ao receptor operacional do canal de cálcio assim inibindo a saída do mesmo e também ativando a  $Ca^{+2}$  ATPase e respectivamente o influxo para o retículo (5,117).

Com relação à vasopressina, há trabalhos demonstrando que o magnésio aumenta a ligação específica da AVP aos receptores de membrana de plaquetas humanas e das células da linhagem LLC-FK1 (196,199).

A ação inibitória do magnésio sobre a condutividade hidráulica em resposta à AVP não tem sido descrita na literatura, embora existam algumas referências esparsas, que mencionam a ocorrência de poliúria após a infusão de sulfato de magnésio ou a indução indireta desta através de hipermagnesemia (74,103,246).

Levando-se em conta os aspectos funcionais do magnésio descritos acima poderia-se supor que após a conservação com a solução de Collins (contendo magnésio)

GII e G III), a quantia elevada de  $Mg^{+2}$  livre se associaria ao ATP para formar o complexo  $Mg$ -ATP utilizado nas ATPases. Como o ATP pode estar diminuído por causa da isquemia fria, deve haver nesta situação mais  $Mg^{+2}$  livre o que é um fator inibidor da função das bombas. Havendo uma maior inibição das "bombas" vai ocorrer um aumento intracelular de  $Na^{+}$  e  $Ca^{+2}$  que poderia inibir a ação da AVP. Por outro lado, o  $Mg^{+2}$  elevado ativaria uma maior ligação da AVP aos receptores  $V_2$  exigindo um maior consumo de ATP, e também aos receptores  $V_1$  que estimulam o aumento da proteína quinase C e do cálcio citosólico que são fatores inibitórios para a ação da AVP (8). Por outro lado, tanto o  $Mg^{+2}$  como o  $Ca^{+2}$  elevado são inativadores da calmodulina que é a proteína que regula a ação da adenil ciclase AVP dependente (13,43).

Com referência à célula epitelial, se esta se comportar em relação ao  $Mg^{+2}$  como as de músculo liso, se esperaria que o  $Mg^{+2}$  elevado produzisse uma diminuição do  $Ca^{+2}$  citosólico. Nestas condições, esta situação de cálcio baixo também inibe a ação da AVP sobre a  $L_p$ . Assim, Dillingham e col. (69) observaram que a diminuição do cálcio no banho peritubular, à 25°C, levava a uma diminuição da  $L_p$  de túbulos coletores corticais de coelho em resposta à AVP. Também há trabalhos mostrando que a ação do cálcio sobre a adenil ciclase é trifásica isto é,  $Ca^{+2}$  baixo ou elevado inibem a ação desta enzima (13,43). Contudo, a maioria



destas vias inibitórias agem a um passo pré formação do AMPc.

No entanto, em nossos experimentos o AMPc não reverteu a inibição da Lp pós conservação com a solução de Collins (contendo Mg SO<sub>4</sub>) (G III). Nesta situação, a literatura é divergente em relação a reversão do efeito inibitório do cálcio intracelular pelo AMPc. Frindt e col. (87) não observaram a reversão da inibição da Lp com o AMPc, em manobras experimentais que aumentavam a atividade do cálcio citosólico. Por outro lado, Ando e col. (7) observaram que a inibição da Lp causada pelo ionóforo de cálcio A23187 era revertida com a adição do AMPc, mas que o mesmo não revertia a inibição causada pelo ativador da proteína quinase C, o acetato de forbol miristato. No entanto, não se pode descartar a hipótese que o próprio magnésio ou sulfato tenham uma ação direta e inibitória sobre algum dos passos de eventos que estimulam a condutividade hidráulica em resposta à AVF nas nossas condições experimentais **figura 1**. Assim, Yuki e col. (247) observaram que o tratamento de cães com Ca Cl<sub>2</sub> e bloqueadores de cálcio não abolia a poliúria causada pela infusão de Mg SO<sub>4</sub>.

Estes achados do nosso Laboratório e da literatura a respeito destas soluções conservadoras, conduzem à possível conclusão que a solução de Euro-Collins, ou seja o Collins (sem Mg SO<sub>4</sub>), conserva melhor a função do epitélio tubular renal.

Estes estudos de conservação de túbulos renais isolados e perfundidos "in vitro", mostram a heterogeneidade da ação destas soluções conservadoras conjuntamente com a hipotermia sobre a função do tecido epitelial renal e a complexidade do fenômeno da conservação global de um órgão.

### 5.5- SUMARIO E CONCLUSOES:

1 - O túbulo coletor cortical de coelho quando é conservado "in vitro" com a solução de Collins (contendo Mg SO<sub>4</sub>) à 10°C do lado peritubular, após um período controle com estimulação com AVP, exibe uma certa resistência na condutividade hidráulica em resposta à AVP, após a conservação com esta solução (grupo II).

2 - Este efeito parcial da resistência à AVP pós conservação não foi revertido com a presença do AMPcíclico, mostrando que a inibição provocada pela solução de Collins (com magnésio) está a um passo mais adiante da produção de AMPc no mecanismo intracelular da resposta hidrosmótica à estimulação da AVP (grupo III).

3 - Os resultados encontrados com estas manobras experimentais indicam que a eficácia da conservação deste segmento do néfron pode depender do estado metabólico celular e da composição das soluções conservadoras em relação à concentração de sulfato de magnésio.

Estes achados preliminares de conservação com a solução conservadora de Collins e Furo-Collins sobre a camada epitelial tubular podem contribuir para o entedimento da ação fisiológica das soluções utilizadas ou a serem formuladas para a conservação renal no transplante clínico e experimental.

TABELA 1 : ESTUDOS DOS PARAMETROS FUNCIONAIS DE TUBULOS COLETORES CORTICAIS DE COELHO ISOLADOS E PERFUNDIDOS "IN VITRO" COM A SOLUÇÃO DE RINGER BICARBONATO A 37°C EM CONDIÇÕES NORMAIS ( GRUPO CONTROLE, N=21 ) ( 80 ).

|                                                       | LITERATURA |                            | GRUPO CONTROLE    |                         |
|-------------------------------------------------------|------------|----------------------------|-------------------|-------------------------|
|                                                       | BASAL      | AVP<br>(20-250 $\mu$ U/ml) | BASAL             | AVP<br>(200 $\mu$ U/ml) |
| Grad. Osmótico<br>(mOsm/l)                            | 145-165    |                            | 159<br>$\pm 1$    |                         |
| tempo Perfução<br>(min)                               | 60-180     | 30-200                     | 139<br>$\pm 2$    | 47<br>$\pm 2$           |
| Fluxo Perfução<br>(ml/min)                            | 10-25      |                            | 14,3<br>$\pm 1,1$ | 15,3<br>$\pm 1,0$       |
| Cond. Hidráulica(Lp)<br>(10 <sup>-7</sup> cm/seg.atm) | 5-66       | 123-324                    | 27<br>$\pm 5$     | 225<br>$\pm 23$         |
| Diferença de Potencial<br>(mV)                        | -4 a -37   |                            | -12<br>$\pm 3$    | -12<br>$\pm 2$          |

$\bar{X} \pm$  EPM

TABELA 2: REPRESENTAÇÃO DOS DADOS INDIVIDUAIS (N=5) E DAS MÉDIAS E SEUS RESPECTIVOS ERRO PADRÃO DA MÉDIA DA FUNÇÃO DE TUBULOS COLETORES CORTICAIS PRÉ E PÓS CONSERVAÇÃO COM A SOLUÇÃO DE RINGER-BICARBONATO (RE) A 100 ESTIMULADOS NO PERÍODO CONTROLE (CONT.) E DE RECUPERAÇÃO (REC.) COM A (GRUPO I).

| TEMPO DE<br>EQUILÍBRIO<br>(min) | FLUXO DE PERFUSÃO<br>(nl/min) |              |              | COND. HIDRAULICA(LP)<br>(10 <sup>-7</sup> cm/seg.atm) |                |                 | PORCENTAGEM<br>DE INIBIÇÃO<br>(%) |
|---------------------------------|-------------------------------|--------------|--------------|-------------------------------------------------------|----------------|-----------------|-----------------------------------|
|                                 | BASAL                         | CONT.        | REC.         | BASAL                                                 | CONT.          | REC.            |                                   |
| 114                             | 12,5                          | 13,6         | 10,0         | 18,3                                                  | 355,0          | 190,5           | 46                                |
| 91                              | 16,7                          | 17,7         | 19,3         | 47,5                                                  | 176,6          | 164,4           | 7                                 |
| 131                             | 11,7                          | 11,7         | 7,9          | 26,1                                                  | 273,7          | 259,6           | 5                                 |
| 104                             | 14,2                          | 18,1         | 16,9         | 30,9                                                  | 497,4          | 380,8           | 23                                |
| 115                             | 15,4                          | 15,1         | 15,8         | 37,5                                                  | 184,7          | 149,2           | 19                                |
| 111<br>±7                       | 14,1<br>±0,9                  | 15,2<br>±1,2 | 14,0<br>±2,1 | 32,1<br>±5,0                                          | 297,5<br>±59,7 | 228,9*<br>±42,4 | 20<br>±7                          |

$\bar{X} \pm \text{EPM}$

\* Teste t pareado ( $p < 0,05$ ), Cont. X Rec.

Porcentagem de inibição =  $(Lp \text{ controle} - Lp \text{ recuperação}) / Lp \text{ controle} \times 100$

TABELA 3: REPRESENTAÇÃO DOS DADOS INDIVIDUAIS (N=5) E DAS MÉDIAS E SEU RESPECTIVO ERRO PADRÃO DA MÉDIA DA FUNÇÃO DE TUBULOS COLETORES CORTICAIS PRÉ E POS CONSERVAÇÃO COM A SOLUÇÃO DE COLLINS (CO) (COM MG 504) A 1020 ESTIMULADOS LO PERÍODO CONTROLE (CONT.) E DE RECUPERAÇÃO (REC.) COM AU (GRUPO II).

| TEMPO DE<br>EQUILÍBRIO<br>(min) | FLUXO DE PERFUSÃO<br>(nl/min) |       |      | COND. HIDRAULICA(LP)<br>(10-7cm/seg.atm) |       |       | PORCENTAGEM<br>DE INIBIÇÃO<br>(%) |
|---------------------------------|-------------------------------|-------|------|------------------------------------------|-------|-------|-----------------------------------|
|                                 | BASAL                         | CONT. | REC. | BASAL                                    | CONT. | REC.  |                                   |
| 120                             | 14,4                          | 13,3  | 13,3 | 90,3                                     | 174,2 | 102,2 | 41                                |
| 107                             | 11,3                          | 12,7  | 11,3 | 8,2                                      | 186,1 | 104,3 | 44                                |
| 112                             | 9,2                           | 9,8   | 7,2  | 10,9                                     | 118,8 | 56,8  | 52                                |
| 118                             | 10,5                          | 16,6  | 15,2 | 21,7                                     | 244,1 | 137,4 | 44                                |
| 113                             | 17,0                          | 18,9  | 13,8 | -21,7                                    | 176,9 | 96,7  | 45                                |
| 114                             | 12,5                          | 14,3  | 12,2 | 21,9                                     | 180,0 | 99,5* | 45                                |
| ±2                              | ±1,4                          | ±1,6  | ±1,4 | ±18,6                                    | ±19,9 | ±12,8 | ±2                                |

$\bar{X} \pm \text{EPM}$

Teste *t* pareado ( $p < 0,05$ ), Cont. X Rec.

Porcentagem de inibição =  $(Lp \text{ controle} - Lp \text{ recuperação}) / Lp \text{ controle} \times 10$

TABELA 4: REPRESENTAÇÃO DOS DADOS INDIVIDUAIS (N=4) E DAS MÉDIAS E SEUS RESPECTIVOS ERRO PADRÃO DA MÉDIA DA FUNÇÃO DE TUBULOS COLETORES CORTICAIS PRÉ E PÓS CONSERVAÇÃO COM A SOLUÇÃO DE COLLINS (COM MG SO<sub>4</sub>) A 10% ESTIMULADOS NO PERÍODO CONTROLE (CONT.) E DE RECUPERAÇÃO (REC.) COM AM (GRUPO III).

| TEMPO DE EQUILÍBRIO (min) | FLUXO DE PERFUSÃO (ml/min.) |           |           | COND. HIDRAULICA (LP) (10-7cm/seg.atm) |            |           | PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO (%) |
|---------------------------|-----------------------------|-----------|-----------|----------------------------------------|------------|-----------|-----------------------------|
|                           | BASAL                       | CONT.     | REC.      | BASAL                                  | CONT.      | REC.      |                             |
| 93                        | 20,1                        | 21,4      | 18,8      | 0,8                                    | 114,4      | 48,2      | 58                          |
| 104                       | 18,7                        | 18,4      | 20,3      | 14,6                                   | 118,8      | 75,0      | 37                          |
| 93                        | 16,2                        | 16,7      | 14,7      | 12,2                                   | 196,8      | 67,7      | 66                          |
| 123                       | 14,8                        | 13,6      | 13,5      | 30,9                                   | 101,9      | 33,9      | 67                          |
| 103                       | 17,5                        | 17,5      | 16,8      | 14,6                                   | 133,0      | 56,2*     | 57                          |
| $\pm 7$                   | $\pm 1,2$                   | $\pm 1,6$ | $\pm 1,6$ | $\pm 4,7$                              | $\pm 21,6$ | $\pm 9,3$ | $\pm 7$                     |

$\bar{X} \pm EPM$

\* Teste t pareado ( $p < 0,05$ ), Cont. X Rec.

Porcentagem de Inibição =  $(Lp \text{ controle} - Lp \text{ recuperação}) / Lp \text{ controle} \times 100$



TABELA 5: REPRESENTAÇÃO DOS DADOS INDIVIDUAIS (N=6) E DAS MÉDIAS E SEUS RESPECTIVOS ERRO PADRÃO DA MÉDIA DA FUNÇÃO DE TUBULOS COLETORES CORTICAIS PRÉ E PÓS CONSERVAÇÃO COM A SOLUÇÃO EURO-COLLINS (EUROCO) (SEM MG 504) A 100C; ESTIMULADOS NO PERÍODO CONTROLE (CONT.) E DE RECUPERAÇÃO (REC.) COM AVF (GRUPO IV).

| TEMPO DE EQUILÍBRIO (min) | FLUXO DE PERFUSÃO (nl/min) |       |      | COND. HIDRAULICA(LP) (10-7cm/seg.at.) |       |        | PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO (%) |
|---------------------------|----------------------------|-------|------|---------------------------------------|-------|--------|-----------------------------|
|                           | BASAL                      | CONT. | REC. | BASAL                                 | CONT. | REC.   |                             |
| 107                       | 24,9                       | 23,6  | 20,9 | 40,4                                  | 139,1 | 166,4  | -4                          |
| 100                       | 19,4                       | 15,0  | 18,9 | 2,1                                   | 125,1 | 127,8  | -2                          |
| 93                        | 9,8                        | 16,7  | 12,0 | 39,4                                  | 132,0 | 69,8   | 47                          |
| 127                       | 22,6                       | 26,6  | 22,3 | 11,3                                  | 361,1 | 276,1  | 23                          |
| 95                        | 18,7                       | 15,6  | 13,4 | 10,1                                  | 159,8 | 102,3  | 36                          |
| 100                       | 22,6                       | 20,2  | 19,2 | 17,9                                  | 131,4 | 137,8  | 40                          |
| 104                       | 19,7                       | 19,6  | 17,8 | 20,2                                  | 194,8 | 146,7* | 23                          |
| ±5                        | ±2,2                       | ±1,9  | ±1,7 | ±6,3                                  | ±36,6 | ±29,1  | ±9                          |

$\bar{X} \pm \text{EPM}$

\* Teste t pareado ( $p < 0,05$ ), Cont. X Rec.

