

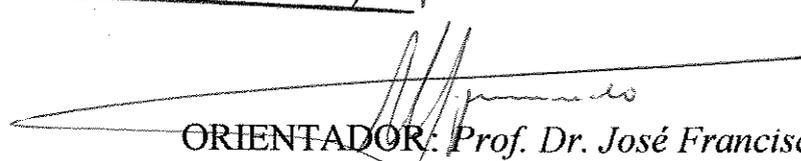
FERNANDA LOPES DA CUNHA/314



**ANÁLISE DE ASPECTOS MORFOLÓGICOS ATRAVÉS DA
TÉCNICA DE HANSSEN MODIFICADA E AVALIAÇÃO DE
FLUXOS DE PERFUSÃO DURANTE A CONSERVAÇÃO RENAL
COM DIFERENTES SOLUÇÕES DE PERFUSÃO: ESTUDO
EXPERIMENTAL EM RATOS.**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida por (a) candidato a)
Fernanda Lopes da Cunha 17
e aprovada pela Comissão Julgadora. 03/94

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


ORIENTADOR: Prof. Dr. José Francisco Figueiredo

Campinas - São Paulo

1994

Aqueles que estão apaixonados pela prática sem a ciência são iguais ao piloto que navega em um navio sem leme ou bússola e nunca tem certeza para onde vai.

A prática deve estar sempre baseada em um perfeito conhecimento da teoria.

Leonardo Da Vinci

The Notebook of Leonardo Da Vinci.

Vol. II. Cap. XXIX (Traduzido por Edward Mac Curdy)

Existe uma lenda acerca de um pássaro que só canta uma vez na vida, com mais suavidade que qualquer outra criatura sobre a Terra. A partir do momento em que deixa o ninho, começa a procurar um espinheiro-alvar e só descansa quando o encontra. Depois, cantando entre os galhos selvagens, empala-se no acúleo mais agudo e mais comprido. E, morrendo, sublima a própria agonia e despende um canto mais belo que o da cotovia e o do rouxinol. Um canto superlativo, cujo preço é a existência. Mas o mundo inteiro pára para ouvi-lo, e Deus sorri no céu. Pois o melhor só se adquire à custa de um grande sofrimento... Pelo menos é o que diz a lenda.

(McCullough, C. Pássaros Feridos. Ed Nova Cultural, 1986).

Aos meus pais,

Angelo Celso e Eunice,

que me ensinaram os princípios cristãos e me apoiaram em todos os momentos durante a árdua caminhada da aquisição do saber.

À minha avó,

Nadira

Aos meus irmãos

Luis Fernando, A. Celso e Angela

À minha cunhada

Elaine

À minha querida sobrinha

Aline

*pelo constante incentivo na realização de cada
passo que resultou neste trabalho.*

À você,

Adriano

"A caminhada por nós iniciada é repleta de surpresas. Em certas ocasiões a estrada se alarga e as dificuldades parecem se esconder por detrás dos morros. Nos momentos em que o caminho se torna estreito e difícil, você está presente dando-me o braço e ajudando-me a transpor cada pedra que aparece pela frente. Tudo certamente teria sido mais difícil sem você ao meu lado. Que Deus, em Sua Plena Magnitude, acompanhe-nos nesta jornada rumo ao infinito. Juntos."

Fernanda

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

"Existem homens que pesquisam, meditam, refletem e sonham com um ideal a realizar, um trabalho a ser elaborado, uma obra a ser executada. Estes sonhos pré-cogitados geram o desejo, o entusiasmo, a criatividade, a força, a vontade de vencer os obstáculos gerando realidades futuras..."

FREITAS, J.A.S.

"A Ciência progride de duas maneiras: adicionando-se fatos novos ou simplificando os existentes."

CLAUDE BERNARD

À DEUS

por nos ter criado a sua imagem e semelhança, dotando-nos de Vida e Força para caminharmos diante às muitas adversidades terrenas.

Aos Professores do Depto. Fisiologia e Biofísica,

"A Educação tem caráter permanente. Não há seres educados e não educados. Estamos todos nos educando. Existem graus de educação, mas estes não são absolutos."(Paulo Freire). Somos todos aprendizes uns dos outros e, portanto, estamos imbricados num mesmo objetivo. Obrigado por dividirem comigo a sabedoria que a vida vos deu.

Aos Colegas de Pós-Graduação

"Vivemos uma mesma realidade e a cada um de nós ela nos tem mostrado uma faceta. Juntos poderemos adquirir as forças necessárias para atravessar o caminho que estamos construindo. Afinal, a Ciência depende do trabalho de pesquisa de cada um de seus empreendedores para se desvendar o mistério da vida."

Ao Prof. Dr. José Francisco Figueiredo

"Quase todos os grandes inventos, as grandes descobertas, pelos quais aprendemos a conhecer melhor o céu e a terra e a nós mesmos, foram feitos pela energia, pelo sacrifício, pela abnegação e pela coragem dos grandes homens, os quais, apesar das oposições e dos ultrajes de seus contemporâneos, não desanimaram na conquista dos seus ideais."(A.M.)

Ao Prof. Dr. Emil Sabbaga

"Atualmente, os caminhos da Ciência tomaram rumos interessantes. Cada qual leva-nos a intrigantes descobertas e nos estimulam a continuar a caminhada em direção ao conhecimento. Juntos fazemos desta prática o cotidiano; questionamos, levantamos hipóteses, experimentamos. Afinal, esta é a base da conquista do saber."

