

521A

LILIA APARECIDA COLETO VIEIRA DA SILVA ^{pt}

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pela candidata Lilia.
Aparecida Colletto Vieira da Silva, e aprovada pela
comissão julgadora.
Campinas 23/4/91 - 

ESTUDO DA EFICIENCIA DAS SOLUÇÕES DE COLLINS E
EURO-COLLINS NA CONSERVAÇÃO DA FUNÇÃO DE PARS
RECTA (P3) DO TUBULO PROXIMAL DE COELHO ISOLADO
E PERFUNDIDO " IN VITRO".

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ FRANCISCO FIGUEIREDO ^{pt}

DISSERTAÇÃO APRESENTADA NO INSTITUTO DE BIOLOGIA,
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, PARA OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS, ÁREA FISIOLÓGICA. ^{pt}

CAMPINAS

1991

319104658

Si38e

13930/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e da Bolsa de Incentivo e Apoio à Pesquisa fornecida pela UNICAMP.

A CIENCIA SE
SE COMPÕE DE ERROS
QUE, POR SUA VEZ,
SAO OS PASSOS ATÉ
A VERDADE.

JULIO VERNE

1828 - 1905

ESCRITOR FRANCÊS

DEDICATORIA

A MINHA MÃE, PELA VIDA.

AO MEU MARIDO, PELO APOIO.

AO MEU FILHO, FRUTO DA FÉ.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador, Prof. Dr. José Francisco Figueiredo, pelo estímulo, paciência e dedicação constantes durante o desenvolvimento da tese.

A Profa. Dra. Doris Falkenstein pela colaboração técnica e amizade.

Ao Prof. Dr. Rui Errerias Maciel pelo auxílio inicial nesta tese.

Ao Prof. Dr. José Ernesto Dottaviano pela amizade e carinho durante minha formação.

A Fabiana Sampaio Antonialli de Paula pelo apoio técnico e administrativo.

A todos os professores que muito colaboraram para a minha formação e aos colegas pelo companheirismo e amizade.

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica e do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

INDICE

INTRODUÇÃO	01
OBJETIVOS	05
MATERIAIS E MÉTODOS	06
PROTÓCOLOS EXPERIMENTAIS	14
RESULTADOS	19
DISCUSSÃO	36
RESUMO E CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

INTRODUÇÃO

Durante estes últimos anos tem surgido vários estudos com relação à conservação de órgãos para transplante, os quais tem merecido grande atenção, principalmente no que diz respeito à viabilidade celular pós-transplante (5,7,23,24).

Existem várias técnicas de conservação de órgãos que foram ou que ainda são utilizadas para conservar o rim, entre elas, as mais comumente empregadas são o armazenamento à frio após rápida perfusão do órgão com solução eletrolítica ou a perfusão contínua do órgão com soluções coloidais, semelhantes ao plasma (3,7,10,12,13,24,26).

O obstáculo fundamental que pode interferir no sucesso do transplante é a perda das funções celulares após o reimplante.

Provavelmente existem várias alterações metabólicas e estruturais que comprometem a sobrevivência celular durante o período de conservação hipotérmica (1,2,5,7,11,12,13,24,33).

Uma das principais mudanças metabólicas ocorridas durante o período de isquemia fria e anaeróbica é a inibição da bomba de sódio-potássio, acarretando uma inversão do potencial de membrana, devido a entrada de ions cloreto, sódio e conseqüente perda de potássio pela célula

facilitando a entrada de água e provocando o edema celular. Esta situação é facilitada pela estrutura da membrana celular, que em baixas temperaturas passa da fase gel para uma configuração rígida acentuando ainda mais a deficiência celular, devido a mudanças associadas à atividade enzimática e à permeabilidade celular. Além disso, a geração de energia pelas células ~~são~~ altamente dependentes das enzimas presentes na membrana mitocondrial, que são afetadas pela baixa temperatura, diminuindo assim a utilização e a síntese de ATP, por dificultar a entrada de ADP na mitocôndria devido à inativação da translocase adenina nucleotídeo (1,4,7,22,26).

Outro problema encontrado durante o período de isquemia é o acúmulo de ânions superóxidos ou a formação de proteínas deletérias durante o período de hipotermia, provocando danos na membrana mitocondrial (6,19).

Portanto é importante que as soluções conservadoras tenham como base ions ou moléculas de pouca difusão, tais como sulfato, fosfato, citrato, manitol, glicose e uma baixa concentração de sódio e alta de potássio para prevenir o edema celular, limitar trocas iônicas, conservar a energia, evitar a acidose através de tampões e regenerar rapidamente a bomba de Na-K (7,11,12,18,21).

Várias soluções foram testadas, apresentando composição e proporções variadas de eletrólitos e açúcares, incluindo sódio, potássio, cloreto, magnésio, fosfato, citrato, glicose, manitol e sacarose. Normalmente num

transplante, são utilizadas soluções isotônicas ou discretamente hipertônicas (Collins) ou hipertônicas (Acquatella) e Sacks, que podem apresentar uma composição semelhante ao meio intracelular. Estas soluções são usadas clinicamente somente por um certo período de conservação (cerca de 24 horas), embora os dados sobre 72 horas ou mais de conservação com manutenção funcional, ainda apresentam-se controversos (1,2,10,11,14,15,23,31,34). Atualmente, encontra-se em estudo novas soluções que tem como base a aplicação de conhecimentos bioquímicos mais elaborados, como é o caso da solução de Wisconsin que contém uma combinação de fosfatos de alta energia como a adenosina; glutamato em lugar do cloreto; lactobionato de potássio como agente osmótico e rico em potássio e substâncias coloidosmóticas não proteicas como hidróxido de amido. Estas soluções parecem restabelecer de forma mais adequada as condições fisiológicas celulares após a isquemia fria (7,29).

A eficiência destas soluções em conservar o rim, como no caso a de Collins, parece ser na presença de solutos pouco permeáveis à membrana que previne a formação do edema. Além disso esta solução apresenta uma alta concentração de magnésio, que serve para proteger a célula da perda tanto de magnésio como de potássio por inibição do metabolismo celular (10,12,13).

No entanto, ainda existem muitas controvérsias quanto ao aspecto da composição iônica destas soluções. Uma

delas é o uso do magnésio , o qual pode trazer problemas por causar a formação de precipitados em forma de cristais, que podem danificar o parênquima renal. Surgiu então, uma variante da solução de Collins, o Euro-Collins, na qual não se adiciona o sulfato de magnésio, sendo que esta também é eficaz na conservação renal e é usada na rotina clínica (14,31).

Diante destas observações resolvemos estudar a eficiência das diferentes soluções conservadoras sobre a viabilidade renal, utilizando-se as soluções de Collins e Euro-Collins (sem Mg), sobre a função de segmentos do nefron, através da técnica de microperfusão de túbulo renal isolado "in vitro".

Nos estudos realizados em nosso laboratório e em outros, foi observado que esta técnica, é um instrumento útil para avaliar a eficiência do uso de diferentes métodos e soluções conservadoras, diretamente sobre a estrutura epitelial , possibilitando eliminar os fatores renais e extra-renais que podem interferir sobre a função de diferentes segmentos do néfron (15,16,17,27).

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 susceptível à ação da conservação, e portanto mais vulnerável ao aparecimento da necrose tubular aguda (20).

OBJETIVOS

Estudar a ação conservadora das soluções de Collins (com Mg) e Euro-Collins (sem Mg) sobre a função do segmento Pars recta (P3) do túbulo proximal, avaliado pela técnica de microperfusão de túbulo renal isolado "in vitro".

MATERIAIS E METODOS

A técnica de microperfusão de túbulo renal isolado "in vitro", foi desenvolvida inicialmente por Burg et al., (1966), e adaptada para nossas condições experimentais por Figueiredo et al., (1982).

Esta técnica consiste basicamente na dissecação de um dos segmentos do néfron, à partir de um fragmento renal e sua posterior perfusão por um sistema de micropipetas concêntricas.

Nesta preparação, coelhos brancos mestiços (New Zealand), pesando 1,0 a 2,5 Kg (mantidos com livre acesso à comida e água), foram sacrificados por deslocamento cervical com retirada de um dos rins, sendo este posteriormente descapsulado e cortado sagitalmente em fragmentos de aproximadamente 1 mm de diâmetro. Alguns desses fragmentos foram incubados em solução conservadora (Collins e Euro-Collins) à 4°C para uso posterior, enquanto que outros foram colocados imediatamente em uma placa de Petri pequena contendo solução semelhante ao plasma. A dissecação foi feita com auxílio de um microscópio estereoscópico (Rausch e Lomb Stereo Zoom) com o aumento variando de 10 a 70 vezes. Durante a dissecação os fragmentos foram mantidos à 4 °C com gaseificação de 95% de O₂ e 5% de CO₂ e separados cuidadosamente com auxílio de pinças finas (A. Dumond e Fils nº5) e micro estiletes. Após ter-se isolado o túbulo,

cortou-se com cuidado suas extremidades com um micro bisturi (Thomas Co.). Em seguida, o túbulo foi transferido com auxílio de uma pipeta Pasteur modificada para uma microcâmara de perfusão. Esta microcâmara, consiste de uma placa de acrílico com uma fenda no meio, vedada por uma lâminula de vidro, contendo algumas perfurações para adaptação do sistema de oxigenação e do sensor do termostato (marca YSI modelo 73 A - Yellow Springs Instruments) usado para controle de temperatura, regulado através de uma microresistência, para aquecer o banho à 37°C.