Porcentagem de Inibição =  $(Lp \text{ controle} - Lp \text{ recuperação}) / Lp \text{ controle} \times 100$

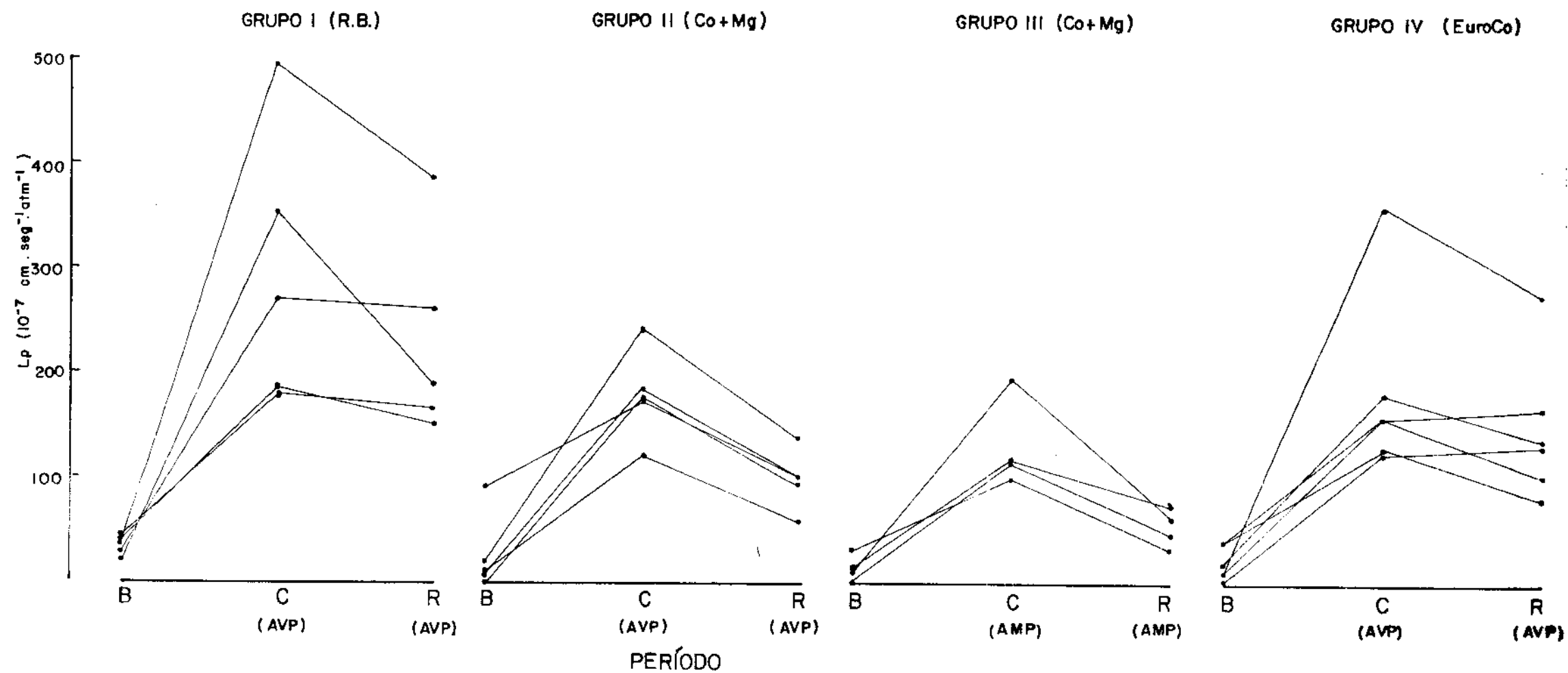
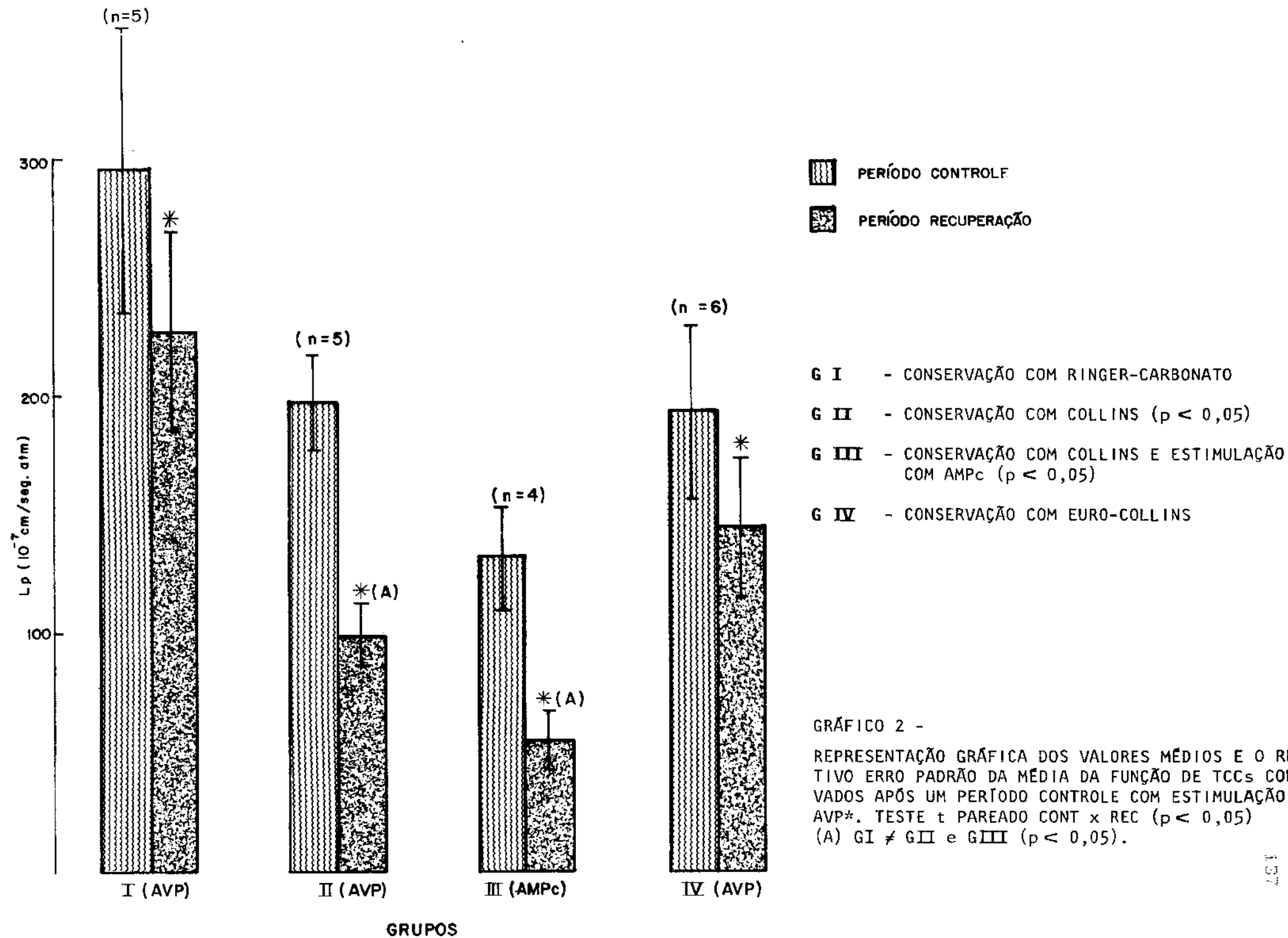


GRÁFICO 1 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS VALORES INDIVIDUAIS DA CONDUTIVIDADE HIDRÁULICA ( $L_p$ ) DE TÚBULOS COLETORES CORTICAIS PRÉ E PÓS ESTUDOS DE CONSERVAÇÃO TUBULAR APÓS UM PERÍODO CONTROLE COM ESTIMULAÇÃO HORMONAL.



- 6- EFEITO DE SOLUÇÕES CONSERVADORAS DE COLLINS COM E SEM MAGNÉSIO NO DUCTO COLETOR PAPILAR DE RATOS PERFUNDIDOS "IN VITRO".

#### 4.1- INTRODUÇÃO:

O rim, redne no seu próprio interior uma organização estrutural sobretudo heterogênea. Cortex e medula exibem unidades anatômicas completamente diferentes. O primeiro contém os elementos filtrantes, glomérulos, em um meio oxigenado; a segunda as alças de Henle, responsáveis pelo mecanismo de antidiurese, em ambiente de hipoxemia.

A heterogeneidade morfológica dos néfrons é determinada pela origem cortical dos glomérulos, os superficiais com alças de Henle mais curtas que os néfrons justamedulares. Em paralelo a esta heterogeneidade internefronal, observa-se ao longo do néfron importantes diferenças estruturais e funcionais, heterogeneidade intranefronal. Esta diversidade segmentar encontra-se hoje bem melhor caracterizada, particularmente em função dos estudos de microperfusão "in vitro".

A susceptibilidade e a resposta à isquemia é comprovadamente diversa entre os diferentes segmentos do néfron. (42,239)

Dentro desta perspectiva, Falkenstein e cols em 1982, utilizando a técnica de microperfusão "in vitro", relataram que a reabsorção de fluido de túbulos proximais de coelhos, armazenados a 4°C em solução de Collins modificada, mantinha-se adequada por até 97 horas (77).

O efeito das soluções conservadoras não foi ainda examinado nos segmentos tubulares situados na papila renal. Esta região, geometricamente, funcionalmente e metabolicamente distinta do cortex renal, é responsável pelo mecanismo de concentração urinária. A incapacidade de excretar urina hipertônica é uma condição que frequentemente se expressa no período de recuperação da insuficiência renal aguda (15,152). Sabe-se ainda que a existência de poliúria caracteriza os primeiros dias de um transplante renal bem sucedido. Não se conhece porém, se a etapa de conservação exerce algum papel na gênese desta condição.

A região medular consiste do arranjo de três áreas dispostas em séries: as faixas interna e externa da medula externa e a medula interna. A faixa externa da medula externa, justaposta ao córtex, recebe parte do túbulo proximal, pars recta, parte do segmento ascendente espesso da alça de Henle (TAL) e ductos coletores (16,143). Esta faixa é atravessada pelas arteríolas eferentes dos glomérulos justamedulares e seus ramos principais, pelos vasos retos descendentes e vasos retos ascendentes oriundos da faixa interna ou da medula interna (16,143).

Na faixa interna situam-se a porção fina descendente da alça de Henle (TDL), parte da TAL e ductos coletores. Os vasos retos descendentes compõem com os vasos retos ascendentes, que emergem da medula interna, os chamados feixes vasculares. Em espécies de elevado poder de

concentração urinária a TDL de alças curtas pode se situar no interior das feixes vasculares.

A medula interna contém as alças longas descendentes de Henle, toda a porção fina ascendente de Henle, os ductos coletores e os vasos retos descendentes e ascendentes.

A concentração final da urina depende das relações espaciais e funcionais entre estas estruturas, e resulta de um balanço dinâmico entre a construção de um gradiente córtico-medular e a tentativa de sua dissipação.

A montagem deste gradiente inicia-se na faixa interna com o transporte passivo e ativo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , respectivamente, pela porção espessa da alça de Henle (189). Este efeito único, multiplicador, é o motor propulsor do mecanismo de antidiurese, coadjuvado pelas diferentes características de permeabilidade verificadas ao longo do néfron e pela ação seletiva de hormônios sobre os segmentos tubulares. O sal transportado pela TAL na faixa interna ganha o interstício e pode penetrar, nesta região, nos ramos finos descendentes da alça longa de Henle, que o conduzem, por serem de tamanho variável, a diversos pontos da medula interna (123). Existem portanto, alças longas curtas, alças longas longas e outras de tamanho intermediário.

Estruturalmente cada ramo fino descendente da alça longa de Henle é composto de dois tipos de epitélio, o superior em sua porção proximal e o inferior em sua porção distal (209). Quanto maior a extensão do ramo, maior a

porção proximal, de epitélio do tipo superior, que ingressa na medula interna. Esta parte do epitélio do ramo descendente é altamente permeável ao sal (116).

Na medula interna o efeito multiplicador é articulado de forma passiva em função das características de permeabilidade inteiramente opostas apresentadas pelo ramo fino descendente e ramo fino ascendente de Henle (138). Enquanto o primeiro, com o epitélio do tipo inferior, é altamente permeável a água e pouco permeável a solutos; o segundo, é impermeável a água e altamente permeável a solutos (143).

O sal contido no ramo fino descendente chega até o ramo fino ascendente de uma alça longa curta e dado a maior permeabilidade local e o gradiente favorável, ganha o interstício medular. Neste ponto, é possível que ramos descendentes de alças intermediárias e ainda com epitélio do tipo superior, possam receber este sal intersticial e conduzi-lo mais profundamente no interior da medula. Os ramos descendentes de alças longas longas, que ultrapassem com epitélio do tipo superior as alças intermediárias, podem repetir este ciclo criando um efeito cascata, permitindo a deposição do sal nas regiões mais internas da medula (143).

A uréia, outro soluto de capital importância para construção do mecanismo de contra-corrente penetra passivamente na medula, facilitada pela ação da vasopressina, através dos segmentos coletores altamente permeáveis localizados nos 2/3 distais da medula interna



(192,205). Outra via de entrada de uréia no interstício medular seria através da porção distal do ramo fino ascendente, pois que no local o epitélio tem elevada permeabilidade à uréia, além do gradiente transepitelial favorável decorrente da diminuição progressiva da concentração da uréia intersticial que ocorre ao se aproximar da medula externa (136).

Porque a superfície externa da papila está mergulhada na urina pélvica, admite-se que a uréia excretada nesta urina poderia penetrar no interstício medular atravessando o epitélio da superfície papilar (208). Recentemente, entretanto, Sands e Knepper, em 1987, mostraram que este epitélio tem permeabilidade à uréia 10 vezes menor que a dos ductos coletores medulares distais e que a área total epitelial disponível para a troca, era também 10 vezes menor nesta superfície epitelial, o que torna esta via de pouca importância (204).

As relações espaciais procuram também evitar a dissipação do gradiente córtico-medular criado pela contenção de solutos no interior da medula. Os feixes vasculares representam um destes exemplos, porque ao justapor vasos descendentes e ramos finos descendentes da alça curta de Henle com os vasos retos ascendentes, permitem que os solutos retornem pelas estruturas descendentes evitando a dissipação cortical do gradiente córtico-medular.

O ducto coletor é o responsável pela regulação final da osmolaridade urinária (139). Há neste segmento

diferentes características morfológicas e funcionais (191). No percurso do cortex à papila observa-se um progressivo declínio das células intercaladas, deixando a medula interna com apenas um tipo celular, as células principais (139). A altura das células também aumenta gradualmente atingindo na ponta da papila uma altura 4 vezes superior à das células corticais.

Durante o percurso até a papila, mudam-se também as características de permeabilidade. No segmento cortical ocorre transporte ativo de  $\text{Na}^+$  sob ação da aldosterona e o epitélio não é permeável à uréia. No segmento papilar, o transporte de  $\text{Na}^+$  não é estimulado pela aldosterona e o epitélio é altamente permeável à uréia sob a ação da vasopressina (191).

Estudos recentes demonstram que a heterogeneidade funcional é manifestada mesmo nos segmentos do ducto coletor papilar. Madsen e Tisher dividiram esta porção em 3 subsegmentos: terço externo (IMCD 1), terço médio (IMCD 2) e terço interno (IMCD 3) (151). Neste contexto, Sands e cols, em 1987, mostraram que o subsegmento inicial (IMCD 1) exibía baixa permeabilidade basal à uréia, a qual não se alterava com a presença de vasopressina no banho, em contraste, a baixa permeabilidade osmótica basal à água se elevava significativamente com a adição do hormônio. Nos segmentos terminais (IMCD 2 e IMCD 3), a permeabilidade basal à uréia, já estava elevada em relação ao subsegmento inicial, aumentava significativamente com a vasopressina, e

da mesma maneira, era maior a permeabilidade osmótica basal à água e esta também se elevava significativamente com a adição do hormônio (205).

Toda esta heterogeneidade estrutural, topográfica e funcional disposta ao longo de todo o néfron, assim como a susceptibilidade heterogênea dos diferentes segmentos ao estresse da hipoxia e da hipotermia, pressupõe mecanismos também heterogêneos de conservação.