Ao Prof. Dr. Gentil Alves Filho

"A Ciência nos empolga e faz-nos indivíduos questionadores diante dos desafios. Mas o verdadeiro sentido desta luta é o constante intercâmbio das nossas experiências com aqueles que compartilham desta mesma batalha. Certamente tal troca faz-nos crescer em direção ao saber. "

Ao Prof. Dr. Ernesto José D'Ottavianno

"A transmissão do conhecimento é uma tarefa extremamente difícil. Porém, Deus dotou certos seres humanos de capacidade tal que esta tarefa se tornou parte do seu cotidiano, fazendo de cada gesto uma forma de se ensinar."

Ao Prof. Dr. Odair Benedito Ribeiro (Prof. Depto. Parasitologia-IB-UNICAMP)

"Uma centelha isolada logo se apaga e morre. Mas ao juntá-la às demais temos uma grande fornalha capaz de contar àqueles ao seu redor que somente a união garante o sucesso da batalha." Agradeço a grande ajuda por ocasião da confecção das fotos deste trabalho.

Ao Orlando Alves Júnior, Técnico de Laboratório e Fabiana S.A. de Paula, Bióloga

"Toda força é fraca se não é unida." (La Fontaine)

À amiga de todas as horas :Dona Cléo

"Nunca deixe que pensamentos negativos ou sugestões inimigas penetrem em seu espírito. Você está acima de tudo isto; é um ser livre, forte e positivo." (A.M.) Não poderia deixar de fazer menção à você na finalização desta etapa de minha vida. Agradeço a Deus por ter permitido o nascimento da nossa amizade. Que seja eterna."

À eterna amiga e afilhada Andréa Redondano Pompeu Lavoura

"Encontrar as pessoas certas para relacionar-se e considerá-las as suas amigas não é tarefa de um dia só, mas da vida toda. Há pessoas que são familiares pelo designio do sangue, há outras que são familiares pelo designio do céu." Amiga, que a cada experiência futura possamos estar novamente juntas. Afinal, o nosso encontro não foi ao acaso."

À amiga Carla Andréa de Lima Ribeiro

"Neste momento em que nossos caminhos se dividem, fica em nossos corações as lembranças. Que elas nos tragam consigo os ensinamentos presentes em cada gesto amigo." Sentirei saudades..."

À amiga Eliane Pires de Oliveira Dias (LIKA)

*"Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos de que as grandes proezas da História foram conquistadas do que parecia impossível."
Nossa amizade começou de repente. E será eterna. Obrigado pelo apoio constante!*

Aos amigos Marlene, Paulo, Eliana Dantas,

"A fertilidade da imaginação é imprescindível para que se efetue a passagem do imperfeitamente ao menos imperfeitamente conhecido, aquilo a que chamamos descobrimento." (Darwin).

Aos demais amigos do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental

"O cotidiano nos aproximou e fez-nos companheiros de uma luta difícil: a continuidade da pesquisa na área médica. A conquista de cada um de nós em prol deste objetivo é imprescindível para nos dar força e coragem. Continuemos esta batalha."

À CAPES e ao CNPq

...por ter financiado este projeto e garantir que a pesquisa continue num país marcado pela miséria, inflação, educação deficitária, saúde em caos e fome.

Aos amigos da FOP

"A convivência durante este primeiro semestre fez-nos amigos. E durante esta fase final da minha caminhada vocês sempre estiveram presentes. Obrigado pelo constante estímulo. Valeu a pena o sacrifício!!!"

Ao meu primo Eng. Luís Roberto Lopes da Cunha

"... pela valiosa ajuda e disposição por ocasião da impressão final deste trabalho. São os pequenos gestos que engrandecem a intensa luta pelo desenvolvimento da Ciência. Muito Obrigado!!!"

...e a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte do mutirão responsável pela edificação desta obra. Sem o apoio de várias mãos trabalhando por este mesmo ideal seria impossível chegar sozinha ao final desta jornada. E nos resta apenas começar uma nova viagem"

Fernanda Lopes da Cunha

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Conservação de Órgãos - *Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental* - FCM - UNICAMP e teve apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - *CNPq* e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - *CAPES*.

ÍNDICE

ÍNDICE

I nrodução.....	<i>pág.01</i>
O jetivos.....	<i>pág.14</i>
M aterial e M étodos.....	<i>pág.15</i>
R esultados.....	<i>pág.34</i>
D iscussão.....	<i>pág.60</i>
S umário e C onclusões.....	<i>pág.77</i>
R esumo.....	<i>pág.80</i>
S ummary.....	<i>pág.83</i>
R eferências B ibliográficas.....	<i>pág.85</i>

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O transplante renal tem se mostrado uma das formas eficazes de tratamento de Insuficiência Renal Crônica, além de representar uma avanço importante na Medicina Moderna. Para tanto, as técnicas cirúrgicas e metodologias adequadas à conservação hipotérmica tem se modificado a fim de que haja sucesso no transplante bem como garantia de bom funcionamento e sobrevida do enxerto (*BELZER et al, 1983⁹*).

O campo de pesquisa na área de preservação de órgãos para transplante com o objetivo de desenvolver um método eficaz de armazenamento "ex-vivo" de rim de doadores cadáveres tem se ampliado. A conservação adequada vem a ser um importante coadjuvante para a manutenção do potencial biológico do órgão sem aumento concomitante de *Necrose Tubular Aguda* (NTA)(*ROHR, 1983⁷⁶*).