A câmara de perfusão está adaptada à um microscópio invertido (Reichert - Bio Star) de alta magnitude (4 - 450 x) para focalização do túbulo e das micropipetas.

Logo após a transferência do túbulo para a microcâmara, previamente preenchida com solução de banho, este foi conectado a um sistema de micropipetas concêntricas, que estão fixadas por encaixes de acrílico a micromanipuladores especiais (J.H. Emerson Co.) que permitem a movimentação nos planos X,Y,Z. Após aproximar o sistema de pipetas do lado perfusor de uma das extremidades do túbulo, este foi aspirado por pressão negativa, cuidadosamente para dentro da pipeta suporte. No interior desta pipeta, temos outra pipeta de menor diâmetro e de ponta fina que é introduzida no centro do lúmen tubular.

Esta pipeta foi preenchida com um ultrafiltrado marcado com 14C-carboxi-inulina (New England Nuclear) e por meio de pressão hidrostática, fornecida por uma coluna de líquido de altura variável, iniciou-se a perfusão de todo o túbulo.

A outra extremidade do túbulo foi conectada à pipeta suporte do lado coletor. Esta pipeta foi preenchida com um óleo tetradecano hidratado (Sigma) corado com Sudan Black (Merck) que permite a visualização do volume perfundido.

Para isolamento elétrico e químico da extremidade do túbulo do lado coletor, a pipeta suporte foi siliconizada com uma pequena quantidade de resina de silicone, o óleo Sylgard 184 (Dow Corning). Depois de adaptado o túbulo no sistema de micropipetas concêntricas e iniciada a perfusão, o banho foi aquecido à 37°C e gaseificado com 95% de O₂ e 5% de CO₂, durante um período de equilíbrio de aproximadamente 30 minutos. Em seguida iniciou-se a coleta das amostras do volume perfundido com uma pipeta especial de coleta com volume constante.

As soluções que banham o túbulo são trocadas continuamente à um fluxo de 0,3 ml/min. através de infusão contínua por bomba (Havard mod. 975) na microcâmara de perfusão, e a sucção feita por meio de uma bomba de pressão negativa (Nevoni LTDA). Em cada período de coleta das amostras, foram juntamente coletadas amostras da solução banhante para análise do vazamento do ultrafiltrado marcado com 14C-carboxi-inulina. Experimentos com vazamentos

superiores à 5% do marcador de volume, foram desprezados, pois indicam lesão do epitélio ou problemas técnicos.

Trocas rápidas e com fluxo superior à 1 ml/min, foram realizadas quando havia necessidade de mudar a solução banhante por outra de composição diferente. O resfriamento das soluções conservadoras foi obtido através da passagem contínua da solução fria por um cateter envolto em uma serpentina de cobre, previamente resfriado à 0°C imerso em gelo. Esta solução fria de aproximadamente 10°C foi infundida e trocada continuamente como as outras soluções, sem perfusão tubular.

ANÁLISE DAS AMOSTRAS E DOS PADRÕES - CÁLCULOS

As microamostras padrões foram obtidas pela passagem rápida e direta do líquido perfusor através do túbulo e as macroamostras padrões foram obtidas pela retirada direta de aliquotas do ultrafiltrado marcado.

Todas as amostras coletadas foram transferidas para 0,1 ml de água e completadas com 1 ml de líquido de cintilação do tipo Aquasol II e posteriormente analisadas em um espectrofotômetro de cintilação Beta (Beckman mod. LS-100).

A quantidade absoluta de fluido absorvido foi calculada pela seguinte fórmula (9):

$$Jv = \frac{Vl}{L} \left(\frac{14C - \text{inulina } L}{14C - \text{inulina } 0} - 1 \right)$$

Onde: Jv = Quantidade absoluta de fluido absorvido em nl.min⁻¹mm⁻¹;

Vl = Velocidade de coleta das amostras em nl.min⁻¹;

L = Comprimento do túbulo perfundido (mm) medido por um micrômetro calibrado colocado na ocular do microscópio;

(14C - inulina L)/(14C - inulina 0) foi considerado a razão entre 14C - carboxi-inulina do volume coletado e do volume perfundido respectivamente.

COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES DE BANHO E ULTRAFILTRADO

A solução de banho controle foi preparada a partir de um Krebs Henseleit modificado, com adição de albumina bovina fração V (Miles C.O.) que foi dializada contra a mesma solução sem proteína por 24 horas, através de uma membrana de diálise tipo D 42 (Thomas Co.) com corte de 12.000 Daltons. Em seguida, acrescentou-se glicose e alanina ao dializado, sendo posteriormente borbuhlado por cerca de 15 minutos com 95% de O₂ e 5% de CO₂, até atingir pH em torno de 7,4. Esta solução foi ultrafiltrada utilizando-se uma câmara de ultrafiltração da AMICON modelo 47, com pressão positiva de nitrogênio 2,5 psi através de uma membrana Millipore Pellicon P.T.B.C.04710 com corte de 10.000 Daltons.

Esta manobra "in vitro" de obtenção de perfusato controle procura simular a composição do ultrafiltrado glomerular "in vivo". As soluções foram guardadas à 4°C até o momento do uso por um período máximo de 15 dias.

TABELA 1: COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE KREBS HENSELEIT MODIFICADO (Solução banhante controle).

NaCl	105,0 mM
NaHCO ₃	25,0 mM
NaAc	10,0 mM
KCl	4,84 mM
NaH ₂ PO ₄	0,92 mM
KH ₂ PO ₄	0,60 mM
MgSO ₄	0,81 mM
CaCl ₂	1,97 mM
Alanina	5,0 mM
Glicose	8,0 mM
Albumina Bovina	6,5g/dl
Osmolalidade - 280 mOsm/Kg H ₂ O	

COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES CONSERVADORAS EXPERIMENTAIS

Utilizamos em nossos experimentos dois tipos de soluções conservadoras que são a solução de Collins e a de Euro-Collins, que se diferem apenas com relação à adição ou não de sulfato de magnésio (MgSO₄).

TABELA 2 : COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE COLLINS

NaHCO ₃	10 mM
KCl	15 mM
KH ₂ PO ₄	15 mM
K ₂ HPO ₄	40 mM
MgSO ₄	28 mM
Glicose	139 mM
Osmolalidade - 330 mOsm/Kg H ₂ O	

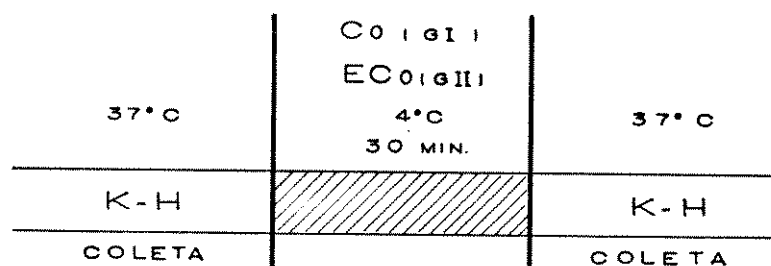
A solução de Euro-Collins é semelhante à solução de Collins,
com exceção da adição de sulfato de magnésio (MgSO₄).

Osmolalidade - 300 mOsm/Kg H₂O

PROTÓCOLOS EXPERIMENTAIS

Utilizando-se diferentes soluções conservadoras foram realizadas as seguintes manobras experimentais:

1- Estudo da conservação de pars recta (P3) provenientes de fragmentos não conservados.



Neste protocolo obtivemos os grupos I e II nos quais as pars recta foram dissecadas de fragmentos não conservados à 10°C em solução de Krebs Henseleit e borbulhadas com 95% de O₂ e 5% de CO₂ e perfundidas e banhadas nas mesmas condições à 37°C, durante um período controle de onde foram obtidas várias amostras para análise. Após este período, interrompeu-se a perfusão, mantendo o túbulo em repouso e banhado com solução conservadora de Collins (grupo I) ou Euro-Collins (grupo II) à 4°C sob infusão contínua pelo lado peritubular sem perfusão luminal, durante um período de 30 minutos. No período de recuperação perfundiu-se o túbulo como no período controle para coleta das amostras.

2- Estudo da conservação de pars recta (P3) provenientes de fragmentos conservados por 24 horas.