A técnica de microperfusão "in vitro" introduz um meio especialmente apropriado para o estudo da preservação renal. A dissecação e o isolamento dos diversos segmentos do néfron permite a análise do comportamento destas diferentes unidades estruturais durante a etapa de conservação. O conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na conservação renal; certamente heterogêneos, trará indubitavelmente subsídios para a confecção de novas soluções, para o desenvolvimento de novas estratégias de conservação.

Neste trabalho procuramos, pela primeira vez, utilizando a técnica de microperfusão "in vitro", avaliar o comportamento de segmentos do néfron provenientes da região medular interna, e submetidos a diferentes manobras de conservação com solução de Collins e de Collins sem magnésio.

## 6.2- MATERIAL E MÉTODOS:

Foram utilizados em todos os experimentos fêmeas de ratos Wistar pesando entre 80 e 200 gramas, fornecidos pelo Biotério da Escola Paulista de Medicina. Estes animais eram mantidos em dieta normal, sem qualquer restrição de água ou eletrólitos até o momento da realização do experimento.

### **Microperfusão do túbulo renal isolado "in vitro".**

Os estudos de conservação foram desenvolvidos através da técnica de microperfusão "in vitro" descrita inicialmente por Burg e cols, em 1966, (47) e adaptada por Rocha e Kokko, em 1974, (190) para a perfusão do ducto coletor papilar.

Esta técnica envolve alguns aspectos diferentes que a descrita na parte 3.2, na etapa inicial que consiste na microdissecção e o consequente isolamento do segmento do néfron a ser perfundido. Nesta etapa de microdissecção o rim era descapsulado, removiam-se os seus polos superior e inferior e pela abertura longitudinal da região hilar por meio de pinças finas e expunha-se toda a papila. Toda essa região exposta era então seccionada ao nível da junção córtico-medular e o fragmento transferido para uma placa de Petri contendo uma solução de Ringer-Bicarbonato a 40C e nestas condições se processava a dissecção e isolamento do ducto coletor papilar. No processo de microdissecção utilizou-se uma lupa binocular Bausch & Lomb com dispositivo

de "zoom" e aumento variando entre 30 a 50 vezes, sendo também utilizadas delicadas pinças Dumont Nº 5.

O fragmento transferido era dividido em fatias menores e em uma destas mesmas fatias prosseguia-se a dissecação afinando-se progressivamente, no sentido córtico-medular, um feixe de tecido papilar. Na altura dos 2/3 distais da medula interna, isolava-se o feixe de tamanho apropriado que era então seccionado em suas extremidades utilizando-se as pinças e um fórceps especialmente fabricado, seguindo a técnica descrita inicialmente na parte 3.2.

As pipetas como perfundiam feixes de túbulos tinham diâmetros maiores, sendo em torno de 200 micras.

O fluido usado como banho durante a perfusão foi uma solução isotônica (290mOsm/Kg H<sub>2</sub>O) de Ringer-Bicarbonato, contendo: 115 mM de NaCl, 25 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 1,2 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5mM de KCl, 1,0 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM de MgSO<sub>4</sub> e 5,0 mM de Glicose. A solução perfusora tinha a mesma composição iônica do banho, porém era feita hipotônica (120 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O) pela redução do soluto impermeável NaCl (60 mM) gerando, portanto, um gradiente osmótico entre o fluido tubular e o banho. Um corante, o FD&C Green, que permitia a visualização completa do segmento perfundido, também era adicionado, o que facilitava a mensuração do comprimento e do diâmetro tubular. Procurou-se utilizar em todos os experimentos perfusões rápidas, em torno de 25 nl/min, para

evitar um equilíbrio osmótico entre o fluido tubular e o banho.

### Cálculo da Permeabilidade Osmótica .

A medida da permeabilidade osmótica ( $P_{osm}$ ) foi feita a partir do cálculo do volume reabsorvido ( $V_r$ ) em resposta ao gradiente osmótico pela maior concentração de soluto impermeável,  $Na^+$ , no banho utilizado para os experimentos (190).

Este volume reabsorvido foi calculado usando-se a seguinte equação:  $V_r = V_i - V_c$

Onde  $V_r$  tem as unidades de nanolitros por minuto,  $V_i$  é o volume infundido em nanolitros por minuto e  $V_c$  é o volume coletado nas mesmas unidades.

O volume coletado foi medido diretamente através do preenchimento da micropipeta especial de volume constante. Dividindo-se este volume pelo tempo em que foi realizado a coleta, obtinha-se o volume coletado por minuto. O volume infundido era calculado utilizando-se as seguintes equações:

$$V_i \cdot C_i = V_c \cdot C_c$$

e

$$V_i = \frac{V_c \cdot C_c}{C_i}$$

Onde  $C_c$  e  $C_i$  se referem as contagens por minuto de Inulina  $C^{14}$  coletada e infundida, respectivamente. A concentração de Inulina radioativa contida na solução

perfusora,  $C_i$ , era determinada através de uma amostra de volume conhecido, retirada diretamente da micropipeta perfusora no término do experimento.

O cálculo da  $P_{osm}$  obedecia então a seguinte equação:

$$P_{osm} = \frac{V_r}{A \cdot Grad \ Osm}$$

onde:

$V_r$  era o volume de fluido reabsorvido em  $cm^3/seg$ ;

$A$  era a área expressa em  $cm^2$ ; calculada tomando-se as medidas do comprimento e diâmetro do túbulo, obtidos pela leitura efetuada com o auxílio de um micrômetro ocular pré-calibrado.

$Grad \ Osm$  era o gradiente osmótico transepitelial médio expresso em atmosfera (atm) e calculado pela média logarítmica entre o gradiente no início e o fim do túbulo através da equação:

$$Grad \ Osm = \sqrt{[(Osm \ banho - Osm \ perf) \cdot (Osm \ banho - Osm \ colet)]}$$

A osmolaridade do coletado era dada pela equação:

$$Osm \ colet = Osm \ perf \cdot \frac{C_c}{C_i}$$

A transformação do gradiente osmótico expresso em  $mOsm/Kg \ H_2O$  para atmosfera, foi efetuada pela relação de  $1mOsm = 0,0255 \ atm$ , válido para a temperatura de  $37^\circ C$ .

A osmolalidade dos fluidos era determinada através do ponto de congelação de um osmômetro Advanced 3W11.

Os resultados da Posm foram expressos em  $\text{cm}^3/\text{atm} \cdot \text{seg.}$

Adaptação da técnica de microperfusão "in vitro" para o estudo do efeito das soluções preservadoras sobre o epitélio tubular.

Esta abordagem experimental constava de 3 períodos:

Na primeira etapa, período controle, os túbulos eram perfundidos na presença de um gradiente osmótico e de vasopressina ou AMFc no banho com Ringer-bicarbonato. Pelo menos 3 amostras eram então coletadas com a solução peritubular mantida a 37°C e borbulhada com 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>, calculando-se os valores basais do volume absorvido ( $V_r$ ) e da permeabilidade osmótica (Posm).

Na segunda etapa, período de conservação com Ringer-bicarbonato, iniciava-se a manobra de preservação, na qual a câmara era resfriada a 10°C pela passagem contínua de solução conservadora durante 30 minutos. Neste intervalo não havia pressão de perfusão, coleta de amostras e borbulhamento de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, permanecendo o túbulo imerso na solução preservadora.

Na terceira etapa, período de recuperação, reproduzia-se todos os procedimentos do primeiro período. A câmara era reaquecida, restabelecia-se o gradiente osmótico.



borbulhava-se O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> coletava-se as amostras para medida do Vr e da Posm.

O estudo "in vitro" consistia da coleta de um mínimo de 3 amostras, na presença de gradiente osmótico com e sem adição de vasopressina, para cálculo do Vr e da Posm. Tanto a fase de coleta como o período de aproximadamente 30 minutos de equilíbrio, eram realizados a 37°C e com borbulhamento de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>.

#### Caracterização dos grupos experimentais.

Foram estudados 4 grupos experimentais. Nestes grupos foram avaliados o efeito de diversas soluções usadas no processo de conservação, sobre a responsividade "in vitro" do ducto coletor papilar à vasopressina (800 uU/ml) ou ao AMPc 10<sup>-4</sup>M, [ 8-(4-chlorophenylthio) Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate ].

O gradiente osmótico era criado pela presença de Ringer-bicarbonato isotônico (290mOsm) no banho e pela mesma solução feita hipotônica (120mOsm), pela redução do teor de NaCl, no perfusato.

GRUPO I: Nestes experimentos (n=6) foi testada a capacidade da solução de Ringer-bicarbonato, cuja composição química está expressa na tabela 1, de atuar a 10°C como solução preservadora no período de conservação, examinando-se a resposta do ducto coletor papilar à ação da vasopressina nos períodos controle e recuperação.

GRUPO II: Nestes experimentos (n=7), a solução de Collins, cuja composição química está expressa na tabela 1, foi utilizada no momento da conservação, avaliando-se o seu efeito preservador pelo comportamento da Posm do ducto coletor papilar à ação da vasopressina nos períodos controle e recuperação.

GRUPO III: Nesta série de experimentos (n=6), a solução de Euro-Collins - Collins sem adição de magnésio, cuja composição química está expressa na tabela 1, foi utilizada como agente de conservação, estudando-se a sua ação através da Posm do ducto coletor papilar sob ação da vasopressina nos períodos controle e recuperação.

GRUPO IV: Nesta série de experimentos (n=5), todos os procedimentos foram idênticos aos grupos II, exceto pela substituição da vasopressina pelo AMPC e pelo caráter estacionário do banho. Cumpre ressaltar que a elaboração deste grupo se deveu aos resultados verificados nos grupos II e III, e teve como objetivo a melhor localização da ação inibitória da Posm, se anterior ou se posterior a formação de AMPC intracelular.

### ANALISE ESTATISTICA:

As comparações intragrupos foram realizadas utilizando-se o teste t pareado de Student.

As comparações da variação da Fosm observadas entre os diferentes grupos submetidos à preservação "in vitro", foram realizadas utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis (215); complementado, quando a estatística resultante era significativa, pelo teste de contrastes para localização dos grupos discrepantes.

Os resultados obtidos nos experimentos foram expressos pela média e erro padrão da média ( $\bar{X} \pm EPM$ ).

Em todos os testes o nível de rejeição da hipótese de nulidade foi sempre menor ou igual a 0,05 (5%) e assinalamos com um asterisco as diferenças significantes.

### 6.3 - RESULTADOS:

GRUPO I: A tabela 2 e gráfico 1 demonstram os valores concernentes a responsividade à vasopressina de ductos coletores papilares preservados "in vitro" a 10°C, com Ringer-bicarbonato, uma solução fisiológica que admite-se não possuir propriedades de conservação. Nestas condições observou-se uma redução significativa da Posm após o período de conservação, pois enquanto no período controle a Posm era de  $3,92 \pm 0,52$  cm-5/atm.seg, no período de recuperação a resposta média diminuiu para  $2,99 \pm 0,37$  cm-5/atm.seg ( $t=3,16$  ;  $p < 0,05$ ).

GRUPO II: Os resultados relacionados na tabela 3 e gráfico 1 revelam que a preservação "in vitro" de ductos coletores papilares por solução de Collins, habitualmente utilizada no processo de conservação renal, induziu a uma importante diminuição da Posm destes túbulos. Todos os túbulos perfundidos exibiram no período de recuperação uma redução da Posm cujos valores eram, em média, 45% inferiores aos registrados ao período controle. Os valores médios foram de  $4,84 \pm 0,63$  cm-5/atm.seg no período controle e de  $2,64 \pm 0,47$  cm-5/atm.seg no período de recuperação ( $t=5,21$  ;  $p < 0,01$ ).

GRUPO III: A tabela 4 e gráfico 1 mostram que a resposta à vasopressina de ductos coletores papilares preservados com solução de Euro-Collins (Collins sem Mg), permaneceu equivalente à observada no período controle

( $t=0,28$ ;  $p>0,20$ ). Neste grupo, ao contrário dos grupos I e II, a Posm anterior a manobra de preservação ( $3,04 \pm 0,60$  cm-5/atm.seg) manteve-se inalterada no período de recuperação ( $3,14 \pm 0,6$  cm-5/atm.seg).

GRUPO IV: Como pode ser observado na tabela 5 e no gráfico 1, a utilização de AMPc em substituição à vasopressina eliminou a redução da Posm verificada após a conservação de ductos coletores papilares com solução de Collins. Os resultados desta série de experimentos superpõem-se aos do grupo III, demonstrando que não obstante a presença de ions magnésio na solução de Collins, a Posm de  $4,44 \pm 0,64$  cm-5/atm.seg verificada no período controle manteve-se constante ( $t=0,39$  ;  $p>0,20$ ) no período de recuperação ( $4,58 \pm 0,61$  cm-5/atm.seg).

#### Comparações múltiplas entre os grupos:

O teste de Kruskal-Wallis ( $H=15,95$  ;  $p<0,01$ ) demonstrou que as variações percentuais da Posm, observadas entre os períodos controle e recuperação dos grupos submetidos à conservação "in vitro", foram significativamente diferentes (tabela 6 e gráfico2 ). O teste de contrastes mostrou que a redução de  $45 \pm 6\%$  da Posm na presença de vasopressina verificada no grupo II, onde o ducto coletor papilar era conservado com Collins com  $Mg^{+2}$ , diferia significativamente dos resultados do grupo III de  $+4 \pm 11\%$ ,  $p<0,05$  , (Collins sem  $Mg^{+2}$  + Vasopressina) e do grupo IV de  $+5 \pm 9\%$ ,  $p<0,05$  , (Collins com  $Mg^{+2}$  + AMPc).

#### 6.4- DISCUSSÃO:

A conservação do rim constitui uma etapa crucial no programa de transplante renal. Não se encontra todavia, nos últimos 20 anos, um avanço científico compatível com a importância do tema. No entanto, o conhecimento dos mecanismos indutores de insuficiência funcional do órgão preservado por hipotermia é de grande relevância, porque torna possível o desenvolvimento de estratégias mais adequadas de conservação .

O transplante renal progride às expensas do rápido progresso experimentado pela imunologia, na elucidação e controle dos processos de rejeição e no diagnóstico das compatibilidades. A seleção do melhor receptor para o doador cadáver é uma realidade prática, porém comprometida pelo escasso tempo disponível para as seguintes providências: realização das provas de compatibilidade; escolha e preparação do receptor; e eventual transporte nacional ou internacional do órgão doado. O curto intervalo do tempo de conservação é hoje o fator limitante da preservação de órgãos.

Os resultados de conservação renal ao utilizar todo o órgão, avaliam unicamente os parâmetros globais de função, desconhecendo a heterogeneidade estrutural e metabólica de seus elementos particulares (glomérulo, mesângio, túbulo, vasos, pélvis) e portanto, desconhecendo a

sensibilidade variável que estas diferentes estruturas certamente possuem ao processo de conservação.

O primeiro trabalho que investigou o efeito de soluções preservadoras sobre a função de um segmento isolado do néfron foi efetuado em 1932 (77). Neste estudo observou-se, pela técnica de microperfusão "in vitro", que túbulos contornados proximais de coelho conservados em solução de Collins por até 97 horas, mantinham inalterados a absorção de fluido (Jv) e a voltagem transepitelial. Resultados similares foram obtidos por Pirie & Potts, em 1955, conservando este mesmo segmento por até 48 horas com solução tampão de fosfato de sódio (178).

Os segmentos medulares não haviam sido estudados até o momento e nosso trabalho representa a primeira investigação experimental do efeito de soluções preservadoras sobre ductos coletores extraídos da região medular interna.

Na preservação do epitélio "in vitro" o processo de conservação foi realizado pela exposição direta do epitélio peritubular à solução conservadora. Nestas condições, ao contrário da perfusão total do órgão como no âmbito clínico, não há fatores deletérios como: isquemia quente prolongada; distribuição irregular da solução por alterações vasculares; elevada pressão intersticial pelo edema celular agravada pela presença da cápsula renal; e intervenção neurológica e/ou endócrina. Outra vantagem

adicional é que evita a utilização de túbulos eventualmente mal conservados por terem sido mal perfundidos.