A ampliação do tempo de conservação e manutenção da viabilidade do órgão é fundamental para que se tenha tempo hábil para a

realização dos testes de histocompatibilidade no processo de seleção do receptor com maior possibilidade de sucesso bem como a mobilização da equipe médica para a realização da cirurgia (*DREIKORN et al, 1980³⁴; JOHNSON, 1972⁴⁶*).

A depleção dos estoques celulares de nucleotídeos de adenosina altamente energéticos; o acúmulo de metabólitos - especialmente de íons hidrogênio ; autólise pela liberação de enzimas lisossomais; danos da membrana celular com perda dos constituintes fosfolipídicos; injúria vascular resultando em edema; perda de proteínas circulantes e hemólise no compartimento extravascular são algumas das causas da deterioração tissular e eventual perda da função renal durante o processo de conservação de órgãos (*GREEN et al, 1986³⁸*). Surgem, em meio aos processos celulares acima citados, métodos e soluções formuladas com o objetivo de minimizar tais mecanismos de perda de função orgânica, e proporcionar condições adequadas para a manutenção da integridade tecidual do órgão destinado ao transplante (*PIRIE & POTTS, 1986⁶⁶*).

Atualmente, existem dois métodos utilizados na preparação e conservação do órgão destinado ao transplante. Tais técnicas tem permitido melhor preservação tecidual e funcional mas tem falhado quando o período de conservação ultrapassa 24 horas, podendo causar deterioração do órgão, levando a lesões vasculares (*NORLEN et al, 1978⁶¹*)

e hipóxia (ENGBERGER *et al*, 1983³⁵) com consequente NTA (NORLEN *et al*, 1978⁶¹; DONOHOE *et al*, 1978³²; MORGAN, 1992⁵⁶). Dentre estes dois métodos, a escolha do melhor é controversa pois cada um difere tecnicamente entre si (CLARK *et al*, 1973²³; RÖTH *et al*, 1974⁷⁸) apresentando, cada qual, suas vantagens e desvantagens. Desta forma, temos as seguintes técnicas:

1. Perfusão contínua do rim com solução semelhante ao plasma utilizando-se de Bombas de Perfusão contínua (BELZER *et al*, 1967⁶):

Nestas condições, a composição das soluções conservadoras é muito próxima à do plasma, no que diz respeito à composição eletrolítica e coloidosmótica. A perfusão é feita por bomba hidrostática e o perfusato, hipotérmico, é composto por crioprecipitados protéicos sem atividade antigênica (BELZER *et al*, 1967⁶). A perfusão renal é contínua, em hipotermia de 5-10° C e sob pressão de 20-60 mmHg. O efluente venoso é filtrado, oxigenado e recirculado em sistema fechado.

Este método de conservação renal é controverso com relação ao tempo de exposição do órgão ao sistema, segundo seus autores e quem o utiliza, permitindo períodos de conservação maiores (5 dias), preservação a médio (2 a 3 dias) e curto (horas) prazo de melhor qualidade (McANULTY *et al*, 1993⁵⁴; LINDELL *et al*, 1991⁴⁷). Contrário ao método de

estocagem a frio, como descrito posteriormente, este método permite a contínua introdução e remoção de componentes do órgão preservado. Assim, é possível se remover produtos finais do metabolismo além de se fornecer inibidores enzimáticos, drogas, ou anticorpos. Tais manobras permitem que se diminuam os danos causados pela isquemia ou até mesmo se altere a imunogenicidade do rim antes da sua implantação (McANULTY *et al*, 1993⁵⁴).

Tal técnica é muito dispendiosa pois exige aparelhagem bastante complexa e pessoal especializado no seu manuseio (MARSHALL, 1980⁵¹; AGUILO *et al*, 1975²). Relatos descrevem que este método promove acúmulo de metabólitos tóxicos como radicais livres (BELZER & SOUTHARD, 1980¹⁰) e proteínas desnaturadas (SOUTHARD *et al*, 1981⁸⁸), danos vasculares após várias perfusões prolongadas (BELZER *et al*, 1972⁸), além de acúmulo de materiais tóxicos provenientes de componentes plásticos de equipamento (BELZER & SOUTHARD, 1980¹⁰). Além disso, os tempos de preservação propostos parece não corresponder à realidade, assim como os riscos de acidentes serem elevados neste tipo de preparação aparecendo um quadro de rim não funcionando após uso prolongado deste equipamento ("rim da bomba") (CERRA *et al*, 1977²²; HILL *et al*, 1976⁴²).

2. Armazenamento a frio (COLLINS *et al*, 1969²⁶):

COLLINS e colaboradores (1969²⁶) introduziram um método no qual o órgão é armazenado a frio, após rápida perfusão por pressão hidrostática, em soluções iônicas com propriedades conservadoras. Tal técnica recebeu aceitação dos Centros Transplantadores por ser uma forma simples e econômica de estocagem e transporte do órgão bem como a facilidade da confecção das soluções conservadoras (*MARSHALL, 1980⁵¹; COLLINS & HALASZ, 1975²⁸*). Os resultados dessa técnica são tão bons quanto aqueles obtidos com a perfusão contínua por bomba (*AGUILO et al, 1975²; COLLINS & HALASZ, 1975²⁸; OPERLZ & TERASAKI, 1976⁶³; ROSS et al, 1976⁷⁷*).