INCUBAÇÃO FRAGT:	
Co (G III)	37° C
EC (G IV)	
24 HS	K - H
4° C	COLETA

Nesta estratégia experimental obtivemos os grupos III e IV, nos quais fragmentos retirados do rim foram incubados em solução conservadora de Collins (grupo III) e Euro-Collins (grupo IV) por um período de 24 horas à uma temperatura de 4°C. Após este período, os fragmentos foram dissecados nas respectivas soluções conservadoras, isolando-se a pars recta que foi perfundida em condições normais, com a solução de Krebs Henseleit à 37°C e gaseificado com 95% de O₂ e 5% de CO₂, sendo obtidas cinco amostras para estudo.

3- Estudo da conservação de pars recta (p3) provenientes de fragmentos não conservados que foram isoladas e incubadas em câmaras especiais contendo solução conservadora.

INCUBAÇÃO DE PARS RECTA	
Co (G V)	37° C
EC (G VI)	
A - 1 H	K - H
B - 2 HS	
C - 24 HS	COLETA
4° C	

Neste protocolo, a pars recta foi dissecada de fragmentos à fresco, não conservados, incubadas nas câmaras especiais contendo solução conservadora de Collins ou Euro-collins durante os períodos de tempo de uma, duas e vinte e quatro horas (1,2 e 24 hs) de conservação à frio (4°C). Esta câmara consiste de uma lâmina de microscópio sobre a qual são montados de forma retangular uma caixa pequena pela colagem de diversas lâminas (30) (fig.2). Esta manobra tem por finalidade evitar o fator sorteio durante a dissecação do túbulo do fragmento renal. Após estes períodos, os túbulos são colocados diretamente na câmara de perfusão e perfundidos em condições normais, com a solução de Krebs Henseleit à 37°C e gaseificada com 95% de O₂ e 5% de CO₂, sendo obtidas várias amostras para análise.

Através destas manobras experimentais obtivemos os seguintes grupos:

- GRUPO V: Pars recta dissecada e incubada na câmara com solução de Collins. Obtivemos os seguintes sub-grupos de acordo com o tempo de conservação:
 - Sub-grupo V-a: Pars recta conservada durante 1 hora e perfundida em condições normais, de onde foram obtidas algumas amostras para análise;
 - Sub-grupo V-b: Pars recta conservada durante 2 horas e perfundida em condições normais, obtendo várias amostras para estudo;

- Sub-grupo V-c: Pars recta conservada durante 24 horas e perfundida em condições normais , de onde foram obtidas algumas amostras para estudo.

- GRUPO VI: Pars recta dissecada e incubada na câmara com solução de Euro-Collins. Com esta manobra experimental obtivemos os seguintes sub-grupos:

- Sub-grupo VI-a: Pars recta conservada durante 1 hora e perfundida em condições normais , obtendo-se várias amostras para análise;

- Sub-grupo VI-b: Pars recta conservada durante 2 horas e perfundida em condições normais , de onde foram retiradas algumas amostras para análise;

- Sub-grupo VI-c: Pars recta conservada durante 24 horas e perfundida em condições normais , obtendo-se várias amostras para estudo.

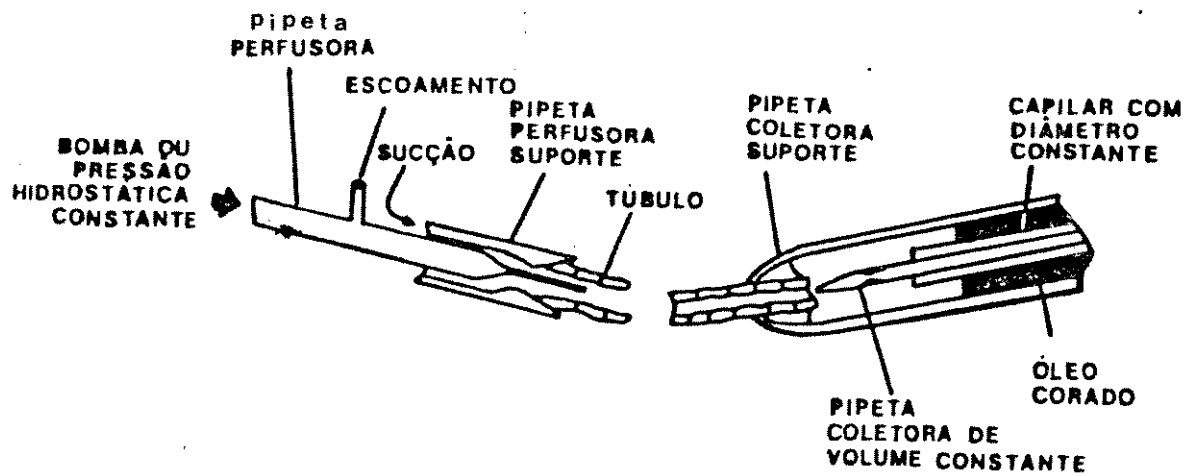


FIGURA 1: Esquema do Sistema de Micropipetas utilizadas na Técnica de Microperfusão "in vitro" de segmentos isolados do néfron

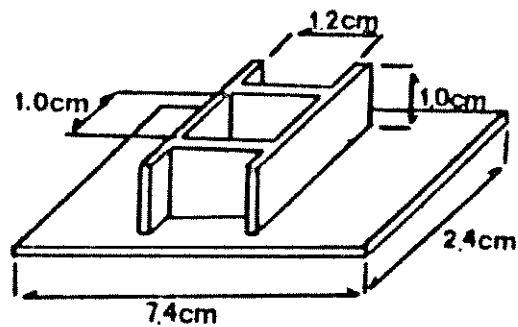


FIGURA 2: Esquema da Câmara especial para conservação de segmentos isolados do néfron.

RESULTADOS

Nas nossas condições experimentais citadas em nosso protocolo, nas quais foram testadas as soluções conservadoras de Collins e Euro-Collins nos diferentes estágios funcionais de pars recta (p3) do túbulo proximal de coelho isolado e perfundido "in vitro", encontramos os seguintes resultados:

1- Estudo da conservação de pars recta (p3) provenientes de fragmentos não conservados.

Nesta estratégia experimental, obtivemos os grupos I e II, onde testamos a eficiência das soluções conservadoras de Collins e Euro-Collins respectivamente, na manutenção das funções celulares de pars recta, utilizando-se como parâmetro funcional a quantidade de fluido absorvido ($J_v = \text{nl} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$) pré e pós conservação. Desta forma, nas tabelas 3 e 4 estão representados os valores individuais e médios e o respectivo erro padrão da média dos parâmetros funcionais encontrados em Pars recta conservadas durante 30 minutos nas diferentes soluções experimentais.

Os parâmetros encontrados com estas manobras de conservação foram os seguintes:

No grupo I (n=5), tabela 3 e figura (3 e 5) os túbulos conservados em solução de Collins apresentaram durante o período controle uma taxa de absorção de fluido

(Jv) média de $0,64 \pm 0,09$ nl.min⁻¹mm⁻¹ quando foram perfundidas a um fluxo de perfusão de $6,7 \pm 0,3$ nl.min⁻¹. Após a conservação, no período de recuperação, obtivemos uma absorção de fluido (Jv) média de $0,58 \pm 0,11$ nl.min⁻¹mm⁻¹, em relação a um fluxo de perfusão de $7,35 \pm 0,68$ nl.min⁻¹, sendo que estes valores não foram diferentes estatisticamente dos encontrados no período controle.

No grupo II (n=5), tabela 4 e figuras (3 e 6), os túbulos conservados na solução de Euro-Collins apresentaram durante o período controle uma absorção de fluido (Jv) média de $0,49 \pm 0,14$ nl.min⁻¹mm⁻¹ quando perfundidos com um fluxo de $5,6 \pm 0,51$ nl.min⁻¹. No período de recuperação, pós conservação, obtivemos uma absorção de fluido $0,52 \pm 0,11$ nl.min⁻¹mm⁻¹ a um fluxo de perfusão de $6,1 \pm 0,51$ nl.min⁻¹. Estes dados mostram que não houve diferença significativa entre os dois grupos ($p > 0,05$) na comparação inter grupos, indicando que ambas as soluções podem ser de certa forma usadas para conservação celular do segmento (p3) do túbulo proximal, pois mantem o parâmetro medido em relação ao período controle.

2-Estudo da conservação de pars recta (p3) provenientes de fragmentos conservados 24 horas.

Através deste protocolo obtivemos os grupos III e IV, onde testamos novamente os efeitos das soluções conservadoras de Collins e Euro-Collins, sobre a manutenção

das funções celulares de pars recta agora por um período mais prolongado de conservação, em torno de 24 horas; utilizando-se também como parâmetro funcional a taxa de absorção de fluido ($J_v = \text{nl} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$).

Desta forma, nas tabelas 5 e 6 estão representados os valores individuais e médios e o respectivo erro padrão da média dos parâmetros funcionais encontrados em pars recta obtidas de fragmentos conservados nas soluções conservadoras experimentais.