Nossos resultados demonstram que a conservação "in vitro" do epitélio do ducto coletor papilar com solução de Collins, rica em  $MgSO_4$ , induziu a uma redução significativa na resposta hidro-osmótica à vasopressina. Todos os túbulos estudados apresentavam no período de recuperação, valores de  $F_{osm}$ , em média, 45% inferiores aos do período controle.

Em contraste, os túbulos do grupo preservado com a solução de Euro-Collins (sem adição de  $MgSO_4$ ), exibiram resposta hidroosmótica à vasopressina inteiramente equivalentes, tanto antes quanto depois das manobras de conservação.

Tais resultados creditam à presença do cátion  $Mg^{2+}$  os efeitos inibitórios observados sobre a  $F_{osm}$  de ductos coletores papilares estimulados pela vasopressina. Também permitem demonstrar que a origem da ação inibitória se localiza na composição química da solução conservadora, e não no processo de resfriamento a que foi submetido o epitélio.

Consideramos na discussão dos resultados, que o efeito inibitório do sulfato de magnésio se deveu à ação isolada dos íons  $Mg^{2+}$ . O ânion sulfato é adicionado em soluções conservadoras, unicamente pela sua condição de agente impermeável, e sua presença extracelular se justifica



pela oposição que exerce a força oncótica das proteínas aniônicas intracelulares.

Os experimentos realizados com a solução de Collins, utilizando AMPc em substituição à vasopressina, revelam que o efeito hidro-osmótico observado no período controle, não é alterado pela conservação com Collins rico em  $MgSO_4$ . Tais resultados indicam que o provável sítio da inibição deste elemento à ação da vasopressina se situe em alguma etapa anterior a geração de AMPc intracelular.

A utilização de uma solução fisiológica, Ringer-bicarbonato, para conservação "in vitro" do ducto coletor papilar, também induziu a uma diminuição significativa da  $F_{osm}$  no período de recuperação. Estes dados sugerem que os constituintes químicos de soluções fisiológicas não sejam adequados para a manutenção da resposta hidro-osmótica do epitélio coletor papilar.

Quando a vasopressina se liga a seus receptores  $V_2$  situados na superfície basolateral dos ductos coletores, inicia-se uma sequência coordenada de movimentos no interior do território celular (105). Figura 1 da parte 5.4.

A participação do complexo da adenilciclase responde pelo aparecimento do AMPc, e este, mensageiro secundário, promove reações de fosforilação que no final resultam em modificações de permeabilidade da membrana luminal (1,105). Destas modificações também participam estruturas tubulares citoplasmáticas, que são formadas e

orientadas a se fundirem com a membrana luminal, carregando consigo agregados de partículas condutoras de água (1, 103).

O complexo da adenilciclase envolve três subunidades: o próprio receptor; a proteína reguladora guanil-nucleotídeo; e a unidade catalítica (14). A modulação dos mecanismos envolvidos entre a ocupação do receptor e a ativação da unidade catalítica estão hoje melhor delineados.

Na membrana serosa, a ligação da vasopressina com os seus sítios receptores forma o complexo hormônio-receptor (HR) (1,14), interação esta que pode ser inibida pela presença de  $Ca^{+2}$  (52). Este complexo HR interage por sua vez, com a proteína reguladora guanil-nucleotídeo que consiste de duas subunidades, alfa e beta, (1,14,193,230). A presença do hormônio favorece a dissociação destas moléculas, propiciando através da adição de guanosina trifosfato (GTP) à subunidade alfa o surgimento do estado alfa GTP, que acoplado a unidade catalítica (C), alfa GTP C, compõe a forma ativa da enzima (216).

Vários agentes podem atuar sobre a proteína reguladora como o cloreto de sódio hipertônico, as prostaglandinas, a toxina da cólera e o próprio GTP, modulando assim, o processo de geração de AMPc (1). Há evidências de que a atividade da adenilciclase de túbulos coletores medulares estimulados pela vasopressina pode ser inibida pelo influxo de  $Ca^{+2}$ , embora não se precise o local exato desta ação inibitória (141). Outra maneira de atuação

do  $\text{Ca}^{+2}$  seria através da regulação bifásica que a  $\text{Ca}^{+2}$ -Calmodulina exerce sobre o sinal hidro-osmótico (14). Assim, enquanto quantidades micromolares de  $\text{Ca}^{+2}$  são requisitados para ativação da adenilciclase, elevações adicionais de  $\text{Ca}^{+2}$  resultam em inibição desta enzima. Presume-se que a  $\text{Ca}^{+2}$ -Calmodulina regule a adenilciclase atuando diretamente através de sua unidade catalítica (14). É também provável, segundo o relato de Ausiello e Hall em 1981, que esta regulação dependa dos níveis de  $\text{Mg}^{2+}$  existentes no interior da célula (13).

Os agentes inibidores da ação da vasopressina poderiam então atuar, entre outras maneiras, aumentando a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina (efeito bifásico) ou modificando a concentração de  $\text{Mg}^{2+}$ .

É interessante registrar que Petersen e Edelman já há vários anos haviam reportado em bexiga de sapo, que concentrações elevadas de  $\text{Ca}^{2+}$  no lado seroso reduziam o efeito hidro-osmótico da vasopressina, e que a substituição deste hormônio por AMPc exógeno corrigia esta anormalidade (176).

A ação inibitória do magnésio verificada neste trabalho, não tem sido descrita na literatura, embora existam referências esparsas que mencionam a ocorrência de poliúria após infusão de magnésio (103,243).

Magnésio foi introduzido em soluções conservadoras por razões variadas: é um integrante de sistemas enzimáticos envolvidos na formação de ATP; porque

altos níveis séricos de  $Mg^{2+}$  são observados em animais durante a hibernação (95), e ainda porque limita a perda dos ions intracelulares nos órgãos submetidos à conservação (30). Sua eficiência, entretanto, é contestada (73,78). De um lado é ressaltada sua relativa insolubilidade e a tendência que possui de precipitar na presença de fosfato. Do outro lado enfatiza-se que a utilização de soluções que não contém  $Mg^{2+}$  não comprometem a eficiência da conservação (202,203). Na Europa padronizou-se uma solução sem  $Mg^{2+}$ , Euro-Collins, com resultados amplamente satisfatórios (72).

Não há qualquer relato, de nosso conhecimento, que relacione diretamente o cátion  $Mg^{2+}$  com o aparecimento de alterações funcionais durante o processo de conservação. Nossos resultados constituem então, evidências iniciais de que a presença de  $Mg^{2+}$  em soluções conservadoras pode alterar o comportamento funcional de segmentos do néfron durante o período de conservação. O mecanismo pelo qual presumimos que este elemento implementa sua ação inibitória sobre a Pasm em resposta à vasopressina, envolve a participação do  $Ca^{2+}$ . Magnésio compete com  $Ca^{2+}$  pelos seus sítios de ligação, de tal sorte que quanto maior o número de sítios de ligação do  $Ca^{2+}$  ocupados pelo  $Mg^{2+}$ , maior o número de ions  $Ca^{2+}$  livres no interior da célula (13,91).

Os níveis de  $Ca^{2+}$  intracelulares são regulados por organelas, como o retículo endoplasmático e mitocôndrias, que exercem um efeito tampão. Há evidências de que o retículo endoplasmático executa uma regulação

inicial, mantendo o  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico em seus valores basais; enquanto o compartimento mitocondrial, na presença de  $\text{Mg}^{2+}$ , entra em operação apenas quando os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  livre encontram-se de 6 a 15 vezes do valor basal (57). Na ausência de  $\text{Mg}^{2+}$  a máquina mitocondrial modifica sua curva de atuação, passando a regular o  $\text{Ca}^{2+}$  livre citosólico a partir de seus valores basais (57).

Durante a hipotermia induzida pela conservação do epitélio "in vitro", iniciam-se os processos de elevação do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico e de desestruturação da membrana celular (110). Nesta condição, o influxo de  $\text{Mg}^{2+}$  contido na solução de Collins poderia ocupar os sítios de ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo endoplasmático, além de retardar o início da ação mitocondrial até que os valores de  $\text{Ca}^{2+}$  estivessem elevados de 6 a 15 vezes, resultando, durante o período de reperfusão, na manutenção de elevados níveis de íons  $\text{Ca}^{2+}$  livre e/ou do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina.

O assédio dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  ou do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina sobre o sistema adenilciclase ou diretamente sobre a unidade catalítica, resultaria no processo de inibição da resposta hidro-osmótica à vasopressina em um ponto anterior à geração de AMPc, da mesma maneira que a verificada no presente trabalho.

Entretanto, não podemos excluir que esta ação inibitória possa se processar por uma ação direta no próprio receptor e/ou na própria proteína reguladora guanil nucleotídeo.

Os resultados obtidos com a conservação "in vitro" do eitélio tubular, indicam que o contato direto da solução de Collins com a superfície basolateral reduz a resposta hidro-osmótica à vasopressina, e que esta inibição é mediada pelo cátion  $Mg^{2+}$  em um ponto anterior a formação de AMPc.

Neste contexto, a microperfusão "in vitro" constitui-se em um instrumento de grande utilidade, pois ao revelar o comportamento das diferentes estruturas do néfron frente a manobras de conservação, permite o desenvolvimento de novas estratégias e novas soluções que não só prolonguem o tempo de conservação, mas que concomitantemente evitem ou minimizem os processos deletéricos envolvidos nestes procedimentos.

## 6.5- SUMARIO E CONCLUSÕES:

Neste trabalho estudamos o efeito direto de soluções conservadoras, utilizadas no transplante renal clínico, sobre a permeabilidade osmótica de ductos coletores papilares de ratos.

Nestas condições concluímos:

Esta técnica permite avaliar diretamente a ação dos constituintes químicos de soluções conservadoras sobre aspectos de interesse da fisiologia tubular. O estado funcional do túbulo é previamente determinado antes da conservação, de tal sorte que cada experimento é seu próprio controle. A solução durante o processo de conservação permanece em contato direto com o lado basolateral do epitélio tubular a 10°C durante 30 minutos.

Diante desses resultados concluímos que:

a-) A presença de  $MgSO_4$  em soluções conservadoras quando em contato direto com a superfície basolateral, reduz a  $P_{osm}$  de ductos coletores papilares estimulados pela vasopressina.

b-) A substituição de vasopressina por AMPc indica que o sítio da ação inibitória exercida pelo cátion  $Mg^{2+}$  se localiza em uma etapa anterior a formação do AMPc intracelular.

c-) A conservação com Ringer-bicarbonato, uma solução de composição fisiológica, mostrou-se inadequada para conservar o efeito hidro-osmótico da vasopressina.

TABELA 1

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS SOLUÇÕES CONSERVADORAS .

| COLLINS           | EURO- COLLINS    MAGNÉSIO | RINGER BICARBONA |
|-------------------|---------------------------|------------------|
| NaHCO3-----10mM   | NaHCO3-----10mM           | NaCl-----115,0   |
| KH2PO4-----15mM   | KH2PO4-----15mM           | NaHCO3-----25,0  |
| K2HPO4-----40mM   | K2HPO4-----40mM           | NaH2PO4-----1,2  |
| KCl-----15mM      | KCl-----15mM              | KCl-----5,0      |
| MgSO4-----28mM    | Glicose-----139mM         | CaCl2-----1,0    |
| Glicose-----139mM | Osm-----318mOsm/l         | MgSO4-----1,2    |
| Osm-----320mOsm/l | pH-----7,0                | Glicose-----5,0  |
| pH-----7,0        |                           | Osm-----290mOsm  |
|                   |                           | pH-----7         |



TABELA 2

EFEITO DA VASOPRESSINA SOBRE A PERMEABILIDADE OSMOTICA (Posm) NOS DUCTOS COLETORES PAPILARES ANTES E DEPOIS DA CONSERVAÇÃO "IN VITRO" COM SOLUÇÃO DE RINGER BICARBONATO (GRUPO I) A 102 C DURANTE 30 MINUTOS

| EXP.        | COMP.<br>(mm) | DIAM.<br>(micra) | AREA<br>(10-4cm2) | PERIODO                 | GRAD.OSM.  | Vr<br>nl/<br>min    | Posm<br>10-5cm<br>seg.atm |
|-------------|---------------|------------------|-------------------|-------------------------|------------|---------------------|---------------------------|
| 1           | 1,20          | 20-25-30         | 15,31             | CONTROLE<br>RECUPERAÇÃO | 129<br>131 | 8,37<br>7,87        | 2,78<br>2,77              |
| 2           | 1,50          | 20-25            | 25,68             | CONTROLE<br>RECUPERAÇÃO | 125<br>131 | 11,97<br>10,11      | 2,44<br>1,96              |
| 3           | 1,20          | 25-30            | 9,66              | CONTROLE<br>RECUPERAÇÃO | 137<br>150 | 8,16<br>5,08        | 4,05<br>2,29              |
| 4           | 1,05          | 25-30-35         | 9,62              | CONTROLE<br>RECUPERAÇÃO | 134<br>147 | 11,87<br>9,27       | 6,03<br>4,28              |
| 5           | 1,45          | 25-30            | 19,01             | CONTROLE<br>RECUPERAÇÃO | 120<br>123 | 13,34<br>10,11      | 3,81<br>2,82              |
| 6           | 0,75          | 28               | 6,48              | CONTROLE<br>RECUPERAÇÃO | 145<br>149 | 6,32<br>5,66        | 4,39<br>3,84              |
| MÉDIA $\pm$ |               |                  |                   | CONTROLE                |            | 10,01<br>$\pm 1,13$ | 3,92<br>$\pm 0,52$        |
|             |               |                  |                   | RECUPERAÇÃO             |            | 8,02*<br>$\pm 0,90$ | 2,99*<br>$\pm 0,37$       |

Velocidade de perfusão média =  $26,89 \pm 1,61$  nl/min

Vr = volume de fluido reabsorvido

\* =  $p < 0,05$  teste t pareado de Student

TABELA 3

EFEITO DA VASOPRESSINA SOBRE A PERMEABILIDADE OSMOTICA (Posm) DE DUCTOS COLETORES PAPILARES ANTES E DEPOIS DA CONSERVAÇÃO "IN VITRO" COM COLLINS COM MAGNÉSIO (GRUPO II) A 10°C DURANTE 30 MINUTOS.

| EXP.        | COMP.<br>mm | DIAM.<br>micra | AREA<br>10-4cm <sup>2</sup> | PERIODO                 | GRAD.OSM.<br>mOsm | Vr<br>nl/<br>min | Pos<br>10-5<br>seg.a |
|-------------|-------------|----------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------|------------------|----------------------|
| 1           | 1,13        | 25             | 8,84                        | CONTROLE<br>RECUPERAÇÃO | 133<br>147        | 6,39<br>4,91     | 3,5<br>2,4           |
| 2           | 0,63        | 28             | 5,40                        | CONTROLE<br>RECUPERAÇÃO | 150<br>164        | 6,61<br>1,87     | 5,3<br>1,3           |
| 3           | 1,13        | 25-33          | 13,53                       | CONTROLE<br>RECUPERAÇÃO | 115<br>133        | 8,65<br>6,06     | 3,6<br>2,2           |
| 4           | 1,05        | 25-30          | 16,18                       | CONTROLE<br>RECUPERAÇÃO | 82<br>122         | 12,16<br>7,79    | 5,9<br>2,5           |
| 5           | 1,25        | 25             | 9,71                        | CONTROLE<br>RECUPERAÇÃO | 118<br>130        | 9,74<br>6,44     | 5,4<br>3,3           |
| 6           | 1,25        | 23-28          | 16,70                       | CONTROLE<br>RECUPERAÇÃO | 97<br>106         | 18,30<br>13,60   | 7,3<br>5,0           |
| 7.          | 1,25        | 25-28          | 13,37                       | CONTROLE<br>RECUPERAÇÃO | 144<br>155        | 7,53<br>4,71     | 2,5<br>1,4           |
| MÉDIA ± EPM |             |                |                             | CONTROLE                |                   | 9,91<br>±1,59    | 4,6<br>±0,6          |
|             |             |                |                             | RECUPERAÇÃO             |                   | 6,48<br>±1,38    | 2,6<br>±0,4          |