O sucesso do transplante está vinculado ao bom funcionamento do órgão logo após o reimplante, com as estruturas renais bem conservadas. Estudos morfológicos através de biópsias renais de órgãos mantidos em estocagem a frio mostrou como consequência desta técnica a ocorrência de edema celular, diferentemente nas diversas porções do néfron (*ARVIG et al, 1980⁴*), e vacúolos com obliteração e colapso dos capilares, fratura e descolamento da membrana basal peritubular e hialinização do interstício renal (*ROHR, 1983⁷⁶*).

A preservação hipotérmica é semelhante à hipóxia, onde não há oxigênio e, portanto, não há formação de ligações de fosfato com alta energia. O resfriamento vem a ser um importante passo na preservação da função celular, condição esta em que o suprimento de oxigênio está deficiente com conseqüente diminuição das atividades metabólicas em tecidos onde o alto índice de metabolismo aeróbico se faz presente, como o observado na região cortical do rim (*PIRIE & POTTS, 1986⁶⁶*). Assim, nestas condições, as bombas dependentes de ATP e demais componentes fosfatados estão quiescentes quando em hipotermia, com desaparecimento subsequente do potencial de membrana (*PIRIE & POTTS, 1986⁶⁶; BELZER & SOUTHARD, 1986¹¹; BELZER, 1974¹³*). Temos, assim, um decréscimo dos danos causados pela isquemia e prolongamento do tempo para a manutenção do órgão viável ao transplante subsequente (*ZAGER & ALTSCHULD, 1986⁹²*).

Para que o armazenamento a frio seja eficaz, três princípios básicos precisam ser considerados: *a.* Durante a retirada do órgão, através da perfusão vascular com a solução de estocagem, o mesmo deve ser rapidamente resfriado e o sangue devidamente removido, permitindo o equilíbrio entre o tecido e a solução de estocagem a frio; *b.* A solução utilizada no armazenamento a frio, através de componentes osmoticamente ativos e impermeáveis à célula, deve prevenir o edema

celular; *c.* A solução em questão deve prevenir a acidose celular excessiva através da presença de tampões para íons hidrogênio em sua composição (*PLOEG et al, 1988*⁶⁷). Porém, esta forma de preservação é limitada quanto ao tempo de manutenção do órgão em condições hipotérmicas, pois tal condição não interrompe o metabolismo celular - apenas diminui a velocidade das reações metabólicas e retarda a morte das células - resultando, a longo prazo, no interrompimento do funcionamento e na perda da viabilidade deste órgão (*BELZER & SOUTHARD, 1988*¹²). A utilização de uma solução apropriada para a perfusão deste órgão poderá aumentar o tempo de estocagem a frio de rins por até 30 horas (*COLLINS et al, 1969*²⁶)

Essas técnicas são falhas quando os períodos de conservação excedem 24 horas não conseguindo prevenir a deterioração do órgão, levando-o à *NTA* (*DONOHUE et al, 1978*³²; *MORGAN et al, 1992*⁵⁶) embora estudos do transporte tubular proximal *in vitro*, utilizando-se de rins humanos preservados por 37,8 horas em solução eletrolítica hipotérmica apresentaram manuseio de para-amino-hipurato (PAH) após este período de conservação demonstrando habilidade renal para o transporte de componentes orgânicos, mesmo após estocagem a frio por tempo prolongado (*BENNETH et al, 1982*¹⁴). Para que o órgão esteja viável como um todo para o reimplante, sabemos que a conservação adequada deverá se estender por todas as estruturas e ao órgão como um todo e não somente de

uma determinada porção celular deste órgão. A avaliação da deterioração funcional consequente ao tempo prolongado de conservação fica, às vezes, difícil de ser detectada devido à rejeição aguda, o que agrava o quadro de insuficiência renal aguda por *NTA* (*BESARAB et al, 1984¹⁷*).

Assim, continua a procura por perfusatos de diferentes composições apropriadas à conservação total do órgão para transplante bem como técnicas mais adequadas para este fim, na tentativa de driblar os danos causados pelo hipotermia a que o órgão fica exposto (*ACQUATELLA et al, 1972¹*; *SACKS et al, 1973⁷⁹*; *CLARK et al, 1973²³*; *DOWNES et al, 1973³³*; *RÖTH et al, 1974⁷⁸*; *AGUILO et al, 1975²*; *ROSS et al, 1976⁷⁷*; *OPELZ & TERASAKI, 1976⁶³*; *HALASZ & COLLINS, 1976⁴⁰*; *DAHLAGER & BILDE, 1976³¹*; *PEGG, 1977⁶⁵*; *TOLEDO-PEREYRA & CONDIE, 1978⁹⁰*; *MARSHALL et al, 1978⁴⁹*; *JABLONSKY et al, 1980⁴⁴*; *DREIKORN et al, 1980³⁴*; *BELZER et al, 1982⁷*; *BENNETT et al, 1982¹⁴*; *HOFFMANN et al, 1983⁴³*; *SEGAL & GUTTMAN, 1983⁸³*; *BESARAB et al, 1984¹⁷*; *COLLINS et al, 1984a²⁵*; *COLLINS et al, 1984b²⁹*; *BRY et al, 1984²¹*; *BELZER & SOUTHARD, 1988¹²*; *LODGE et al, 1991⁴⁸*; *BELZER et al, 1982⁷*; *McANULTY et al, 1993⁵⁴*).