No grupo III ($n=6$) tabela 5 e figura (4) os túbulos provenientes de fragmentos conservados 24 horas em solução de Collins apresentaram durante o período experimental uma absorção de fluido (J_v) médio de $0,37 \pm 0,08 \text{ nl} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ quando perfundidos a um fluxo de perfusão de $8,45 \pm 0,74 \text{ nl} \cdot \text{min}^{-1}$.

No grupo IV ($n=6$) tabela 6 e figura (4) os túbulos provenientes de fragmentos conservados 24 horas em solução de Euro-Collins apresentaram durante o período experimental uma taxa de absorção de fluido (J_v) de $0,85 \pm 0,22 \text{ nl} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ em relação ao fluxo de perfusão de $8,78 \pm 1,13 \text{ nl} \cdot \text{min}^{-1}$.

Os resultados encontrados neste protocolo experimental, sugerem novamente que a solução de Euro-Collins conserva melhor a função celular avaliada pela absorção de fluido (J_v) do segmento (P3) de túbulos proximais, visto que, na análise estatística inter-grupos feita pelo teste t não-pareado, mostrou-se uma diferença

significante ($p < 0,05$) entre o Jv encontrado no grupo de túbulos obtidos de fragmentos conservados por 24 horas em solução de Collins contra o conservado em Euro-Collins.

3-Estudo da conservação de pars recta (p3) provenientes de fragmentos não conservados que foram isoladas e mantidas em câmara especial contendo solução conservadora.

Utilizamos esta manobra experimental para estudar a função celular dos segmentos P3 do túbulo proximal, através da conservação direta, em contato predominantemente com o lado peritubular, com as soluções conservadoras de Collins e Euro-Collins. Os túbulos provenientes de um mesmo fragmento foram incubados por períodos de tempo variando de uma, duas e vinte e quatro horas à uma temperatura de 42°C.

Desta forma, na tabela 7 e figura (7), estão representados os valores individuais e médios e o respectivo erro padrão da média dos parâmetros funcionais encontrados de pars recta conservada diretamente na solução de Collins. Com esta estratégia obtivemos o Grupo V e os seguintes sub-grupos:

-Sub-grupo V-a (n=5): Os túbulos conservados 1 hora em solução de Collins apresentaram durante o período experimental uma absorção de fluido (Jv) média de $0,85 \pm 0,12$ nl.min-1mm-1 a um fluxo de perfusão de $5,3 \pm 1,1$ nl.min-1.

- Sub-grupo V-b (n=4): Os túbulos conservados 2 horas em solução de Collins apresentaram durante o período experimental uma absorção de fluido (J_o) média de $0,52 \pm 0,3$ nl.min⁻¹mm⁻¹ a um fluxo de perfusão de $5,0 \pm 1,0$ nl.min⁻¹.
- Sub-grupo V-c (n=4): Os túbulos conservados 24 horas em solução de Collins apresentaram durante o período experimental uma absorção de fluido com valores negativos $-0,84 \pm 0,59$ nl.min⁻¹mm⁻¹ a um fluxo de perfusão de $4,65 \pm 2,03$ nl.min⁻¹, estes achados podem indicar uma entrada de fluido para dentro do lúmen tubular.

Na tabela 8 e figura (7) estão representados os valores individuais e médios e o respectivo erro padrão da média dos parâmetros funcionais encontrados em pars recta conservadas em solução de Euro-Collins. Através desta manobra experimental obtivemos o Grupo VI e os seguintes sub-grupos:

- Sub-grupo VI-a (n=5): Os túbulos conservados 1 hora em solução de Euro-Collins apresentaram durante o período experimental uma absorção de fluido de $0,93 \pm 0,14$ nl.min⁻¹mm⁻¹ a um fluxo de perfusão de $6,1 \pm 1,28$ nl.min⁻¹.
- Sub-grupo VI-b (n=4): Os túbulos conservados 2 horas em solução de Euro-Collins apresentaram durante o período experimental uma absorção de fluido de $0,53 \pm 0,05$ nl.min⁻¹mm⁻¹ a um fluxo de perfusão de $5,1 \pm 2,1$ nl.min⁻¹.
- Sub-grupo VI-c (n=4): Os túbulos conservados 24 horas em solução de Euro-Collins apresentaram durante o período

experimental uma absorção de fluido (Jv) média de $-1,43 \pm 0,59 \text{ nl}_{\cdot}\text{min}^{-1}\text{mm}^{-1}$ a um fluxo de perfusão de $3,0 \pm 1,26 \text{ nl}_{\cdot}\text{min}^{-1}$, podendo indicar novamente entrada de líquido do lado peritubular para o lúmen.

TABELA 3: VALORES INDIVIDUAIS E MÉDIOS REPRESENTATIVOS DO GRUPO I (N=5) DEMONSTRANDO AS FUNÇÕES DE PARS RECTA (P3) CONSERVADAS DIRETAMENTE DO LADO PERITUBULAR COM SOLUÇÃO DE COLLINS A 10 °C.

TEMPO DE PERFUSÃO (min.)		VELOCIDADE DE PERFUSÃO (nl/min.)		ABSORÇÃO DE FLUIDO (Jv= nl/min.mm)	
controle		recuperação		controle	
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
± 3	± 2	$\pm 0,3$	$\pm 0,7$	$\pm 0,09$	$\pm 0,1$

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

teste t pareado ($p > 0,05$) - Controle x Recuperação

TABELA 4: VALORES INDIVIDUAIS E MÉDIOS REPRESENTATIVOS DO GRUPO II (N=5) DEMONSTRANDO AS FUNÇÕES DE PARS RECTA (P3) CONSERVADAS DIRETAMENTE DO LADO PERITUBULAR COM SOLUÇÃO DE EURO-COLLINS A 10°C.

TEMPO DE PERFUSÃO (min.)		VELOCIDADE DE PERFUSÃO (nl/min)		ABSORÇÃO DE FLUIDO (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
± 6	± 4	$\pm 0,5$	$\pm 0,5$	$\pm 0,14$	$\pm 0,12$

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

teste t pareado ($p > 0,05$) - Controle x Recuperação

teste t não pareado ($p > 0,05$) - GRUPO I X GRUPO II

TABELA 5: VALORES INDIVIDUAIS E MÉDIOS REPRESENTATIVOS DO GRUPO III (N=6) DEMONSTRANDO AS FUNÇÕES DE PARS RECTA (P3), PROVENIENTES DE FRAGMENTOS RENAIIS CONSERVADOS 24 HORAS EM SOLUÇÃO DE COLLINS

TEMPO DE PERFUSÃO (min.)	VELOCIDADE DE PERFUSÃO (nl/min.)	ABSORÇÃO DE FLUIDO (Jo= nl/min.mm)
62	9,5	0,28
43	8,7	0,20
62	10,7	0,30
56	5,9	0,26
43	6,7	0,40
46	9,3	0,76
52	8,4	0,37
± 4	$\pm 0,7$	$\pm 0,08$

X $\pm$ EPM

TABELA 6: VALORES INDIVIDUAIS E MÉDIOS REPRESENTATIVOS DO GRUPO IV (N=6) DEMONSTRANDO AS FUNÇÕES DE PARS RECTA (P3), PROVENIENTES DE FRAGMENTOS RENAIIS CONSERVADOS 24 HORAS EM SOLUÇÃO DE EURO-COLLINS.

TEMPO DE PERFUSÃO (min.)	VELOCIDADE DE PERFUSÃO (nl/min.)	ABSORÇÃO DE FLUIDO (Jo= nl/min.mm)
87	6,5	0,61
77	7,4	0,58
95	13,5	0,79
74	9,4	0,26
35	7,5	1,83
51	8,4	1,06
70	8,8	0,85*
± 10	$\pm 1,1$	$\pm 0,22$

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

Teste t não pareado ($p < 0,05$)* - GRUPO III X GRUPO IV

TABELA 7: VALORES INDIVIDUAIS E MÉDIOS REPRESENTATIVOS DOS GRUPOS: V = V-a (N=5), V-b (N=4) E V-c (N=4) DEMONSTRANDO AS FUNÇÕES DE PARS RECTA CONSERVADAS COM SOLUÇÃO DE COLLINS A 10°C EM MICROCAMARAS DURANTE 1, 2 E 24 HORAS, RESPECTIVAMENTE E PERFUNDIDAS COM KREBS HENSELEIT COM 6,5% DE ALBUMINA BOVINA A 37°C.