Velocidade de perfusão média =  $22,98 \pm 1,66$  nl/min

Vr = volume de fluido absorvido

\* = p < 0,05 teste t pareado de Student

TABELA 4

EFEITO DA VASOPRESSINA SOBRE A PERMEABILIDADE OSMOTICA (Posm) DE DUCTOS COLETORES PAPILARES ANTES E DEPOIS DE CONSERVAÇÃO "IN VITRO" COM EURO-COLLINS (SEM MAGNÉSIO) (GRUPO III) A 10°C DURANTE 30 MINUTOS.

| EXP.        | COMP.<br>mm | DIAM.<br>micra | AREA<br>10-4cm <sup>2</sup> | PERIODO                 | GRAD.OSM.<br>mOsm | Vr<br>nl/<br>min | Posm<br>10-5<br>seg. |
|-------------|-------------|----------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------|------------------|----------------------|
| 1           | 1,25        | 25             | 9,81                        | CONTROLE<br>RECUPERAÇÃO | 128<br>131        | 4,31<br>4,43     | 2,5<br>2,5           |
| 2           | 1,00        | 25-30          | 8,44                        | CONTROLE<br>RECUPERAÇÃO | 145<br>128        | 6,21<br>8,46     | 3,5<br>5,2           |
| 3           | 1,32        | 25-30          | 20,81                       | CONTROLE<br>RECUPERAÇÃO | 130<br>121        | 8,80<br>9,07     | 2,5<br>2,5           |
| 4           | 1,00        | 20-25          | 11,98                       | CONTROLE<br>RECUPERAÇÃO | 147<br>153        | 4,90<br>4,24     | 1,8<br>1,7           |
| 5           | 1,30        | 25-30          | 17,90                       | CONTROLE<br>RECUPERAÇÃO | 143<br>145        | 11,36<br>9,79    | 2,8<br>2,5           |
| 6           | 1,15        | 25-30          | 16,49                       | CONTROLE<br>RECUPERAÇÃO | 94<br>90          | 13,73<br>11,67   | 5,8<br>5,2           |
| MÉDIA ± EPM |             |                |                             | CONTROLE                |                   | 8,22<br>±1,54    | 3,5<br>±0,5          |
|             |             |                |                             | RECUPERAÇÃO             |                   | 7,94<br>±1,22    | 3,5<br>±0,5          |

Velocidade de perfusão média =  $24,10 \pm 2,16$  nl/min

Vr = volume de fluido reabsorvido.

TABELA 5

EFEITO DO AMPc SOBRE A PERMEABILIDADE OSMOTICA ( $P_{osm}$ ) DE DUCTOS COLETOR PAPILARES ANTES E DEPOIS DA CONSERVAÇÃO "IN VITRO" COM COLÍNS COM MAGNÉS (GRUPO IV) A 10°C DURANTE 30 MINUTOS.

| EXP.        | COMP.<br>mm | DIAM.<br>micra | AREA<br>10-4cm <sup>2</sup> | PERIODO                 | GRAD.OSM.<br>mOsm | Vr<br>nl/<br>min | P <sub>os</sub><br>10-5c<br>seg.a |
|-------------|-------------|----------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------|------------------|-----------------------------------|
| 1           | 1,20        | 25-30          | 18,06                       | CONTROLE<br>RECUPERAÇÃO | 105<br>96         | 11,23<br>12,37   | 3,85<br>4,66                      |
| 2           | 1,28        | 25             | 10,01                       | CONTROLE<br>RECUPERAÇÃO | 117<br>102        | 12,21<br>10,77   | 6,80<br>6,90                      |
| 3           | 0,88        | 20-25          | 9,23                        | CONTROLE<br>RECUPERAÇÃO | 153<br>146        | 7,19<br>8,20     | 3,33<br>3,97                      |
| 4           | 1,18        | 25-30          | 10,40                       | CONTROLE<br>RECUPERAÇÃO | 135<br>143        | 10,33<br>8,08    | 4,80<br>3,55                      |
| 5           | 1,40        | 20-25          | 15,24                       | CONTROLE<br>RECUPERAÇÃO | 141<br>131        | 11,30<br>11,66   | 3,42<br>3,83                      |
| MÉDIA ± EPM |             |                |                             | CONTROLE                |                   | 10,45<br>±0,88   | 4,44<br>±0,64                     |
|             |             |                |                             | RECUPERAÇÃO             |                   | 10,22<br>±0,88   | 4,58<br>±0,61                     |

Velocidade de perfusão média =  $28,32 \pm 1,31$  nl/min  
Vr = Volume de fluido reabsorvido

TABELA 6

COMPARAÇÃO DA VARIAÇÃO DA PERMEABILIDADE OSMÓTICA (Posm) ANTES E DEPOIS DA PRESERVAÇÃO "IN VITRO" DE DUCTOS COLETORES PAPILARES EXPOSTOS A DIFERENTES SOLUÇÕES CONSERVADORAS A 10°C DURANTE 30 MINUTOS.

| EXP. | COLLINS COM Mg2+<br>%Variação | COLLINS SEM Mg2+<br>%Variação | COLLINS COM Mg2+ Ringer-bicarbonato<br>%Variação | Ringer-bicarbonato<br>%Variação |
|------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------|
|      | VASOPRESSINA                  | VASOPRESSINA                  | AMP                                              | VASOPRESSINA                    |
| 1    | - 31                          | 0                             | + 21                                             | 0                               |
| 2    | - 74                          | + 54                          | + 1                                              | - 20                            |
| 3    | - 39                          | + 11                          | + 19                                             | - 43                            |
| 4    | - 57                          | - 17                          | - 26                                             | - 29                            |
| 5    | - 40                          | - 15                          | + 12                                             | - 26                            |
| 6    | - 32                          | - 12                          |                                                  | - 13                            |
| 7    | - 42                          |                               |                                                  |                                 |
| X    | - 45,00                       | + 3,50                        | +5,40                                            | -21,83                          |
| EPM  | 5,81                          | 10,99                         | 8,59                                             | 5,99                            |

% Variação =  $\frac{\text{Posm controle} - \text{Posm recuperação}}{\text{Posm controle}} \cdot 100$

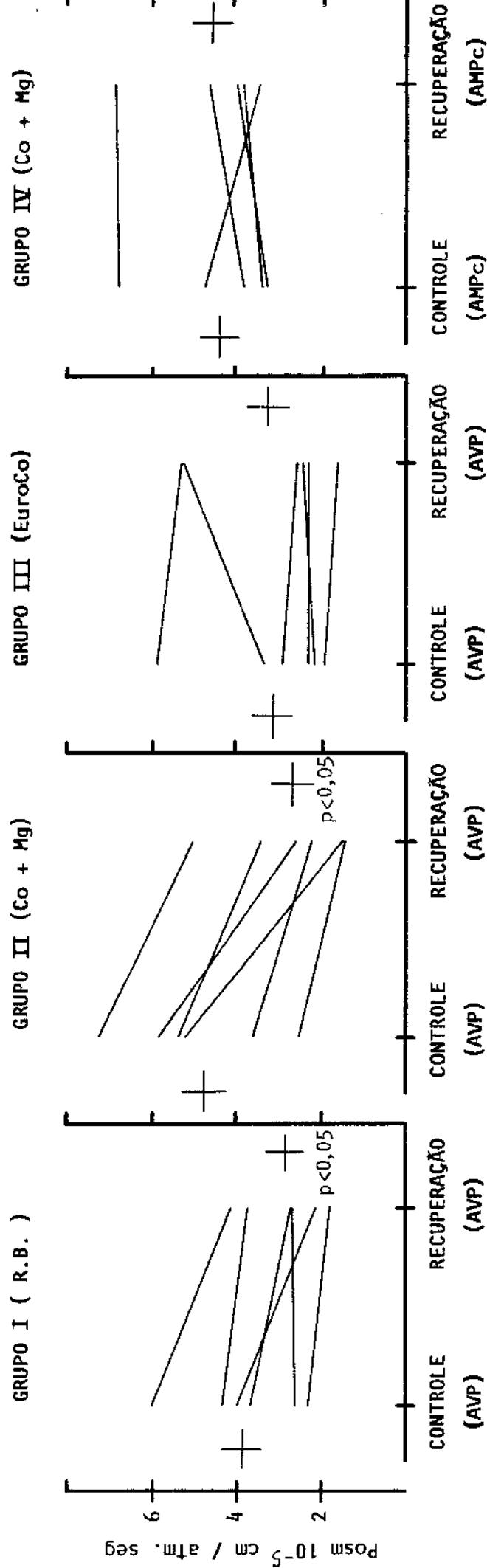
Análise de variância por postos: Teste de KRUSKAL - WALLIS

Hcal = 15,96      Hcrit = 7,82      p<0,01

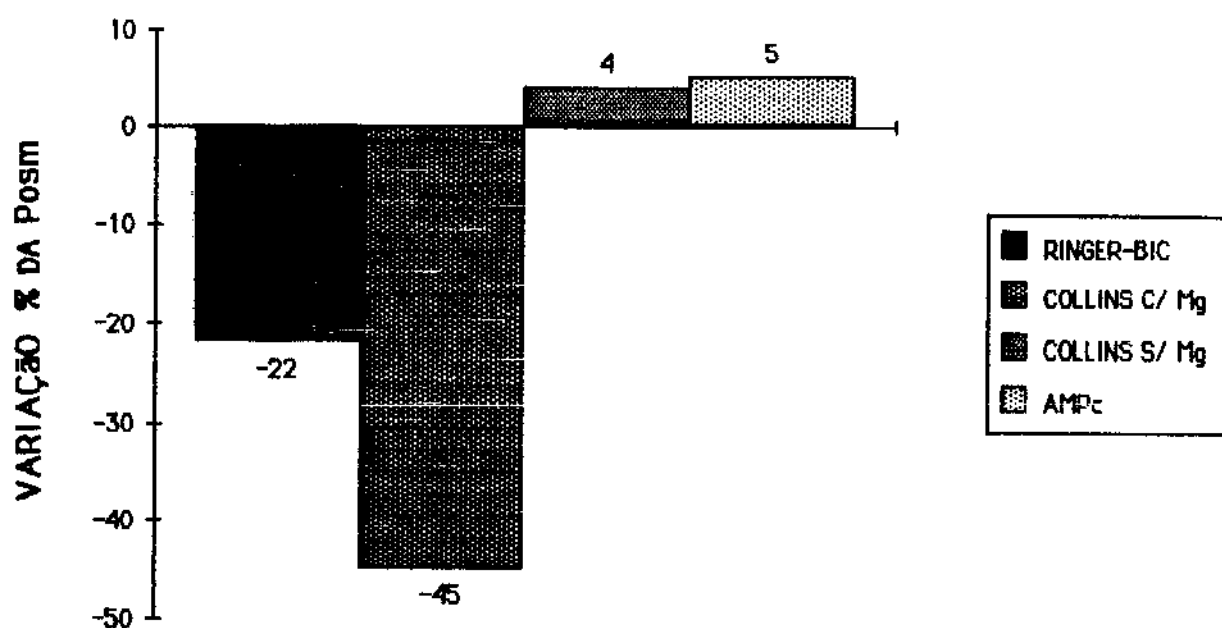
Diferenças significantes :

Collins + vasopressina x Collins sem Mg2+ + vasopressina      p<0,05

Collins + vasopressina x Collins + AMPc      p<0,05



# PERFUSÃO DO EPITÉLIO "IN VITRO"



COLLINS + VASOPRESSINA X COLLINS s/ MG + VASOPRESSINA  $p < 0,05$   
 COLLINS + VASOPRESSINA X COLLINS + AMPc  $p < 0,05$

GRÁFICO 2 - COMPARAÇÃO DA VARIAÇÃO (%) DA PERMEABILIDADE OSMÓTICA ( $P_{osm}$ ) DOS DUCTOS COLETORES PAPILARES DOS DIFERENTES GRUPOS CONSERVADOS "in vitro".

# REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

- 1- ABRAMOW, M.; BEAUWENS, R.; COGAN, E. - Cellular events in vasopressin action. Kidney Int., 32 (suppl.21):556 - 566, 1987.
  
- 2- ACQUATELLA H., PEREZ-GONZALES M., MORALES J.M., WHITTERBURY G.- Ionic and histological changes in the kidney after perfusion and storage for transplantation. Transplantation 14:480 - 489, 1972.
  
- 3- ALESENKO, A.V.; BILENKI, M.B.; BUDAKOVA, E.B.; MALINAR, A.A.; UCHITEL, A.E.; SHELENKOVA, L.N. - Study of the peroxide level and lipid antioxidant activity in ischemic and preserved kidneys. Chem Abstr 86: 67154w, 1977.
  
- 4- ALDIA, R.C.; PENGELLEY, E.T. ; BOLEN, J.L.; ROUSER, G. - Change in phospholipid composition in hibernating ground squirrel, *Citellus lateralis* and their relationship to membrane function at reduced temperature. Lipid 9: 993-999, 1974.
  
- 5- ALTURA, B.M. & ALTURA, B.T.- Magnesium ions and contraction of vascular smooth muscles: relationship to some vascular diseases. Fed. Proc., 40: 2672, 1981.



- 6- ANAISE, D.; LANE, B; WALTZER, W.C.; RAPAPORT, F.T. - The protective effect of calcium inhibitors and of captopril on the renal microcirculation during reperfusion. Transplantation, 43: 128 - 133, 1987.
  
- 7- ANDO, Y; JACOBSON, H.R.; BREYER, M.D. - Phorbol ester and A23187 have additive but mechanistically separate effects on vasopressin action in rabbit collecting tubule. J. Clin. Invest. 81: 1578 - 1584, 1988.
  
- 8- ANDO, Y.; BREYER, M.D.; JACOBSON, H.R. - Dose-dependent heterogenous actions of vasopressin in rabbit cortical collecting ducts. Am. J. Physiol., 256: F556 - F562, 1989.
  
- 9- ANDREWS P.M.; COFFEY A.K. - Factors that improve the preservation of nephron morphology during cold storage. Laboratory Investigation 46: 100 - 120.
  
- 10- ASAI, J.; BLONDEN, G.A. VAIL, W.J.; GREEN, D.E. - The mechanism of mitochondrial swelling. IV Configurational changes during swelling of beef heart mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 132: 524 - 544, 1969.
  
- 11- ATARASHI, K.; MATSUOKA, H.; TAKAGI, M.; SUGIMOTO, T. - Magnesium ion: a possible physiological regulator of aldosterone production. Life Science, 44: 1483 - 1487, 1989.

- 12- ATKINSON, D.E. - Cellular Energy metabolism and its Regulation. Academic Press, New York, 1977.
  
- 13- AUSIELLO, D.A. & HALL, D. - Regulation of vasopressin - sensitive adenylate cyclase by calmodulin. J. Bio. Chem., 256: 9796 - 9798, 1981.
  
- 14- AUSIELLO, D.A.; SKORECKI, K.L.; VERKMAN, A.S. ; BONVENTRE, J.V. - Vasopressin signaling in kidney cells. Kidneys Int., 31:521 - 529, 1987.
  
- 15- BANDER, S.J.; BUERKERT, J.E.; MARTIN, D.; KLAHR S. - Long-term effects of 24-hr unilateral obstruction on renal function in the rat. Kidney Int., 28: 614 - 620, 1985.
  
- 16- BANKIR, L. & ROUFFIGNAC, C. de - Urinary concentrating ability: insights from comparative anatomy. Am. J. Physiol., 249: R643 - R666, 1985.
  
- 17- BARBER, A.A.; BERNHEIM, F. - Lipid peroxidation: its measurement, occurrence and significance in animal tissues. Adv. Gerontol. Res. 2: 355, 1967.
  
- 18- BARRY, J.M.; FISCHER, S.; LIEBERMAN, C.; FUCHS, E.F. - Successful human kidney preservation by intracellular electrolyte flush followed by cold storage for more than 48 hours. THE J. UROL., 129: 473 - 474, 1983.