Para que uma solução seja realmente efetiva, esta deverá conter componentes que: *a.* diminua o edema celular; *b.* previna a acidose intracelular; *c.* previna a expansão do espaço intersticial durante a reperfusão; *d.* previna os danos causados pelos radicais livres de oxigênio e *e.* possua substratos para a geração de compostos fosfatados de alta energia durante o

período de reperfusão (BELZER & SOUTHARD, 1988¹²; JABLONSKI *et al*, 1980⁴⁴). Alguns investigadores demonstraram que a inibição do edema celular, mais do que a manutenção do conteúdo celular de potássio, pode ser o fator mais importante do efeito preservador das assim chamadas soluções que mimetizam o meio "intracelular" durante o armazenamento hipotérmico (COLLINS *et al*, 1984b²⁹; COLLINS *et al*, 1969²⁶; DOWNES *et al*, 1973³³; SIMÕES *et al*, 1984b⁸⁷; ACQUATELLA *et al*, 1972¹; COFFEY & ANDREWS, 1983²⁴). A utilização de vários perfusatos de diferentes composições (hiperosmolar-intracelular, hiperosmolar-extracelular, com ou sem aditivos de Magnésio, colóides, procaina, fenoxibenzamina e heparina) tem trazido resultados contraditórios fazendo da procura da solução conservadora ideal uma tarefa complicada (SACKS *et al*, 1973⁷⁹).

Na preservação por longos períodos, o cálcio parece desempenhar um importante papel na manutenção da viabilidade do rim. A utilização de baixas concentrações deste íon (0,5 mmol/L Ca) aumentam as funções mitocondriais e a viabilidade renal pós-transplante (63% de sobrevivência pós-transplante), enquanto ocorre redução dos índices funcionais e a sobrevivência do enxerto para 0% e 17% na utilização de altas concentrações deste íon (1,5 mmol/L Ca) ou na ausência do mesmo, respectivamente. Assim, tais dados indicam que baixas concentrações de cálcio são necessárias para a manutenção da viabilidade do órgão destinado ao transplante, provavelmente devido à estabilização de membrana ou pela interação célula à célula (McANULTY *et al*, 1993⁵⁴).

A presença ou não do Magnésio na solução de conservação é muito discutida, defendida por uns e questionada por outros pesquisadores. Este íon foi considerado um potente coadjuvante na preservação hipotérmica renal devido às concentrações elevadas do mesmo encontrada no soro de animais hibernantes (*SCHWEIZER & SUTPHIN, 1982⁸²; SACKS et al, 1978⁸⁰*). O magnésio, encontrado na solução de *COLLINS* (*DREIKORN et al, 1980³⁴; COLLINS et al, 1969²⁶*) é um inibidor metabólico, vasodilatador e preservador da concentração intracelular de potássio inibindo o efeito da rigidez de membrana causada pelo cálcio além de estar envolvido em importantes sistemas enzimáticos de produção de ATP. Apesar disso, o seu comportamento não tem correspondido às expectativas, havendo formação de fosfato de magnésio mediante à sua utilização em soluções de preservação (*COLLINS et al, 1984a²⁵; SACKS et al, 1978⁸⁰; SCHWEIZER & SUTPHIN, 1982⁸²*), cristais estes que levam a lesões da membrana celular no período de conservação.

A maioria dos Centros Transplantadores (*DREIKORN et al, 1980³⁴*) decidiram utilizar tal solução na ausência de Magnésio, substituindo-o por quantidade equivalente de glicose (*COLLINS et al, 1984a²⁵*). Esta solução é chamada de solução de *EURO-COLLINS* e tem se mostrado eficiente na conservação de rins de cão (72-96 h) e humanos (mais de 50 h) com taxa de NTA menores que 20% (*COLLINS et al, 1984a²⁵*). Sua eficiência é atribuída, principalmente, à inibição do edema

celular e secundariamente aos movimentos iônicos pela membrana celular (JAMART & LAMBOTTE, 1983⁴⁵), ressaltando a importância dos agentes osmóticos presentes nas soluções conservadoras em contraponto à composição iônica destas soluções (COFFEY & ANDREWS, 1993²⁴; HOFFMANN *et al*, 1983⁴³). Túbulos coletores corticais isolados conservados diretamente nessa solução mantêm uma boa função celular por 1 h de conservação, havendo queda de função celular com o aumento do tempo de conservação para 3 e 24 h (RIBEIRO *et al*, 1992⁷²; RIBEIRO *et al*, 1993⁷³; RIBEIRO *et al*, 1994⁷⁴).

Cumprе salientar que, mesmo com o avanço da tecnologia em biomedicina, a confecção destas soluções são empíricas, obedecendo a lei do "erro" e do "acerto" (*eurística*). Deste modo, verificamos a necessidade da montagem de modelos experimentais adequados a fim de testar a eficiência de tais soluções durante o processo de conservação renal bem como a sistematização de estudos da fisiologia celular para que tais soluções possam ser manipuladas atingindo uma eficiência máxima através de um maior conhecimento de seu modo de ação (GUILLAUMON, 1991³⁹).