TEMPO DE PERFUSÃO (min.)	VELOCIDADE DE PERFUSÃO (nl/min.)	ABSORÇÃO DE FLUIDO (Jv= nl/min.mm)
76	2,8	0,51
63	9,4	1,21
66	4,6	0,65
40	5,5	1,05
51	4,3	0,86
X 59±6	5,3±1,1	0,85±0,12
45	3,4	0,95
54	8,5	0,28
44	4,5	0,35
52	4,0	0,53
X 49±2	5,0±1,0	0,52±0,13
64	1,0	-0,65
57	0,6	-1,09
54	9,7	-1,21
35	7,3	-0,41
X 54±6	4,6±2,3	-0,84±0,16*

X ± EPM

* ANOVA $p < 0,001$

TABELA 8: VALORES INDIVIDUAIS E MÉDIOS REPRESENTATIVOS DOS GRUPOS: VI= VI-a (N=5), VI-b (N=4) E VI-c (N=4) DEMONSTRANDO AS FUNÇÕES DE PARS RECTA CONSERVADAS COM SOLUÇÃO DE EURO-COLLINS A 10°C EM MICROCAMARAS DURANTE 1, 2 E 24 HORAS RESPECTIVAMENTE E PERFUNDIDAS COM KREBS HENSELEIT COM 6,5% DE ALBUMINA BOVINA A 37°C.

TEMPO DE PERFUSÃO (min.)	VELOCIDADE DE PERFUSÃO (nl/min.)	ABSORÇÃO DE FLUIDO (Jc nl/min.mm.)
56	8,9	0,70
62	9,0	0,82
85	2,5	0,67
60	4,5	1,01
42	5,5	1,46
X 61±7	6,1±1,3	0,93±0,14
41	11,4	0,66
57	3,5	0,61
53	2,2	0,48
67	3,5	0,40
X 54±5	5,1±2,1	0,53±0,05
49	7,1	-3,41
56	1,5	-0,90
48	2,0	-0,88
51	1,2	-0,53
X 51±1	3,0±1,2	-1,43±0,59*

X ± EFM * ANOVA p<0,001

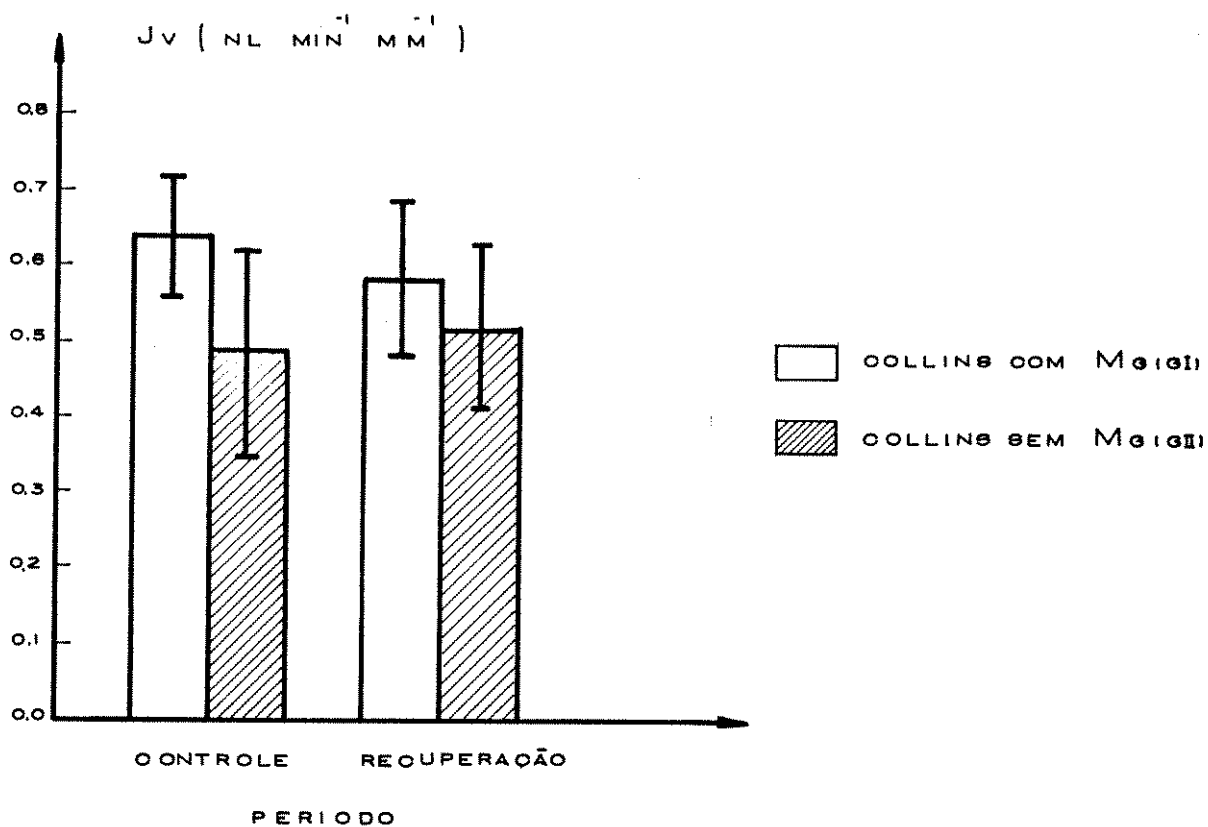


FIGURA 3: Representação gráfica dos valores médios e os respectivos erro padrão da média da absorção de fluido (JV) de pars rectas conservadas por 30 minutos nas soluções de Collins e Euro-Collins.

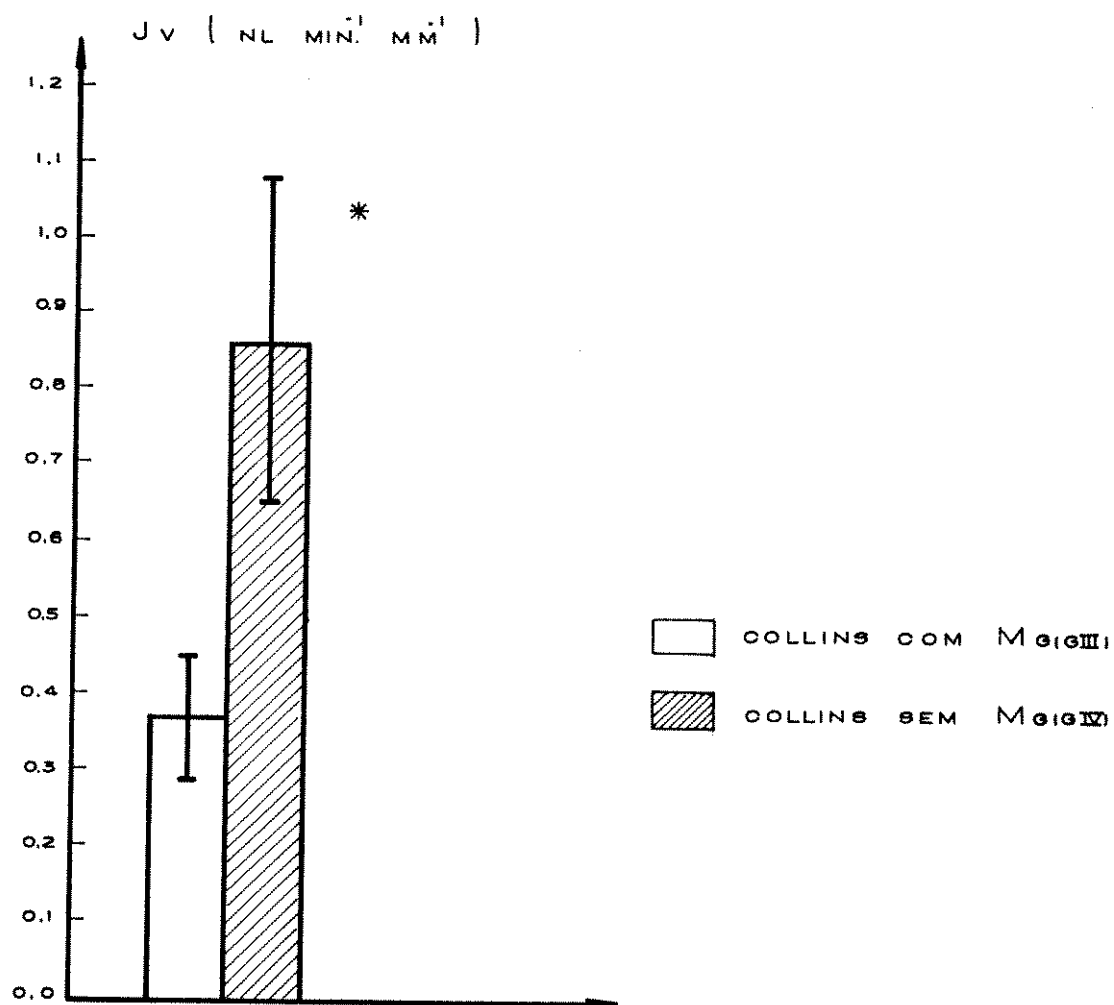


FIGURA 4: Representação gráfica dos valores médios e os respectivos erro padrão da média da absorção de fluido (J_v) de pars rectas conservadas por 24 horas nas soluções de Collins e Euro-collins