- 19- BELZER, F.O.; ASHLBY, B.S.; DUMPHY, J.E. - 24 hour preservation of canine kidney. Lancet 2: 536 - 539, 1967.
- 20- BELZER, F.O.; HOFFMANN, R.; HUANG, J.; DOWNES, G. - Endothelial damage in perfused dog kidney and cold sensitivity of vascular Na-K-ATPase. Cryobiology 9: 457 - 460, 1972.
- 21- BELZER, F.O. - Renal preservation. N. Engl J Med. 291: 402 - 404, 1974.
- 22- BELZER, F.O. ; HOFFMAN, R.M. ; SENZIG, K.A.; SOUTHARD J.H. - Perfusion preservation of canine kidneys. In Organ Preservation III. Edited by D.L. Pegg and Ib. A. Jacobsen, Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 207 - 219, 1979.
- 23- BELZER, F.O. ; SOUTHARD, J.H. - The future of kidney preservation. Transplantation, 30: 161 - 165, 1980.
- 24- BELZER, F.O.; HOFFMANN, R.M. ; SOUTHARD, J.H. - Aerobic and anaerobic perfusion of canine kidney with a new perfusate. In Organ Preservation: Basic and Applied Aspects, edited by D.E. Pegg, Ib. A. Jacobsen, and M.A. Halasz. MTP Press Ltd., Lancaster, England, pp. 253 - 260, 1982.
- 25- BELZER, F.O.; GLASS, N.R.; SOLLINGER, H.W.; HOFFMANN, R.M.; SOUTHARD, J.H. A new perfusate for kidney preservation. Transplantation, 33: 322 - 323, 1982.

- 26- BELZER, F.O.; SOLLINGER, H.W.; GLASS, N.R.; MILLER, D.T.;  
HOFFMANN, R.M.; SOUTHARD, J.H. - Beneficial effects of  
adenosine and phosphate in kidney preservation.  
Transplantation, 36: 633 - 635, 1983.
- 27- BELZER, F.O.; SOUTHARD, J.H. - Organ preservation and  
transplantation. Approaches to graft rejection. Alan  
R. Liss, Inc., pp. 291 - 303, 1986.
- 28- BELZER, F.O.; & SOUTHARD, J.H. - Principles of solid-organ  
preservation by cold storage. Transplantation, 45: 673 -  
676, 1988.
- 29- BENNETT, W.M.; BARRY, J.M.; NORMAN, D.J.; ELLIOTT, W.C. -  
Tubular transport capacity in human kidney cortex slices  
after prolonged preservation in Collins 2 solution. Urology,  
19 (6): 626 - 627, 1982.
- 30- BERRIDGE, M.J. & IRVINE, R.F. - Inositol triphosphate, a  
novel second messenger in cellular signal transduction.  
Nature, 312: 315 - 321, 1984.
- 31- RESARAB, A.; MARTIN, G.B.; MEAD, T.; JARREL, B.; WESSON, L. -  
Effect of plasma proteins and buffer in flushing solutions  
on rat kidney preservation by cold storage. Transplantation,  
37: 239 - 245, 1984.

- 32- BLIDE, T.; DAHLAGER, J.I. - The effect of chlorpromazine pretreatment on the vascular resistance in kidney following warm ischemia. Scand. J. Urol. Nephrol. 11: 21, 1977.
- 33- BILDE, T.; DAHLAGER, J.I.; ASNAES, S.; JOGHETE. - The effects of chlorpromazine pretreatment on renal function and pathology in kidneys damaged by warm ischemia. Scand. J. Urol. Nephrol. 11: 17 - 20, 1977.
- 34- BOIME, I.; SMITH, E.E.; HUNTER, F.E. Jr. - The role of fatty acids in mitochondrial changes during liver ischemia. Arch. Biochem. Biophys. 139: 425 - 443, 1970.
- 35- BONOMINI, V. - Advances in renal transplantation: Introductory remarks. Kidney Inter., 23 (4): S-1, 1983.
- 36- BRADY, H.; RYAN, M.; HORGAN, J. - Magnesium: the forgotten cation. Irish Med. J., 80 (9): 250 - 253, 1987.
- 37- BRESLER, E.H. - A model for transepithelial fluid transport. Am. J. Physiol., 235 (6): F 626 - F 637, 1978.
- 38- BREZIS, M.; ROSEN, S.; SILVA, P.; EPSTEIN, F.H. - Selective vulnerability of the medullary thick ascending limb to anoxia in the isolated perfused rat kidney. J. Clin. Invest., 73: 182 - 190, 1984.

- 39- BREZIS,M.; ROSEN,S. ; SILVA,P.; EPSTEIN, F.H. - Transport activity modifies thick ascending limb damage in the isolated perfused kidney. Kidney Int. 25: 65 - 72, 1984.
- 40- BREZIS,M.; ROSEN, S.; SILVA,P; SPOKES,K.; EPSTEIN, F.H. - Polyene toxicity in renal medulla: Injury mediated by transport activity. Science, 224: 66 - 68, 1984.
- 41- BREZIS,M.; ROSEN,S.; SPOKES,K.; SILVA,P.; EPSTEIN, F.H. - Transport-dependent anoxic cell injury in the isolated perfused rat kidney. Am.J.Pathol., 116: 327 - 341, 1984.
- 42- BREZIS,M.; SHANLEY,P.; SILVA,P.; SPOKES,K.; LEAR,S.; EPSTEIN,F.H.; ROSEN,S. - Disparate mechanisms for hypoxic cell injury in different nephron segments. J.Clin. Invest. 76: 1796 - 1806, 1985.
- 43- BROSTOM, C.O.; BROSTOM, M.A.; WOLFF,D.J. - Calcium-dependent adenylate cyclase from rat cerebral cortex. J.Biol.Chem., 252 (16): 5677 - 5685, 1977.
- 44- BRY,W.I.; COLLINS,G.M.; HALASZ,N.A.; JELLINEK,M. - Improved function of perfused rabbit kidneys by prevention of oxidate injury. Transplant. 38 (6): 579 - 582, 1984.
- 45- BUHL,M.R.; KEMP,G.; KEMP,E. - Hypoxanthine excretion during preservation of rabbit kidneys for transplantation. Transplantation , 21: 460 - 467, 1976.

- 46-BULGER,R.E.; LORENTZ,W.D.;COLINDRES,R.E.; GOTTSCHALK,C.W.  
- Morphologic changes in rat renal proximal tubules and  
their tight junctions with increased intraluminal pressure.  
Lab. Invest., 30 (2): 136 - 144,1974.
- 47- BURG,M.; GRANTHAM, J. ; ABRAMOW,M.; ORLOFF,J. -  
Preparation and study of fragments of single rabbit  
nephrons. Am.J. Physiol., 210: 1293 - 1966.
- 48- BURG,M.B.; ORLOFF,J. - Control of fluid absorption in  
the renal proximal tubule. J.Clin.Invest., 47: 2016 - 2024,  
1968.
- 49- BURG,M.B.; ORLOFF,J. - Electrical potential difference  
across proximal convoluted tubules. Am.J.Physiol., 219 (6):  
1714 - 1716, 1970.
- 50- BURG,M.B. - Perfusion of isolated renal tubules. Yale  
J.Biol.Med., 45: 321, 1972.
- 51- CALNE,R.Y.; PEGG,D.E.; PRYSE-DAVIES,J.; BROWN,F.L. -  
Renal preservation by ice-cooling. Brit.Med.J 2: 651 - 655,  
1963.
- 52- CAMPBELL,R.J.; WOODWARD,G.; BORBERG,U. - Calcium-  
mediated interactions between the antidiuretic hormones and  
renal plasma membranes. J.Biol.Chem.,247: 6167 - 6175, 1972.

- 53- CERRA, F.B.; RAZA, S.; ANDRES, G.A.; SIEGEL, J.H. - The endothelial damage of pulsatile renal preservation and its relationship to perfusion pressure and colloid osmotic pressure. Surgery, 81: 534 - 541, 1977.
- 54- COFFEY, A.K.; ANDREWS, P.M. - Ultrastructure of kidney preservation: varying the amount of an effective osmotic agent in isotonic and hypertonic preservation solutions. Transplantation, 35: 136 - 143, 1983.
- 55- CHAN, S.H.F.; HIGGINS, F.Jr. - Uncoupling activity of endogenous free fatty acids in rat liver mitochondria. Can. J. Biochem. 56: 111 - 116, 1978.
- 56- CHARNAC, J.S. - Membrane lipid phase transitions a possible biological response to hibernation. In strategies in cold edited by L.C.H. Wang and J.W. Hudson. Academic Press. New York. pp. 417 - 460, 1978.
- 57- CHEUNG, J.Y.; CONSTANTINE, J.M.; BONVENTRE, J.V. - Regulation of cytosolic free calcium concentration in cultured renal epithelial cells. Am. J. Physiol., 251: F690 - F701, 1986.
- 58- CLARK, E.A.; OPELZ, G.; MICKEY, M.R.; TERASAKI, F.I. - Evaluation of Belzer and Collins kidney-preservation methods. Lancet, 1: 361 - 363, 1973.



59- COGAN, E. & ABRAMON, M. - Inhibition by lithium of the hydroosmotic action of vasopressin in the isolated perfused cortical collecting tubule of the rabbit. J. Clin. Invest., 77: 1507 - 1514, 1986.

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

61- COLLINS, G.M.; HARTLEY, L.C.J.; CLUNIE, G.J.A. - Kidney preservation for transportation. Experimental analysis of optimal perfusate composition. Br. J. Surg., 59: 187 - 189, 1972.

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

63- COLLINS, G.M.; GREEN, R.D.; CARTER, J.N.; HALASZ, N.A. - Production of kidneys from warm ischemic injury. Transplantation, 31: 295 - 296, 1981.

64- COLLINS, G.M. - Current status of renal preservation by simple flushing and hypothermic storage. Renal preservation, vol. 8, Marberger, M. and Dreikorn, K. (Edits), Williams & Wilkins, Baltimore, pag. 224 - 243, 1983.

- 65- COLLINS, G.M.; BARRY, J.M.; MAXWELL, J.G.; SAMPSON, D.; WANDER WERF, B.A. - The value of magnesium in flush solutions for human cadaveric kidney preservation. The J.Urol., 131: 220 - 222, 1984.
- 66- COLLINS, G.M.; PETERSON, T.; WICOMB, W.N.; HALASZ, N.A. - Experimental observations on the mode of action of "intracellular" flush solution. J.Surg.Res., 36: 1-8, 1984.
- 67- DAHLAGER, J.I.; BILDE, T. - The integrity of tubular cell function after preservation in Collins or Sacks solution. Transplantation, 21(5): 365 - 369, 1976.
- 68- DILLINGHAM, M.A. - ATP generation is required for the maintenance of arginine vasopressin (AVP) stimulated hydraulic conductivity (Lp) in the rat cortical collecting tubule (CCT). Abstracts Xth Int.Con.of Nephrology, London, 26 -31, july: 250, 1987.
- 69- DILLINGHAM, M.A.; DIXON, B.S.; ANDERSON, R.J. - Calcium modulates vasopressin effect in rabbit cortical collecting tubule. Am.J.Physiol., 252: F115 - F121, 1987.
- 70- DONOHUE, J.F.; VENKATACHALAM, M.A.; BERNARD, M.B.; LEVINSKY, N.G. - Tubular leakage and obstruction after renal ischemia: Structural-functional correlations. Kidney Inter., 13: 208 - 222, 1978.

- 71- DOWNES,G.; HOFFMANN,R.M.; HUANG,J.; BELZER,F.O. - Mechanism of action of washout solutions for kidney preservation. Transplantation 16: 46 - 53, 1973.
- 72- DREIKORN,K.; HORSCH,R.; ROHL,L. - 48 to 96 hour preservation of canine kidneys by initial perfusion and hypothermic storage using the Euro-Collins. Eur.Urol., 6: 221 - 224, 1980.
- 73- DU BOIS,R.; VERNIORY,A.; ABRAMON,M. - Computation of the osmotic water permeability of perfused tubule segments. Kidney Int., 10: 478 - 479, 1976.
- 74- DUARTE,C.G. - Magnesium metabolism in potassium-depleted rats. Am.J.Physiol., 234 : F466 - F471, 1978.
- 75- DUBLINEAU,I.; ELALOUF,J.M.; PRADELLES,P.; ROUFFIGNAC,C. - Independent desensitization of rat renal thick ascending limbs and collecting ducts to ADH. Am.J.Physiol., 256: F656 - 663, 1989.
- 76- ENGBERG,A.; NORLEN,B.J.; KALLSKOG,S.; WOLLGAST,M. - Pathophysiology of renal ischemia. Renal preservation. vol.8, Marberger,M. and Dreikorn,k. (Edits), Williams & Wilkins, Baltimore, pag.1-20,1983.

- 77- FALKENSTEIN,D.; CONTI,G.T.; AJZEN,H.; DRAIBE,S.A.; FIGUEIREDO,J.F. - Properties of the isolated rabbit proximal convoluted tubule and pars recta after long-term storage in a modified Collins solution. Brazilian J. Med. Biol. Res., 15: 361 - 365, 1982.
- 78- FALKENSTEIN,D. - Estudos da ação conservadora de Collins em túbulos contornados e perfundidos "in vitro". Tese de Mestrado apresentada à Escola Paulista de Medicina em 1984.
- 79- FALKENSTEIN,D.; STELLA,S.R.; AJZEN,H.; DRAIBE,S.A.; FIGUEIREDO,J.F. - Estudo funcional de néfrons de coelho sob a ação de uma solução utilizada na preservação de rim para transplante. J. Bras. Nefrol., VI (1); 24 - 28, 1984.
- 80- FALKENSTEIN,D.- "Efeito de soluções conservadoras renais utilizadas no transplante clínico e experimental sobre a condutividade hidráulica de túbulos coletores corticais de coelho isolados e perfundidos "in vitro". Tese de Doutorado apresentada à Escola Paulista de Medicina em 1990.
- 81- FARRANT,J. - Mechanism of cell damage during freezing and thawing and its prevention. Nature, 205:1284 - 1287, 1965.
- 82- FERNANDO,A.R.; Enhanced preservation of the ischemic kidneys with inosine. Lancet, 1: 555 - 557, 1976.

83- FIGUEIREDO, J.F.; FALKENSTEIN, D.; DRAIBE, S.A.; SIGULEM, D.; RAMOS, O.L. - The effect of Collins solution on the function and structure of isolated proximal convoluted tubules from rabbit kidneys. Transplantation, 42: 80 - 83, 1986.

84- FIGUEIREDO, 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 cortical slices during storage in solutions used for kidney transplantation. Brazilian J. Med. Biol. Res. 19: 303 - 309, 1986.

85- FISHER, J.H.; ARMBRUSTER, D.; GREBE, W.; CZERNIAK, A.; ESSELHARD, W. - Effects of differences in substrate supply on the energy metabolism of hypothermically perfused canine kidneys. Cryobiology 17: 135 - 147, 1980.

86- FRIDOVICH, I. - The biology of oxygen radicals. Science, 201: 875 - 880, 1978.

87- FRINDT, G.; WINDHAGER, E.E.; TAYLOR, A. - Hydroosmotic response of collecting tubules to ADH or cAMP at reduced peritubular sodium. Am. J. Physiol., 243: F503 - F513, 1982.

88- FRÄDIN, L.; ENGBERG, A.; KALLSKOG, S.; WOLLGAST, M. - Renal transplantation in the rat. IV Cortical pressure gradients measured in vivo and during isolated perfusion with reference to renal function after transplantation. Scand J Clin Lab Invest., 35: 463 - 472, 1975.

89- FULLER, B. J.; LUNEC, J.; HEALING, G.; SIMPKIN, S.; GREEN, C. J. - Reduction of susceptibility to lipid peroxidation by desferrioxamine in rabbit kidneys subjected to 24-hour cold ischemia and reperfusion. Transplantation, 43: 604 - 606, 1987.

90- GAZITT, Y.; LOYTER, A.; CHAD, I. - Production of ATP depletion, intramembrane particle aggregation and exposure of membrane phospholipids of chicken erythrocytes by local tranquilizers. Biochim Biophys Acta, 471: 361 - 371, 1977.