Recentemente, um grupo de investigadores da Universidade de Wisconsin, após estudos sistemáticos da atuação de vários componentes bioquímicos necessários à conservação de órgãos, lançou uma nova solução conservadora para lavagem a frio, com perfusão por pressão hidrostática, a qual foi chamada de solução da UNIVERSIDADE DE WISCONSIN (BELZER & SOUTHARD, 1988¹²). Estudos sistemáticos desse

grupo levaram a criação de uma solução baseada em conhecimentos bioquímicos celulares importantes, tais como colóides não protéicos para evitar a antigenicidade, potássio hipertônico (lactobionato de potássio) e a não utilização de manitol ou sacarose como agentes osmóticos os quais podem ser tóxicos para a célula, além do acréscimo de substratos energéticos como a adenosina (*BELZER & SOUTHARD, 1988¹²*).

Estudos experimentais revelaram o sucesso dessa solução na conservação por 72 h de rins de cães (*PLOEG et al, 1988⁶⁷*), também se mostrando eficaz na conservação de rins para transplante com diminuída percentagem de NTA pós transplante e taxa de diálise pós operatória (*MOUKARZEL et al, 1990⁵⁸; PLOEG, 1990⁶⁸; ROSS et al, 1976⁷⁷*) embora em período não tão prolongado. Dentre os componentes desta solução, temos a adenosina, a glutatona como "scavenger" de radicais livres e alopurinol, um inibidor da xantina oxidase. Porém, seu custo dispendioso tem levado investigadores a substituir certos componentes por outros menos dispendiosos ou até mesmo suprimi-los da solução original (*MARSHALL et al, 1991a⁵⁰; MARSHALL et al, 1991 b⁵²; MEL et al, 1990⁵⁵; SCHLUMPF et al, 1991⁸¹; BAATARD et al, 1993⁵*).

Em meio à realidade em torno das dificuldades encontradas em se manter a viabilidade do órgão destinado ao transplante, e em virtude dos avanços tecnológicos ocorridos nas áreas básica, clínica (diálise, imunossupressão, melhora da conservação) e cirúrgica, o

transplante renal tem sido realizado nos diversos centros rotineiramente com relativo sucesso (*POMPEU, 1993⁷¹*). Para que o aperfeiçoamento de tais técnicas seja alcançado, a pesquisa na área de conservação de órgãos e a procura de uma solução conservadora próxima à ideal deverá continuar nos diversos grupos de pesquisa.

Uma possibilidade para estudo destas soluções ainda inexplorada é a sua qualidade de distribuição no parênquima renal durante o processo de perfusão extracorpórea. Esta distribuição é vital para a ação de tais soluções pois, teoricamente, quanto mais homogênea sua distribuição, melhor será a conservação do órgão em questão, e por esta via, a solução conservadora manterá uma maior população de néfrons em boas condições de funcionamento no pré e pós transplante, dependente ou não das complicações cirúrgicas ou imunológicas que eventualmente podem ocorrer durante ou após o reimplante.

Assim, neste estudo mostramos o efeito das soluções conservadoras de *Collins, Euro-Collins e Universidade de Wisconsin*, utilizadas no transplante renal, bem como da solução de *Krebs-Henseleit modificada* (CONTROLE) sobre a morfologia do parênquima renal através da *Técnica de Hanssen modificada* pelo nosso laboratório (*HANSSEN, 1958⁴¹; OISHI, 1987⁶²*).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

O presente trabalho se propôs a investigar a distribuição das diferentes soluções conservadoras utilizadas no transplante clínico sobre as características morfológicas do parênquima renal, avaliada pela Técnica de Hanssen modificada, bem como os parâmetros funcionais envolvidos neste processo.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

A. Animais Experimentais

O presente estudo foi realizado em 125 ratos machos da raça *Wistar* com peso variando entre 280-330 gramas ($x=305,90 \pm 28,89$ gramas). Os animais foram fornecidos pelo *Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP*, mantidos em gaiolas coletivas, com acesso livre à água e dieta industrializada para ratos.

B. Preparação Pré-Cirúrgica do animal

Após a pesagem do animal utilizado no experimento, este foi anestesiado com *Thiopental sódico* (50 mg/kg de peso do animal), colocado sobre mesa cirúrgica aquecida a 37° C e teve seu abdômen embebido em álcool absoluto.

C. Aspectos Cirúrgicos

Após a preparação pré-cirúrgica, a cavidade abdominal foi exposta por ampla incisão em forma de U com a concavidade apontada para cima e 100 U de heparina foram injetadas na veia cava inferior.

Procedeu-se o afastamento das vísceras e devida hidratação das mesmas com solução de NaCl 0.9% (*solução fisiológica*) hidratação esta realizada repetidas vezes durante todo o procedimento cirúrgico. Deu-se a exposição do rim direito bem como do respectivo ureter para, posteriormente, proceder-se a cateterização deste último (*Foto 1B*) com cateter de polietileno (PE-10 - I.D. .28 mm e O.D. . 61 mm - Intramedic - *Clay Adams*) previamente preenchido com solução de heparina (5000 U/ml), e acoplado a tubo de ensaio graduado em anexo para coleta do eventual filtrado. Procedeu-se a dissecação das artérias renal direita, aorta e mesentérica superior direita bem como das veias renal direita e cava (*Foto 1C*). Tomou-se o cuidado de se clampar a artéria mesentérica na sua porção proximal à aorta, facilitando a canulação subsequente da artéria renal, sem extensa hemorragia (*Foto 1C*). De acordo com o método descrito por *NISHITSUTSUJI-UWO, ROSS E KREBS (1967⁶⁰)*, a artéria renal direita foi canulada via artéria mesentérica superior direita por meio de cânula metálica confeccionada pelo nosso Laboratório. Para confecção desta cânula utilizou-se a agulha do cateter intravenoso radiopaco de Teflon nº 18 - G (*Abboath nº 18 - G*), a qual foi devidamente preparada para se adequar aos objetivos da técnica.