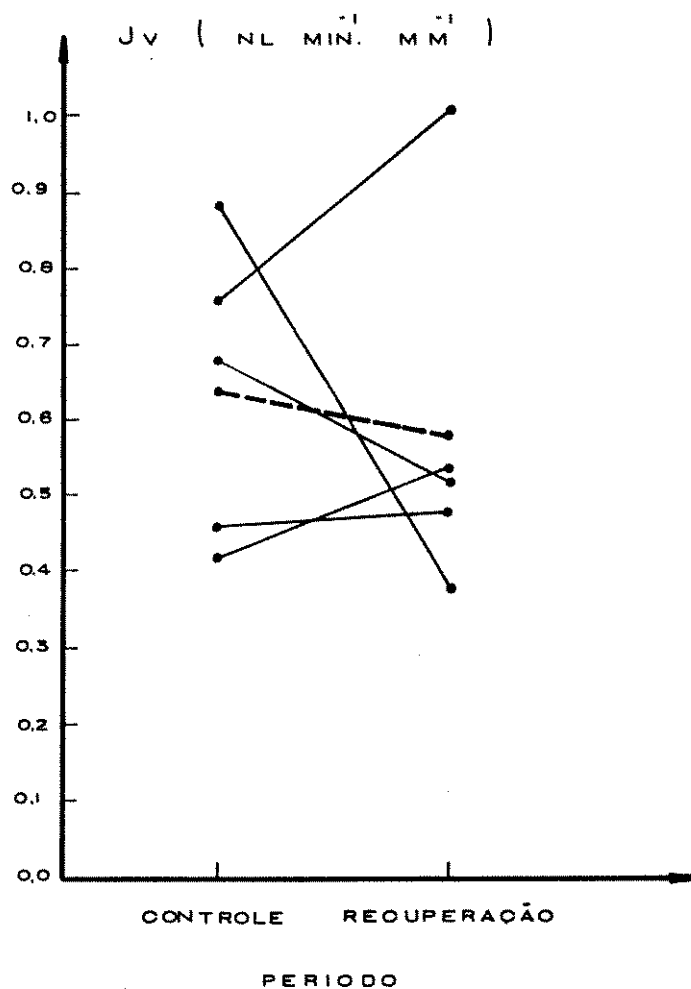


FIGURA 5: Representação gráfica dos dados individuais do grupo I (n=5) de pars rectas conservadas na solução de Collins a 10°C.

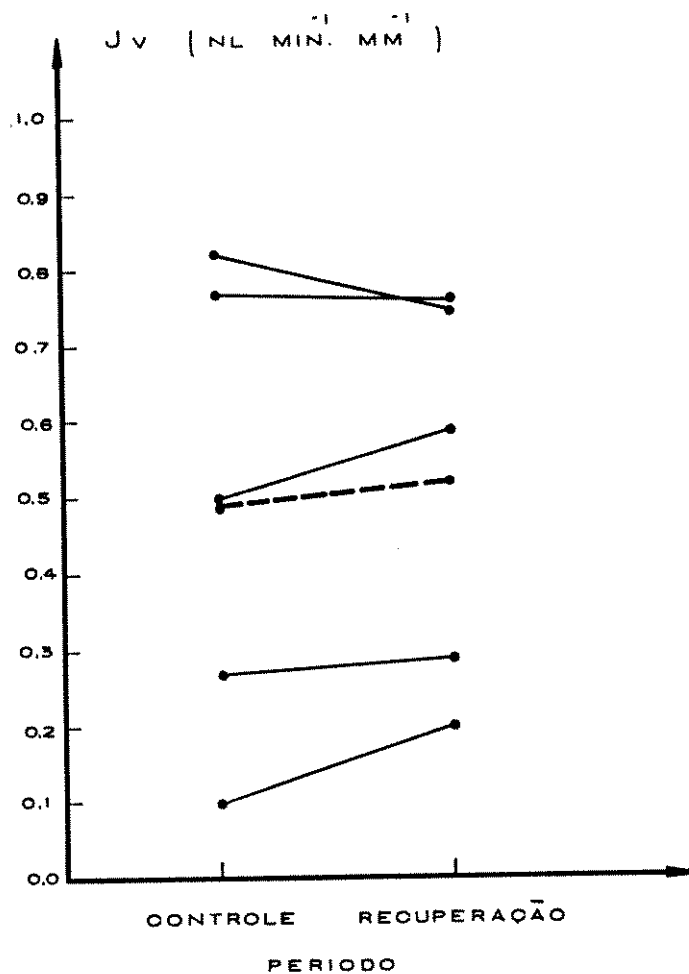


FIGURA 6: Representação gráfica dos dados individuais do grupo II (n=5) de pares rectas conservadas na solução de Euro-Collins à 10°C.

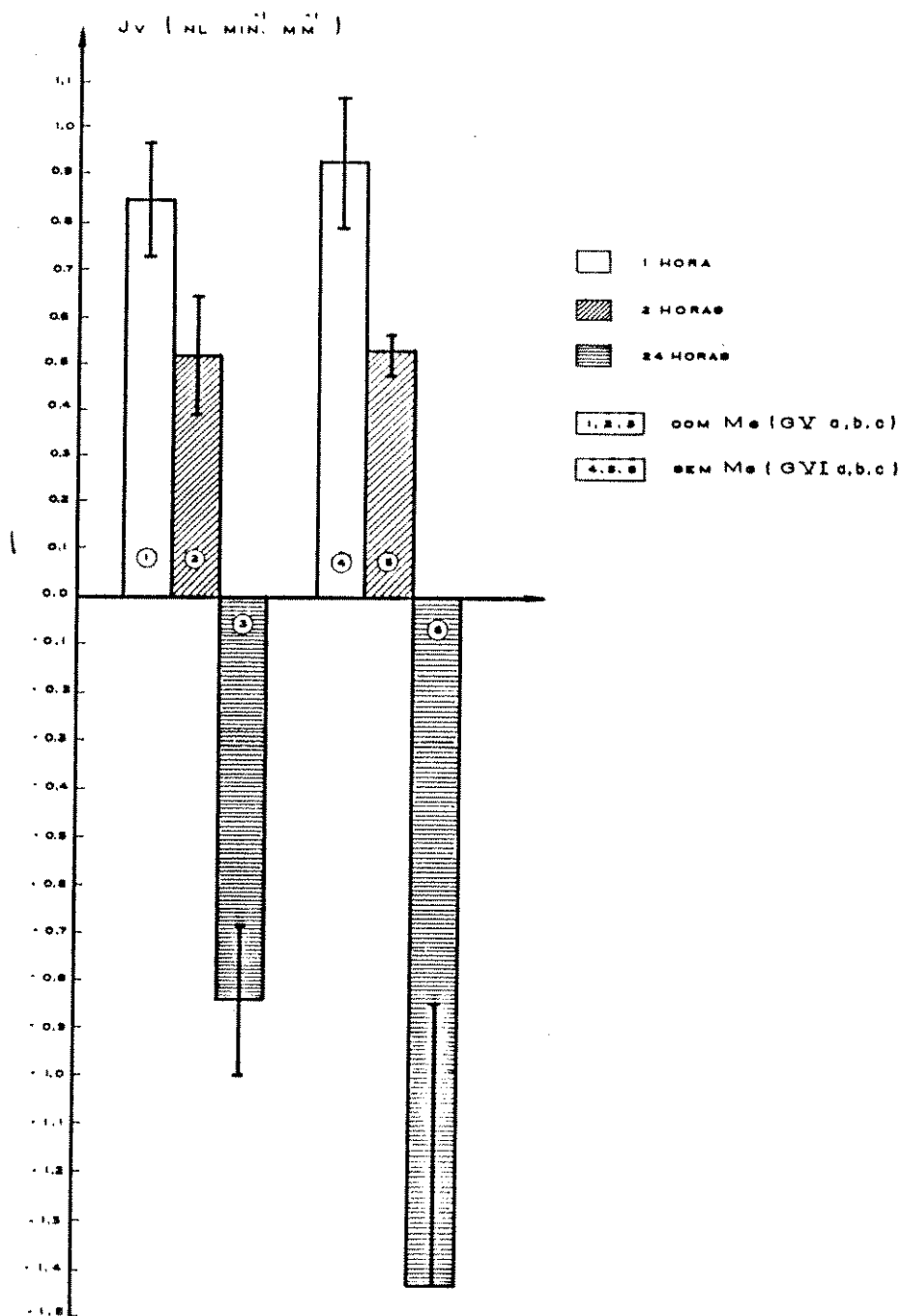


FIGURA 7: Representação gráfica dos valores médios e os respectivos erro padrão da média da absorção de fluido (JV) de pars rectas isoladas e incubadas em câmaras especiais para conservação nas soluções de Collins e Euro-Collins por períodos variando de 1,2 e 24 horas.

DISCUSSÃO

Para o sucesso do transplante renal, um dos pré-requisitos mais importantes é a escolha do melhor método de conservação da função do órgão. Na maioria dos estudos atuais de conservação renal, ao se utilizar o órgão como um todo, somente os parâmetros globais da função renal são avaliados. Desta forma, a heterogeneidade estrutural e metabólica dos seus elementos constituintes como glomérulos, mesângios, túbulos, vasos e pelvis, são ignoradas, desconhecendo a sensibilidade variável que estas diferentes estruturas certamente possuem ao processo de conservação (5,6).