91- GRABER, T. W. - Role of magnesium in health and disease. Comprehensive Ther., 13: 29 - 35, 1987.

92- GRANTHAM, J. J. & BURG, M. B. Effect of vasopressin and cyclic AMP on permeability of isolated collecting tubules. Am J Physiol, 211 (1): 255 - 259, 1966.

- 93- GREEN,C.J.; PEGG,D.E. - The effects of variations in electrolyte composition and osmolality of solutions for infusion and hypothermic storage of kidneys. In Organ Preservation II, edited by D.E.Pegg and Ib. A Jacobsen. Churchill Living-stone. Edinburgh,1979,pp.86-101.
- 94- GREEN,C.J.; HEALING,G.; LUNEC,J.; FULLER,B.J.; SIMPKIN,S. - Evidence of free-radical-induced damage in rabbit kidneys after simple hypothermic preservation and autotransplantation. Transplantation,41: 161 - 165, 1986.
- 95- HAGGAG,G.; RAHEEM,K.A.; KHALIL,F.- Hibernation in reptiles- I.Changes in blood electrolytes. Comp.Biochem.Physiol., 16: 457 - 465, 1965.
- 96- HALASZ,N.A.; COLLINS,G.M.- Forty-eight-hour kidney preservation. Arch surg., 111: 175 - 177, 1976.
- 97- HALL,D.A.& GRANTHAM,J.J. - Temperature effect on ADH response of isolated perfused rabbit collecting tubules. Am.J.Physiol., 239: F595 - F601, 1980.
- 98- 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, 1985.
- 99- HANDLER,J.S.- Antidiuretic hormone moves membranes. Am.J.Physiol.; 255: F375 - F382, 1988.

- 100- HANGAARD,N. - Cellular mechanisms of oxygen toxicity. Physiol.Rev. 48: 311 - 362, 1968.
- 101- HANLEY,M. - Isolated nephron segments in a rabbit model of ischemic acute renal failure. Am.J.Physiol.; 239: F17 - F23, 1980.
- 102- HANSEN,A.J. - Effect of anoxia on ion distribution in the brain. Physiol.Rev., 65: 101 - 148, 1985.
- 103- HARRIS, J.S. & DeMARIA,W.J.A. - Effect of magnesium sulfate on renal dynamics in acute glomerulonephritis in children. Pediatrics, 11: 191 - 205,1953.
- 104- HARVIG,B.; ENGBERG,A.; ERICSSON,J.L.E.- Effects of cold ischemia on the preserved and transplanted rat kidney. Virchows Arch.B.Cell Path.,34: 173 - 192, 1980.
- 105- HAYS, R.M.- Antidiuretic hormone. New Engl.J.Med., 295: 659 - 665,1976.
- 106- HAYS,R.M.; FRANKI,N ; DING,G. - Effects of antidiuretic hormone on the collecting duct. Kidney Int., 31: 530 - 537,1987.
- 107- HELOU,C.M.R.- Efeito da isquemia e métodos de preservação renal sobre a atividade da Na-K-ATPase, fosfatase alcalina e da incorporação de para-aminohipurato "in vitro": Estudos em rins humanos e de coelhos. São Paulo,1988. 113p. (Tese - Doutorado - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).



- 108- HENDERSON, L.W.; NOLPH, K.D.; FUSCHETT, J.B.; GOLDBERG, M.  
- Proximal tubular malfunction as a mechanism for diuresis  
after renal homotransplantation. N.Engl.J.Med., 278 (9): 467  
-473, 1968.
- 109- HILL, G.S.; LIGHT, J.A.; PERLOFF, L.J. - Perfusion-related  
injury in renal transplantation. Surgery, 79:440 - 447, 1976.
- 110- HOCHACHKA, F.W. - Defense strategies against hypoxia and  
hypothermia - Science, 231: 234 - 241, 1986.
- 111- HOFFMANN, R.M.; SOUTHARD, J.H.; LUTZ, M.; MACKETY, A.;  
BELZER, F.O. - Synthetic perfusate for kidney preservation.  
Arch.Surg., 118: 919 - 921, 1983.
- 112- HORSTER, M.F. & ZINK, H. - Functional differentiation of  
the medullary collecting tubule: Influence of vasopressin.  
Kidney Int. 22: 360 - 365, 1982.
- 113- HUANG, J.S. ; DOWNES, G.L.; BELZER, F.O. - Utilization of  
fatty acids in perfused hypothermic dog kidney. J.Lipid Res.  
12: 622 - 627, 1971.
- 114- HULBERT, A.J. & ELSE, P.L. - Comparison of the "mammal  
machine" and the "reptile machine": energy use and thyroid  
activity. Am.J.Physiol., 241: R350 - R356, 1981.

- 115- IMAI,M.; SELDIN,D.W.; KOKKO,J.P. - Effect of perfusion rate on the fluxes of water, sodium chloride and urea across the proximal convoluted tubule. Kidney Int., 11: 18 - 27, 1977.
- 116- IMAI,M.; TANIGUCHI,J.; Tabei,K. - Function of thin loops of Henle. Kidney Int., 31: 565 - 579, 1987.
- 117- ISERI,L.T. & FRENCH,J.H. - Magnesium: Nature's Physiologic calcium blocker. Am.Heart J., 108 (1):188 - 193, 1984.
- 118- JABLONSKI,P.; HOWDEN,B.; MARSHALL,V.; SCOTT,D. - Evaluation of citrate flushing solution using the isolated perfused rat kidney. Transplant., 30 (4): 239 - 243,1980.
- 119- JACKSON,D.C. & ULTSCH,G.R. - Acid-base consequences of long-term apneic cold torpor in turtles,*chrysemys picta bellii* (Abstract). Physiologist, 23: 71, 1980.
- 120- JACOBSON,H.R. - Transport characteristics of in vitro perfused proximal convoluted tubules. Kidney Int.,22(5): 425 - 433, 1982.
- 121- JAMART,J.; LAMBOTTE L.- Differential effect of swelling and anoxia on kidney function and its consequences on the mechanisms of action of intracellular organ preservation solutions. Transplantation,34: 176 - 182, 1982.

- 122- JAMART, J.; LAMBOTTE, L. - Efficiency and limitation of Euro-Collins solution in kidney preservation. J. Surg. Res., 34 (3): 195 - 204, 1983.
- 123- JAMISON, R. L. - Short and long loop nephrons. Kidney Int., 31: 597 - 605, 1987.
- 124- JOHNSON, R. W. G. - The effect of ischemic injury on kidneys preserved for 24 hours before transplantation. Br. J. Surg., 59: 765, 1972.
- 125- JOHNSTON, P. A.; RENNKE, H.; LEVINSKY, N. G. - Recovery of proximal tubular function from ischemic injury. Am. J. Physiol., 246: F159 - F166, 1984.
- 126- KACHADORIAN, W. A.; ELLIS, S. J.; MULLER, J. - Possible roles for microtubules and microfilaments in ADH action on toad urinary bladder. Am. J. Physiol., 236: F14 - F20, 1979.
- 127- KAPPUS, H. & SIES, H. - Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: Redox cycling and lipid peroxidation. Experientia, 37: 1233 - 1341, 1981.
- 128- KATZ, A. I. & DOUCET, A. - Calcium-activated adenosine triphosphatase along the rabbit nephron. Int. J. Biochem., 12: 125 - 129, 1980.
- 129- KATZ, A. I. - Distribution and function of classes ATPases along the nephron. Kidney Int., 29: 21 - 31, 1986.

- 130- KEELER, R.; SWINNEY, J.; TAYLOR, R. M. R.; ULBALL, P. R. - The problem of renal preservation. Brit. J. Urol., 38: 653 - 656, 1966.
- 131- KEMP, E.; CLARK, F. B.; ANDERSON, C. K.; LAURSEN, T.; PARSONS, F. M. - Low temperature preservation of mammalian kidneys. Scand. J. Urol. Nephrol., 2: 183 - 190, 1968.
- 132- KEMP, Jr. A.; GROOT, G. S. P.; REITSMA, H. J. - Oxidative phosphorylation as a function of temperature. Biochim. Biophys. Acta. 180: 28 - 34, 1969.
- 133- KINTER, L. B.; HUFFMAN, W. J.; STASSEN, F. L. - Antagonists of the antidiuretic activity of vasopressin. Am. J. Physiol., 254: F165 - F177, 1988.
- 134- KLEINZELLER, A. - Factors affecting the swelling of kidney cortex slices at 0°C. Biochim Biophys Acta, 43: 41 - 50, 1960.
- 135- KNEPPER, M. & BURG, M. - Organization of nephron function. Am. J. Physiol., 244: F579 - F589, 1983.
- 136- KNEPPER, M. A. & ROCH-RAMEL, F. - Pathways of urea transport in the mammalian kidney. Kidney Int., 31: 629 - 633, 1987.
- 137- KOKKO, J. P.; BURG, M. B.; ORLOFF, J. - Characteristics of NaCl and water transport in the renal proximal tubule. J. Clin. Invest., 50: 69 - 76, 1971.

- 138- KOKKO, J.P.; & RECTOR Jr., F.C. - Countercurrent multiplication system without active transport in inner medulla. Kidney Int., 2: 214 - 223, 1972.
- 139- KOKKO, J.P. - The role of the collecting duct in urinary concentration. Kidney Int., 31: 606 - 610, 1987.
- 140- KOTTRA, G.; FRÉMTER, E. - Functional properties of the paracellular pathway in some leaky epithelia. J. Exp. Biol., 106: 217 - 229, 1983.
- 141- KUSANO, E.; MURAYAMA, N.; WERNESS, J.L.; CHRISTENSEN, S.; HOMMA, S.; YUSUFI, A.N.K.; DOUSA, T.P. - Effects of calcium on the vasopressin-sensitive cAMP metabolism in medullary tubules. Am. J. Physiol., 249: F956 - F966, 1985.
- 142- LAMBOTTE, L. - Persistence of active and passive ionic transport during low-temperature liver preservation. Surgery, 73 (1): 8 - 14, 1973.
- 143- LEMLEY, K.V. & KRIZ, W. - Cycles and separations: The histotopography of the urinary concentrating process. Kidney Int., 31: 538 - 548, 1987.

- 144- LERNER, E.; SHUG, A. L.; ELSON, C.; SHRAGO, E. - Reversible inhibition of adenine nucleotide translocation of long chain fatty acid coenzyme A esters in liver mitochondria of diabetics and hibernating animals. J. Biol. Chem., 247: 1513 - 1519, 1972.
- 145- LEVINE, S. D. & JACOBY, M. The site of inhibition of water permeability after repeated vasopressin (VP) stimulation of toad urinary bladder. Kidney Int., 29: 419, 1986.
- 146- LEVY, M. M. - Oxygen consumption and blood flow in the hypothermic, perfused kidney. Am. J. Physiol., 197: 1111 - 1959.
- 147- LORENZEN, M.; TAYLOR, A.; WINDHAGER, E. E. - PH effect on osmotic response of collecting tubules to vasopressin and 8-CPT-cAMP. Am. J. Physiol., 245: F188 - F197, 1983.
- 148- LUND, P.; CORNELL, M. W.; KREBS, H. A. - Effect of adenosine on the adenine nucleotide content and metabolism of hepatocytes. Biochem. J., 152: 593 - 599, 1975.
- 149- LYTTON, B.; VAISBORT, V. R.; GLAZIER, W. B.; CHAUDRY, I. H.; BAUE, A. E. - Improved renal function using adenosine triphosphate-magnesium chloride in preservation of canine kidneys subjected to warm ischemia. Transplantation, 31: 187 - 189, 1981.

150- MACKNIGHT, A.D.C. & LEAF, A. - Regulation of cellular volume. Physiol. Rev., 57: 510 - 573, 1977.

151- MADSEN, K.M. & TISHER, C.C. - Structural-functional relationships along the distal nephron. Am. J. Physiol., 250: F1 - F15, 1986.

152- MAGALDI, A.J.B. - Estudo da incapacidade de concentração urinária do rim pós-isquêmico e da leptospirose experimental: Transporte de água e uréia no ducto coletor papilar perfundido "in vitro". São Paulo, 1981. 55p. (Tese Doutorado - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

153- MALIS, C.D. & BONVENTRE, J.V. - Mechanism of calcium potentiation of oxygen free radical injury to renal mitochondria. J. Biol. Chem., 261 (30): 14201 - 14208, 1986.

154- MARSH, D.C.; LINDELL, S.L.; FOX, L.E.; BELZER, F.O.; SOUTHARD, J.H. - Hypothermic preservation of hepatocytes. Cryobiology, 26: 524 - 534, 1989.

155- MARSHALL, V.C. - Renal preservation prior to transplantation. Transplantation, 30: 165 - 166, 1980.

156- MARTIN, D.R.; SCOTT, D.F.; DOWNES, G.L.; BELZER, F.O. - Primary cause of unsuccessful liver and heart preservation: cold sensitivity of the ATPase system. Am. Surg., 175: 111 - 117, 1972.

- 157- MATTHYS,E.; PATEL,Y.; KREISBERG,J.; STEWART,J.H;  
VENKATACHALAM,M. - Lipid alterations induced by renal  
ischemia: Pathogenic factor in membrane damage. Kidney Int.,  
26: 153 - 161, 1984.
- 158- Mc ANULTY,J.F.; PLOEG,R.J.; SOUTHARD,J.H.; BELZER,F.O.  
1- Successful five day perfusion preservation of the canine  
kidney. Transplantation, 47: 37 - 41, 1989.
- 159- McCORD,J.M. - Oxygen derived free radicals in  
postischemic tissue injury. New Engl.J.Med., 312: 159 -  
163,1985.
- 160- Mc MURCHIE,E.J.; RAISON,J.K. - Membrane lipid fluidity  
and its effects on the activation energy of membrane  
associated enzymes. Biochim.Biophys.Acta 554: 364 - 374,  
1979.
- 161- MITTNACHT,S.Jr.; SHERMAN,J.C.; FARBER,J.L. - Reversal  
of ischemic mitochondrial dysfunction. J.Biol.Chem., 254:  
9871 - 9875, 1979.
- 162- MOEN,J.; CLAESSON,K.; PIENNAAR,H.; LINDELL,S.;  
PLOEG,R.J.; McANULTY,J.F.; P.VREUGDENHIL; SOUTHARD,J.H.;  
BELZER,F.O. - Preservation of dog liver, kidney, and  
pancreas using the Belzer - UW solution with a High-Sodium  
and Low-Potassium content. Transplantation, 47: 940 - 945,  
1989.



- 163- MOREL, F. - Sites of hormone action in the mammalian nephron. Am.J.Physiol., 240: F159 - F164, 1981.
- 164- MOREL, F. & DOUCET, A. - Hormonal control of kidney functions at the cell level. Physiol.Rev., 66 (2):377 - 467, 1986.
- 165- MOREL, F.; IMBERT-TEBOUL, M.; CHABARDÉS, D. - Receptors to vasopressin and other hormones in the mammalian kidney. kidney Int., 31: 512 - 520, 1987.
- 166- MORGAN, D.B. - Assessment of renal tubular function and damage and their clinical significance. Annals Clin.Biochem., 19: 307 - 313, 1982.
- 167- NORLEN, B.J.; ENGBERG, A.; KALLSKOG, S.; WOLLGAST, M. - Nephron function of the transplanted rat kidney. Kidney Inter., 14: 10 - 20, 1978.
- 168- OISHI, R. - Estudo da conservação renal por diversas técnicas: I- Avaliação da função do túbulo contornado proximal pela microperfusão "in vitro". II- Estudo da distribuição de soluções no parênquima renal pela técnica de Hanssen modificada. São Paulo, 1987. 56p. (Tese - Mestrado - Escola Paulista de Medicina).
- 169- OISHI, R. - Comunicação pessoal: Endotelina inibe a condutividade hidráulica em resposta à AVP em túbulo coletor papilar de rato. 1989.