D. Perfusão renal por gravidade

O sistema de perfusão descrito por *MORGAN et al.* (1961⁵³) para coração de ratos, foi aprimorado (*NEELY et al.*, 1967⁵⁵), modificado e adaptado para perfusão renal de ratos (*BOWMAN*, 1970¹⁷; *BOWMAN & MAACK*, 1972²⁰).

Após o procedimento cirúrgico acima descrito e devidamente ilustrados na *Figura e Foto 1A, B, C e D*, procedeu-se a perfusão por gravidade. Para tanto, o perfusato utilizado foi colocado em condensador de parede dupla, situado a 120 cm acima do rim - altura esta responsável por uma pressão de escoamento em torno de 80 mmHg -, e acoplado a um banho-maria (*Forma Scientific, USA - Modelo 2095 S/N*) com capacidade de resfriamento/aquecimento variando de -40° a +70° C (*Figura 1a*), regulado a uma temperatura de +10° C. O sistema montado permitiu que a temperatura do perfusato utilizado permanecesse constante durante toda a perfusão do órgão, pois a circulação de água por entre as paredes do condensador perdurou durante todo o experimento, a uma temperatura constante pré-determinada.

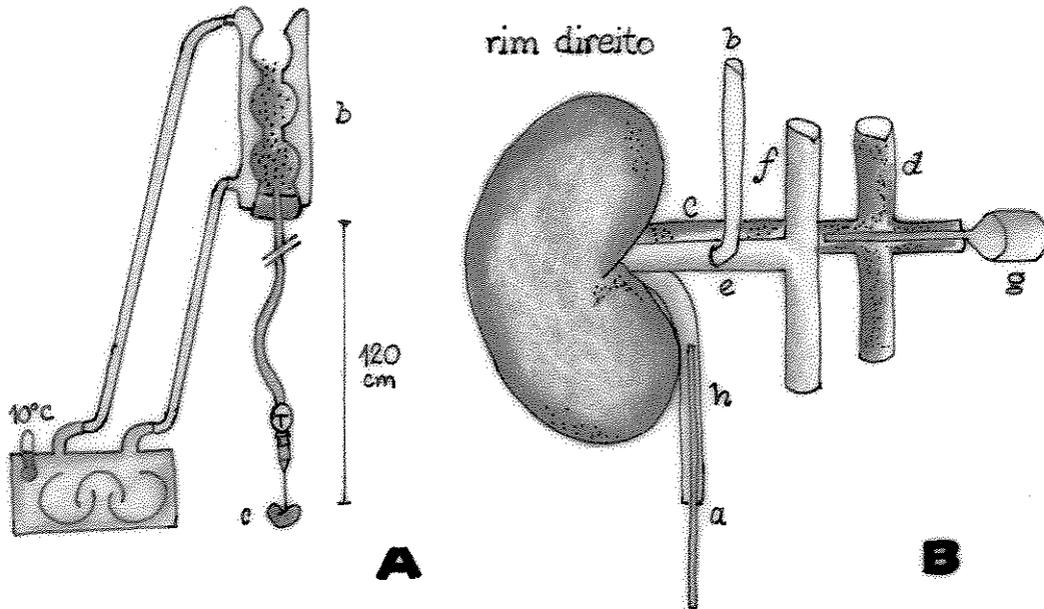
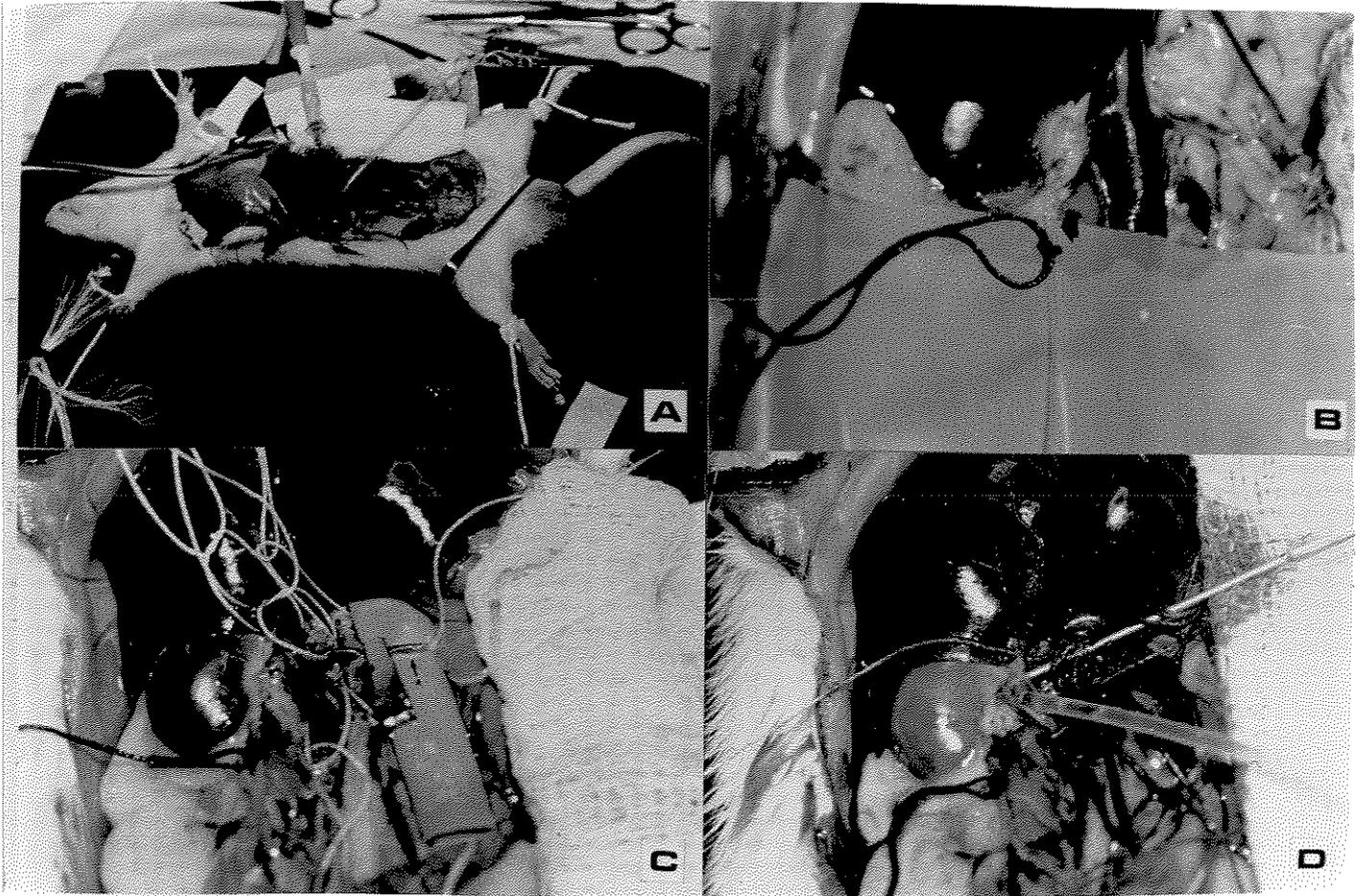