Sendo assim, o uso da técnica de microperfusão de túbulo renal isolado "in vitro", permitiu investigar diretamente os efeitos das soluções conservadoras sobre a função de apenas um dos segmentos do néfron, favorecendo a observação detalhada das propriedades específicas do segmento, como, variações morfológicas dinâmicas, edema e descamações da camada epitelial renal, imediatamente após a restauração das condições normotérmicas e aeróbicas (15,16,17,18,25,30).

Figueiredo et al. (1982), pioneiramente, investigaram o efeito de soluções conservadoras sobre a função de um determinado segmento isolado do néfron (15). Neste estudo, observou-se que através da técnica de

microperfusão de túbulo renal isolado " in vitro ", segmentos de pars rectas de coelhos obtidos de fragmentos conservados em solução de Collins por até 72 horas mantinham os valores de absorção de fluido e potencial transepitelial inalterados.

Piere e Potts (1985), obtiveram uma boa função de túbulos contornados proximais por até 48 horas de conservação, de segmentos dissecados de rins globais de coelhos perfundidos e conservados com solução tampão fosfato de sódio isotônico, cuja manobra experimental é diferente do nosso caso, onde a conservação é feita por contato direto com as soluções conservadoras (27). Existem algumas diferenças no comportamento das células epiteliais quando se perfunde o órgão total, inicialmente antes da perfusão isolada de um segmento específico. Durante a perfusão do órgão, existem vários fatores que podem atuar desfavorecendo a viabilidade celular. Entre estes, podemos citar a isquemia quente prolongada, o comprometimento do sistema vascular na distribuição da solução conservadora, a pressão de perfusão, a pressão intersticial que é aumentada pelo edema celular, a ação do sistema nervoso, bem como a influência de fatores humorais (5,24).

Forém, quando se utiliza a conservação por embebição do tecido renal, através do contato direto com as soluções conservadoras, podemos dizer que a maioria destes fatores acima mencionados são eliminados (15,25).

No presente trabalho, utilizando a técnica de microperfusão, procuramos verificar o que acontece com o segmento P3 do túbulo proximal (pars recta) após algumas manobras de conservação direta pelo lado peritubular com as soluções de Collins e Euro-Collins, tendo como parâmetro funcional a absorção de fluido (Jv).

A escolha do lado peritubular da camada epitelial de pars recta para conservação, se deve ao fato de que em trabalhos anteriores foi demonstrado que este é o lado do néfron que melhor se comporta funcionalmente quando submetido à conservação com solução de Collins (17).

Para obtermos um melhor conhecimento sobre o comportamento deste segmento do néfron - pars recta, resolvemos usar de forma pioneira, diferentes manobras de conservação, visando detectar possíveis variações funcionais, já que as pars recta são túbulos com alta taxa de metabolismo aeróbico, o que as torna sensível à anóxia e consequentemente à necrose tubular aguda, podendo assim constituir um indicador adequado da eficiência da conservação renal (20).

Uma de nossas preocupações se deteve em pesquisar a influência do sulfato de magnésio ($MgSO_4$) sobre a viabilidade funcional de pars recta no que diz respeito à sua atividade como agente conservador, sendo que esta substância pode ou não ser incluída como componente da solução de Collins. Autores como Collins e Halasz (11), acreditam que o íon magnésio é um importante componente da

referida solução, porém outros autores (14,28,31), obtiveram excelentes resultados utilizando a solução de Collins sem a adição de $MgSO_4$, bem como outros aditivos como heparina, procaina, fenoxibenzamina.

A razão para a não adição do íon magnésio em solução que contém HPO_3^- seria o fato de resultar na precipitação de $MgHPO_4$, uma complicação que foi primordialmente responsável pela formulação da solução de Euro-Collins, ou seja, solução idêntica à de Collins, porém sem adição de $MgSO_4$.

O maior problema associado com a formação de $MgHPO_4$ é que os cristais formados provavelmente estão presentes nos vasos renais, e podem afetar o fluxo, como também pode causar danos celulares durante o processo de armazenamento (31).

Com relação aos resultados, nas nossas condições experimentais, os túbulos conservados em solução de Collins e Euro-Collins por 30 minutos apresentaram valores de absorção de fluido semelhantes com a literatura (27), sendo que a velocidade de fluxo de fluido nestes grupos (I e II) apresentou-se menor que a encontrada na literatura (9,15), apesar do Jv estar dentro dos limites da normalidade funcional. Esta queda pode ser devida à formação de blocos de debris celulares no lumen epitelial, ou à ocorrência de edema celular no final do período de recuperação. Nessas condições experimentais (grupo I e II) os túbulos que não sofreram necrose tubular após reperfusão, mantiveram suas

condições morfológicas e funcionais, sugerindo que o magnésio parece não influenciar de maneira importante a função celular de pars recta para este tempo de conservação.

Estudos anteriores, em nosso laboratório, utilizando pars recta provenientes de fragmentos corticais incubados em solução de Collins à 42C sem gaseificação por períodos de tempo variando de 5 à 72 horas de conservação, mantiveram suas funções fisiológicas e estruturais após perfusão normotérmica e aeróbica (15). Sendo assim em uma de nossas manobras experimentais, onde incubamos fragmentos corticais nas diferentes soluções (Collins e Euro-Collins) à 42C por 24 horas encontramos resultados semelhantes em termos de viabilidade funcional de pars recta pós perfusão, apesar da velocidade de fluxo de fluido ser inferior (15). Observamos também que nesse período de tempo (24 horas), obtivemos um melhor resultado de conservação funcional de pars recta conservada em solução de Euro-Collins ($p < 0,05$). Esses dados estão de acordo com os estudos de Dreikon et.al., cujos resultados mostraram que a perfusão inicial seguida do estoque hipotérmico do rim de cão com solução de Euro-Collins por períodos de 48 a 96 horas é um método satisfatório de conservação renal, e que está sendo empregado nos grandes centros transplantadores europeus (14).

Pirie e Potts (1986), também observaram uma superioridade da solução de Euro-Collins sobre a solução de Collins, quando utilizada sobre a conservação de túbulos

contornados proximais por até 48 horas, e que o uso desta solução minimiza a ocorrência de NTA (28).

Um fator proveniente do uso da técnica de microperfusão de túbulo renal isolado "in vitro" é a possibilidade de se poder selecionar os túbulos viáveis morfológicamente durante a dissecação. Andrew e Coffey (2), mostraram que após 12 horas de conservação de rim de ratos só 40% dos túbulos contornados proximais estão bem conservados e após 48 horas somente 15% dos túbulos continuam viáveis morfológicamente. Acquatella et. al. , demonstraram em seus estudos histológicos que durante a conservação de rins de cães com solução de Collins por 48 horas haviam áreas de boa conservação tubular alternadas com áreas necrosadas (1). Estes dados sugerem uma heterogeneidade na população de néfrons durante a ação das soluções conservadoras no tecido renal.

Devido a necessidade de se eliminar ao máximo o fato de se poder selecionar os melhores túbulos, resolvemos dissecar túbulos de fragmentos frescos e incubá-los diretamente em câmaras especiais nas diferentes soluções conservadoras (Collins e Euro-Collins) por períodos de tempo variando de uma, duas e vinte e quatro horas. Nestas condições experimentais não observamos para a conservação de uma e duas horas, variações significativas na absorção de fluido e no vazamento de inulina lumen-banho (vazamento menor que 5%). Por outro lado, quando perfundimos os túbulos conservados por 24 horas, não conseguimos obter

absorção de fluido dentro das normalidades funcionais, observando-se também alterações morfológicas importantes como edema, descamação do tecido epitelial, fatores estes que prejudicam a velocidade de fluxo de fluido, sendo necessário aumentar a pressão hidrostática em alguns experimentos. Este fato é evidenciado pela queda na velocidade de fluxo de fluido.

Figueiredo et.al. (17), através do estudo dos efeitos da solução de Collins sobre a estrutura e função de túbulos contornados proximais (P1 e P2) empregando-se a solução conservadora em ambos os lados do túbulo (peritubular e luminal), mostraram que pelo lado luminal, via filtração glomerular, a camada epitelial tubular é sensível a solução de Collins e que por esta via de acesso a solução não é eficaz no processo de conservação. Desta forma, em nossos resultados referentes aos grupos V e VI, observamos que devido ao fato dos segmentos de pars recta estarem isolados e mergulhados diretamente dentro das soluções conservadoras, pode-se supor que estas penetrem através do lado luminal dos túbulos danificando assim a camada epitelial do mesmo. Estes danos acarretariam a queda significativa na absorção de fluido e consequentemente a queda na velocidade de fluxo de perfusão devido à possibilidade de entrada da solução conservadora pelo lado luminal do túbulo, o que sugere um sofrimento das estruturas celulares, compatível com uma necrose tubular aguda.