- 170- OPELZ,G. & TERASAKI,P.I. - Kidney preservation: Perfusion versus cold storage - 1975. Transplant.Proc., 8: 121 - 125,1976.
- 171- PARKS,D.A.; BULKLEY,G.B.; GRANGER,D.N. - Role of oxygen free radicals in shock, ischemia and organ preservation. Surgery, 94: 428 - 432, 1983.
- 172- PEGG,D.E.; FARRANT,J. - Vascular resistance and edema in the isolated rabbit kidney perfused with free cell solution. Cryobiology 6: 200 - 210, 1969.
- 173- PEGG,D.E. - The water and cation content of non-metabolizing perfused rabbit kidneys. Cryobiology. 14: 160 - 167, 1977.
- 174- PEGG,D.E.; JACOBSEN,I.A.; WALTER, C.A.- Hypothermic perfusion of rabbit kidneys with solutions containing gelatin polypeptide. Transplantation, 24: 29 - 38, 1977.
- 175- PEGG,D.E. - Progress in Transplantation, cap.4. - Principles of tissue preservation. In: Progress in Transplantation. Morris,J.P. and Tilney,N.L. (eds), Churchill Livingstone. Edimburg - London - N. York.- pp.69 - 105, 1986.

- 176- PETERSON, M.J. & EDELMAN I.S. - Calcium inhibition of the action of vasopressin on the urinary bladder of the toad. L. Clin. Invest., 43: 583 - 594, 1964.
- 177- PIRIE, S.C.; POTTS, D.J. - Proximal tubule function after cold preservation of kidney tissue for up to 48 hours. IXth International Congress of Nephrology, Los Angeles, pag. 488A, 1984.
- 178- PIRIE, S.C. & POTTS, D.J. - Application of cold flush preservation to "in vitro" microperfusion studies of kidney tubules. Kidney Int., 28: 982 - 985, 1985.
- 179- PIRIE, S.C. & POTTS, D.J. - A comparison of the relative effectiveness of three transplant preservation fluids upon the integrity and function of rabbit proximal convoluted tubules perfused "in vitro". Clin. Sci., 70: 443 - 452, 1986.
- 180- FLOEG, R.J.; GOOSSENS, D.; McANULTY, J.F.; SOUTHARD, J.H.; BELZER, F.O. - Successful 72-hour cold storage of dog kidneys with UW solution. Transplantation, 46: 191 - 196, 1988.
- 181- RAISON, J.K. - The influence of temperature-induced phase changes on the kinetics of respiratory and other membrane-associated enzyme systems. Bioenergetics, 4: 285 - 309, 1973.

- 187- RIJMANS, B.G.; VAN DER WIJK, J.; DONKER, A.J.M.; SLOOFF, M.J.H.; KOOTSTRA, G. - Functional studies in 6 days successful preserved canine kidneys. J.Urol., 127: 163 -166, 1982.
- 188- RIJCMANS, B.G.; BUURMAN, W.A.; KOOTSTRA, G. - Six day canine kidney preservation. Hypothermic perfusion combined with isolated blood perfusion. Transplantation, 37: 130 - 134 , 1984.
- 189- ROCHA, A.S. & KOKKO, J.P. - Sodium chloride and water transport in the medullary thick ascending limb of henle. Evidence for active chloride transport. J.Clin. Invest. 52: 612 - 623, 1973.
- 190- ROCHA, A.S.; KOKKO, J.P. - Permeability of medullary nephron segments to urea and water: Effects of vasopressin. Kidney Int., 6: 379 - 387, 1974.
- 191- ROCHA, A.S. - Heterogeneidade funcional do ducto coletor: Transporte de sódio e cloro. Efeito do lítio sobre a permeabilidade à água. São Paulo, 1979. (Tese - Livre Docência livre - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.)

- 192- ROCHA,A.S.; KUDO,L.H. - Water, urea, sodium, chloride, and potassium transport in the "in vitro" isolated perfused papillary collecting duct. Kidney Int., 22: 485 - 491, 1982.
- 193- RODBELL,M. - The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. Nature, 284: 17 - 22, 1980.
- 194- ROHR,M.S. - Renal allograft acute tubular necrosis. II A light and electron microscopic study of biopsies taken at procurement and after revascularization. Annals Surgery, 197 (6): 663 - 671, 1983.
- 195- ROSS,I.; MARSHALL,V.C.; ESCOTT,M.L. - 72 hours canine kidney preservation without continuous perfusion. Transplantation 21: 498 - 501, 1976.
- 196- ROOS,I.; FERRACIN,F.; PLETSCHER,A. - Interaction of vasopressin with human blood platelets: dependency on Mg<sup>2+</sup>. Thromb.Haemost., 56 (3): 260 - 262, 1986.
- 197- RÖTH,E.; TÖRK,B. - Histological features of stored kidneys and sample hypothermic perfusion with preserving solutions of different types. Inter. Urol.Nephrol., 6: 243 - 252, 1974.
- 198- ROY,C. & AUSIELLO,D.A.- Characterization of (8-Lysine) vasopressin binding sites on a pig kidney cell line (LLC-PK1). J.Biol.Chem., 256 (7): 3415 - 3422, 1981a.

- 199- ROY,C.; HALL,D.; KARISH,M.; AUSIELLO,D.A. Relationship of (8-Lysine) vasopressin receptor transition to receptor functional properties in a pig kidney cell line (LLC-PK1). J.Biol.Chem., 256 (7): 3423 - 3427, 1981b.
- 200- RULE,G.S.; ZRIM,J.; THOMPSON,J.E.; LEPOCK,J.R.; KRUVU,J. - The effects of membrane lipid perturbors on survival of mammalian cells to cold. Cryobiology, 15: 408 - 414, 1978.
- 201- SACHS,J.R. - Interaction of magnesium with the sodium pump of the human red cell. J.Physiol., 400: 575 - 591, 1988.
- 202- SACKS,S.A.; PETRITSCH,P.H.; KAUFMAN,J.J. - Canine kidney preservation using a new perfusate. Lancet I: 1024 - 1028, 1973.
- 203- SACKS,S.A.; WOO,Y.C.; SMITH,R.B.; EHRLICH,R.M.; KAUFMAN,J.J. - Magnesium: Not essential for renal preservation by initial perfusion and hypothermic storage. Transplant. Proc., 10: 287 - 291, 1978.
- 204- SANDS,J.M. & KNEPPER,M.A. - Urea permeability of mammalian inner medullary collecting duct system and papillary surface epithelium. J.Clin.Invest., 79: 138 - 147, 1987.

205- SANDS, J.M.; NONOGUCHI, H.; KNEPPER, M.A. - Vasopressin effects on urea and H<sub>2</sub>O transport in inner medullary collecting duct subsegments. Am. J. Physiol., 253: F823 - F832, 1987.

206- SANTIAGO-DELPIN, E.A. - Organ protection from ischemia: the use of pharmacological agents. Dial. Transplant., 8: 806 - 810, 1979.

207- SCARPA, A.; LINDSAY, J.C. - Maintenance of energy-linked functions in rat-liver mitochondria aged in the presence of nupercaine. Eur. J. Biochem., 27: 401 - 407, 1972.

208- SCHMIDT-NIELSEN, B. - The renal pelvis. Kidneys Int., 31: 621 - 628, 1987.

209- SCHWARTZ, M.M. & VENKATACHALAN, M.A. - Structural differences in thin limbs of Henle: Physiological implications. Kidney Int., 6: 193 - 208, 1974.

210- SCHWEIZER, R.T. & SUTPHIN, B.A. - Effect of different magnesium levels in kidney preservation perfusate. Transplantation, 34: 225 - 226, 1982.

211- SCHWEIZER, R.T.; SUTPHIN, B.A. - Kidney preservation failure using combined Collins solution and plasma perfusion. Transplantation, 36(1): 24 - 26, 1983.

212- SEEMAN,P. - The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. Pharmacol.Rev., 24: 583 - 655, 1972.

213- SESSO,R.; ANÇAO,M.S.; SIGULEM,D.; DRAIBE,S. - Relatório sobre os transplantes renais do Brasil - Grupo de estudo do sistema integrado de assistência ao renal crônico e transplante renal. (Sirc-Trans). - J.Bras.Nefrol., Vol.11, nº3, setembro de 1989.

214- SICK,T.J.; ROSENTHAL,M.; LaMANNA,J.C.; LUTZ,P.L. - Brain potassium ion homeostasis, anoxia, and metabolic inhibition in turtles and rats. Am.J.Physiol., 243: R281 - R288, 1982.

215- SIEGEL,S. - In: Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento. McGraw-Hill do Brasil: p197 - 219, 1981.

216- SKORECKI,K.L.; VERKMAN,A.S.; JUNG,C.Y.; AUSIELLO,D.A. - Evidence for vasopressin activation of adenylate cyclase by subunit dissociation. Am.J.Physiol., 250: C115 - C123, 1986.

217- SLATER,T.F. - Free radical mechanism in tissue injury. Pion Ltd., London, 1972.

218- SMITH, A.U. - Biological effects of freezing and supercooling. Edward Arnold. London, 1961.



- 219- SMITH, A.U. - Biological effects of freezing and Supercooling. Edward Arnold, London (Publishers)Ltd), 1961.
- 220- SNOWDOWNNE,K.W.; FREUDENRICH,C.C.; BORLE,A. - The effects of anoxia on cytosolic free calcium, calcium fluxes, and cellular ATP levels in cultured kidneys cells. J.Biol.Chem., 260 (21): 11619 - 11626, 1985.
- 221- SOLTOFF,S.P. & MANDEL,L.J. - Active ion transport in the renal proximal tubule: I- Transport and metabolic studies. J.Gen.Physiol.,84 (4): 601 - 622, 1984.
- 222- SOUTHARD,J.H.; HOFFMANN,R.M.; BELZER,F.O. - Energy metabolism in kidneys stored by simple hypothermia. Transplant.Proc., IX: 1535 - 1539, 1977.
- 223- SOUTHARD,J.H.; SENZIG,K.A.; BELZER,F.O. - Effects of hypothermia on canine kidney mitochondria. Cryobiology, 17: 148 - 153, 1980.
- 224- SOUTHARD,J.H.; SENZIG,K.A.; HOFFMAN,R.M.; BELZER,F.O. - Toxicity of oxygen to mitochondrial respiratory activity in hypothermically perfused canine kidneys. Transplantation, 29: 459 - 461, 1980.
- 225- SOUTHARD,J.H.; SENZIG,K.A.; HOFFMAN,R.; BELZER,F.O. - Denaturation of albumin: A critical factor in long-term kidney preservation. J.Surg.Research, 30: 80 - 85, 1981.

226- SOUTHARD, J.H.; HOFFMANN, R.M.; BELZER, F.O. - Mechanism of loss of mitochondrial activity during kidney preservation. In Organ Preservation: Basic and Applied Aspects, edited by D.E. Pegg, Ib. A. Jacobsen and N.A. Halasz, MTP Press Ltd, Lancaster, England, 1982, pp.127 - 132.

227- SOUTHARD, J.H.; BELZER, F.O. - Principles of renal preservation for transplantation. In: Renal Preservation Marberger M, Dreikorn K, eds. Vol.8. Baltimore. Williams & Wilkins: 1983: 188-210, 1983.

228- SOUTHARD, J.H., LUTZ, M.F., AMETANI, M.S., BELZER, F.O. - Stimulation of ATP synthesis in hypothermically perfused dog kidneys by adenosine and  $PO_4$ . Cryobiology, 21: 13 - 19, 1984a.

229- SOUTHARD, J.H.; RICE, M.J.; BELZER, F.O. - Preservation of renal function by adenosine-stimulated ATP synthesis in hypothermically perfused dog kidneys. Cryobiology, 22: 237 - 242, 1985.

230- SPIEGEL, A.M.; GIERSECHIK, P.; LEVINE, M.A.; DOWNS Jr., R.W. - Clinical implications of guanine nucleotide-binding proteins as receptor-effector couplers. New Engl. J. Med., 312: 26 - 33, 1985.

- 231- STARLING, J.R.; RUDOLPH, L.E.; FERGUSON, W.; WANGENSTEIN, S.L. - Benefits of methyl prednisolone in the isolated perfused organ. Arch. Surg., 177: 566, 1973.
- 232- STOKES, J.B. - Ion transport by the cortical and outer medullary collecting tubule. Kidney Int., 22: 473 - 484, 1982.
- 233- TAKERAKA, M.; TATSUKAWA, Y.; YAMANE, S.; TANAKA, I.; DOHI, K.; EZAKI, H.; YAMADA, K.; KAWASAKI, - An experimental model to test the viability of ischemic kidney. Transplantation, 30: 311 - 312, 1980.
- 234- TAPFEL, A.L.; ZALKIN, H. - Lipid peroxidation in isolated mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 80: 326, 1959.
- 235- TOLEDO-PEREIRA, L.H. & CONDIE, R.M. - Comparison of Sacks and a new colloid hyperosmolar solution for hypothermic renal storage. Transplantation, 26: 166 - 168, 1978.
- 236- TONGYAI, S.; RAYSSIGUIER, Y.; MOTTA, C.; GUEUX, E.; MAUROIS, P.; HEATON, F.W. - Mechanism of increased erythrocyte membrane fluidity during magnesium deficiency in weanling rats. Am. J. Physiol., 257: C270 - C276, 1989.

237- VAN DER WIJK J.; SLOOFF ,M.J.H.; RIJHMANS,B.G.; KOOTSTRA,G. - Successful 96-and 144-hours experimental kidneys preservation: a combination of standard machine preservation and newly developed normothermia "ex vivo" perfusion. Cryobiology, 17: 473 - 477, 1980.

238- VAN DER WIJK; RIJHMANS,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.

239- VENKATACHALAM,M.A.; BERNARD,D.B.; DONOHUE,J.F.; LEVINSKY,N.G. - Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule: Differences among the S1, S2, and S3 segments. Kidney Int. , 14: 31 - 49, 1978.

240- WAHLBERG,J.A.; SOUTHARD,J.H.; BELZER,F.O. - Development of a cold storage solution for pancreas preservation. Cryobiology, 23: 477 - 482,1986.

241- WAHLBERG,J.A.; LOVE,R.; LANDEGAARD,L.; SOUTHARD, J.H.; BELZER, F.O. - 72 hour preservation of the canine pancreas. Transplantation, 43: 5 - 8, 1987.

242- WAITE,M.; SCHERPHOF,G.L.; BOSHOUEWERS,F.M.G.; VAN DEENEN,L.L.M. - Differentiation of phospholipases A in mitochondria and lysosomes of rat liver. J.Lipid Res. 10:411, 1969.

243- WEISMANN,G. - The effects of steroids and drugs on lysosomes. In Lysosomes , edited by J.T.Dingle and H.R. Fell. Vol.1. American Elsevier Publ.Co.New York: 276 - 298, 1969.

244- WILHEM,E.; SCHROTT,K.M.; KRONERT,E.; SIGEL,A.; SCHWILLE,P.O. - Transvenous perfusion cooling of the kidney. A new technique of local renal hypothermia. Investigative Urology, 16: 87 - 90, 1978.

245- WILKINSON,J.H.; ROBINSON,J.M. - Effect of ATP on release of cellular enzymes from damaged cells. Nature , 149: 662 - 663, 1974.

246- YUKI,M.M.; PRAXEDES,J.N.; SEQUEIRA,D.; MARCONDES,M. - Ação do bloqueio da síntese de prostaglandinas nos efeitos hemodinâmicos e renais da infusão aguda de  $MgSO_4$ . In: Congresso Integrado das Sociedades Brasileiras de Biofísica, Farmacologia e Terapêutica Experimental, Fisiologia, e Investigação Clínica. Anais p.165. São Paulo , 6 - 10 julho, 1985.

247- YUKI,M.M.; PRAXEDES,J.N.; SEQUEIRA,D.; MARCONDES,M. - Influência do cálcio e seus bloqueadores nas ações hemodinâmicas renais do  $Mg SO_4$ . Anais XII Congr. Bras.de Nefrol. - Belo Horizonte, M.G., 12 - 17, outubro:10, 1986.

248- ZAR, J.H. - Biostatistical Analysis. - Mc ELROY, W.D. &  
SWANSON, C.P., Edts.; Prentice-HALL, Inc. - Englewood  
Cliffs, N.J.; E.U.A., 1974.