Através destas manobras experimentais, não encontramos alterações importantes na conservação da função de pars recta com relação ao emprego de $MgSO_4$ como componente importante na solução de Collins, visto que, os túbulos conservados durante uma e duas horas mantiveram suas funções celulares, enquanto que os túbulos conservados durante 24 horas em ambos os grupos (V e VI) não apresentaram condições funcionais satisfatórias.

Nossos estudos sugerem que o uso da solução de Euro-collins não prejudica a função celular por até 24 horas de conservação em fragmentos e por até duas horas no túbulo isolado, tendo como possível vantagem a não formação de cristais de magnésio, o que de certa forma facilita seu uso clínico e experimental.

RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho, estudamos o efeito das soluções de Collins e Euro-Collins sobre as pars recta do túbulo proximal de coelho isolados e perfundidos "in vitro", empregando-se várias manobras de conservação.

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

Também, através do emprego da referida técnica, pudemos estudar o comportamento de segmentos de pars recta, após a conservação de fragmentos embebidos nas soluções conservadoras por 24 horas ou ainda utilizando segmentos isolados incubados em câmaras especiais para conservação, por períodos de tempo variando de 1,2 e 24 horas.

A análise dos resultados de nossas diferentes manobras experimentais indicam que:

- As pars rectas são túbulos realmente sensíveis à conservação, porém mantem suas condições funcionais por um

período seguro de 24 horas, quando retiradas de fragmentos conservados;

- Quando conservamos segmentos isolados e incubados em câmaras especiais para conservação, observamos que os túbulos perdem sua capacidade funcional, entrando em necrose tubular aguda, diferentemente do túbulo retirado de fragmento conservado pelo mesmo tempo de 24 horas. Isto talvez ocorra, devido à possibilidade de selecionar durante a dissecação os túbulos que foram melhor conservados no fragmento renal. Os túbulos isolados de fragmentos frescos e embebidos diretamente nas soluções dentro das câmaras especiais, sofrem sua ação através de ambos os lados da camada epitelial, peritubular e luminal, sendo que a entrada de solução no lado luminal danifica as células epiteliais, favorecendo o edema, descamações e morte celular.

No entanto, os túbulos que foram incubados nas câmaras especiais por períodos de tempo de 1 e 2 horas de conservação nas diferentes soluções mantiveram uma função tubular satisfatória após perfusão.

- Concluimos também, que o uso da solução de Euro-Collins (Collins sem $MgSO_4$) parece não influenciar de maneira muito significativa a conservação de pars recta com relação à estas manobras experimentais, reforçando desta forma a sua utilização clínica e experimental.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- ACQUATELLA, H.; PEREZ-GONZALES, M.; MORALES, J. M.; WHITTEMBURY G. - Ionic and histological changes in the kidney after perfusion and storage for transplantation. Transplantation, 14 (4):480-489, 1972.
- 2- ANDREWS, F. M.; COFFEY, A. - Factors that improve the preservation of nephron morphology during cold storage. Lab invest., 46 (1):100-120, 1982.
- 3- BELZER, F. O.; ASHBY, B. S.; DUNPHY, J. E. - 24-hour and 72 hour preservation of canine kidneys. Lancet, 2:536-539, 1967.
- 4- BELZER, F. O. - Renal preservation. N Engl J Med., 291:402-404, 1974.
- 5- BELZER, F. O.; SOUTHARD, J. H. - The future of kidney preservation. Transplantation, 30(3):161-164, 1980.
- 6- BELZER, F. O.; GLASS, N. R.; SOLLINGER, H. W.; HOFFMANN, R. M. A new perfusate for kidney preservation. Transplantation, 33:322:323, 1982.

- 7- BELZER, F.O.; SOUTHARD, J.H. - Principles of solid-organ preservation by cold storage. Transplantation, 45:673-676, 1988.
- 8- BURG, M.B.; GRANTHAN, J.; ABRAMOW, M.; ORLOFF, J. - Preparation and study of fragments of single rabbit nephrons. Am. J. Physiol., 210 :1293-1298, 1966.
- 9- BURG, M.B.; ORLOFF, J. - Control of fluid absorption in the renal proximal tubule. J Clin Invest., 47:2016-2024, 1968.
- 10- COLLINS, G.M.; BRAVO-SHUGARMAN, M.; TERASAKI, F.I. - Kidney preservation for transportation. Lancet, 2:1219-1222, 1969.
- 11- COLLINS, G.M.; HALASZ, N.A. - Composition of intracellular flush solution for hypothermic kidney storage. Lancet, 220, 1975.

- 12- COLLINS, G.M.; PETERSON, T.; WICOMB, R.; HALASZ, N.A. - Experimental observations on the mode of action of "intracellular" flush solution. J Surg Res., 36:1-8, 1984.
- 13- DOWNES, G.; HOFFMANN, R.; HUANG, J.; BELZER, F.O. - Mechanism of action of washout solution for kidney preservation. Transplantation, 16(1):46-53, 1973.
- 14- DREIKON, K.; HORSCH, R.; ROHL, L. - 48 to 96 hour preservation of canine kidneys by initial perfusion and hypothermic storage using the Euro-Collins solution. Eur Urol., 6:221-224, 1980.
- 15- FALKENSTEIN, D.; CONTI, G.I.; 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 Res., 15:361-365, 1982.

- 16- 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",São Paulo, 1990. (Tese - Doutorado - Escola Paulista de Medicina).
- 17- FIGUEIREDO,J.F.; FALKENSTEIN,D.;DRAIBE,S.A.;SIGULEM,D ; RAMOS,D.L. - The effect of Collins'solution on the function and structure of isolated proximal convoluted tubules from rabbit kidneys, Transplantation,42:80-83, 1986.
- 18- FIGUEIREDO,J.F. - 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. Campinas,1990. (Tese de Livre Docencia - Depto. Clínica Médica - Disciplina de Nefrologia -FCM-UNICAMP).
- 19- 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 auto transplantation. Transplantation,41: 161-165,1986.

- 20- HANLEY, M. J. - Isolated nephron segments in a rabbit model of ischemic acute renal failure. Am. J. Physiol. 239:17-23, 1980.
- 21- HARVING, 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.
- 22- HOFFMANN, R. M.; SOUTHARD, J. H.; LUTZ, M.; MACKETY, A.; BELZER, F. O. - Synthetic perfusate for kidney preservation. Arch Surg. 118:919-921, 1983.
- 23- JABLONSKI, F.; HOWDEN, B.; MARSHALL, V.; SCOTT, D. - Evaluation of citrate flushing solution using the isolated perfused rat kidney. Transplantation, 34 (4):239-243, 1980.
- 24- MARSHALL, V. C. - Renal preservation prior to transplantation. Transplantation, 30:165-166, 1980.

- 25- OISHI, R. - Estudo da conservação renal por diversas técnicas: 1. Avaliação da função do túbulo contornado proximal pela microperfusão "in vitro". 2. Estudo da distribuição de soluções no parênquima renal pela técnica de Hanssen modificada. São Paulo, 1987. (Tese - Mestrado - Escola Paulista de Medicina.)
- 26- OFELZ, G.; TERASAKI, P.I. - Kidney preservation: Perfusion versus cold storage -1975. Transplant. Proc., 8:121-125, 1976.
- 27- PIRIE, S.C.; POTTS, D.J. - Application of cold flush preservation to "in vitro" microperfusion studies of kidney tubules. Kidney Int., 28 :982-984, 1985.
- 28- PIRIE, S.C.; POTTS, D.J. - A comparison of the relative effectiveness of tree transplant preservation fluids upon the integrity and function of rabbit proximal convoluted tubules perfused "in vitro". Clin. Sci., 70:443-452, 1986.
- 29- FLOEG, R.J.; GOOSSENS, D.; McANULTY, J.F.; SOUTHARD, J.H.; BELZER, F.O. - Successful 72-hour cold storage of dog kidney with UW solution. Transplantation, 46:191-196, 1988.

- 30- RIBEIRO, R.C.J. - Efeitos de soluções preservadoras sobre a permeabilidade osmótica do ducto coletor papilar de ratos: Estudo de microperfusão "in vitro". São Paulo 1989. (Tese - Doutorado - Escola Paulista de Medicina)
- 31- 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. Transpl. Proceed., 10:287-291, 1978.
- 32- SCHAFER, J.A. ; BARFUSS, D.W. - The study of pars recta function by the perfusion of isolated tubule segments Kidney Int., 22:434-448, 1982.
- 33- SOUTHARD, J.H.; RICE, M.J.; BELZER, F.O. - Preservation of renal function by adenosine-stimulated ATP syntesis in hypothermically perfused dog kidney. Cryobio., 22:237-242, 1985.
- 34- TOLEDO-PEREYRA, L.H.; CONDIE, R.M. - Comparison of Sacks and a new colloid hyperosmolar solution for hypothermic renal storage. Transplantation, 26(3):166-168, 1978.