FIGURA 1 - A. Esquema de perfusão renal por gravidade:

a. Banho-maria (Forma Scientific - USA - Modelo 2095 S/N) acoplado ao sistema, regulado a uma temperatura de 10° C ; *b.* Reservatório de dupla parede para recirculação de água resfriada no banho-maria e elevado a 120 cm (80 mmHg) acima do rim; *c.* Rim devidamente canulado.

B. Detalhe do esquema de Perfusão por gravidade:

a. Ureter cateterizado com Cateter de polietileno (PE-10); *b.* Cateter acoplado na veia renal para coleta de perfusato; *c.* Artéria renal direita; *d.* Aorta; *e.* Veia renal direita; *f.* Veia Cava; *g.* Cânula metálica para perfusão renal acoplada devidamente à artéria renal, segundo NISHITSUTSUJI-UWO et al (1967); *h.* Ureter direito.



- FOTO 1** - **A.** Visualização global do experimento de perfusão renal por gravidade;
B. Cateterização do ureter direito : *a.* Cateter de polietileno (PE-10);
b. Ureter direito;
C. Visualização do campo cirúrgico devidamente isolado para posterior realização da canulação da artéria renal direita: *a.* artéria mesentérica superior direita; *b.* artéria renal direita.;
D. Visualização da perfusão renal propriamente dita. Observar a coloração do órgão.

O procedimento de canulação da artéria renal deve ser rápido a fim de evitar isquemia do órgão antes do início da perfusão por gravidade. Assim, não há interrupção da perfusão renal a qual é feita inicialmente pelo sangue e posteriormente pelo perfusato (*Figura 1 e Foto 1A,1B,1C,1D*). Após o início da perfusão, colocou-se um cateter de polivinil flexível (*PE-190*) na veia renal a fim de se coletar, em tubo de ensaio anexo, o perfusato após a sua passagem pelo rim (*Foto 1A*). Foi também cateterizado o ureter para a coleta de eventual filtrado.

Terminada a total perfusão renal, avaliada pela coloração esbranquiçada do órgão (*Foto 1D*), resultante da lavagem feita pela solução utilizada na referida perfusão, e pela coloração do perfusato coletado pela veia renal, previamente cateterizada, procedeu-se a nefrectomia total direita.

D.1. Tempo de perfusão

O tempo de perfusão não foi previamente fixado, ficando o término da mesma vinculado à coloração esbranquiçada do órgão e clareamento do perfusato coletado pela veia renal durante esta manobra experimental.

E. Mensuração dos Parâmetros Funcionais

Os parâmetros funcionais analisados foram: *Tempo de Perfusão, Volume total perfundido, fluxo de perfusão, % rins filtrantes, e fluxo de perfusão após 1 e 24 horas de conservação.*

a. Tempo de perfusão

A determinação do *tempo total de perfusão* se deu pela mensuração do instante inicial e final do processo de perfusão renal por gravidade, com as diversas soluções utilizadas neste estudo a uma temperatura de 10° C e 80 mmHg de pressão de escoamento. A diferença entre os tempos (final - inicial) resultará no tempo total de perfusão. Não houve fixação do tempo pois o parâmetro para o término da perfusão foi a coloração esbranquiçada do órgão, resultante da lavagem feita pela solução utilizada na referida perfusão, e pela coloração do perfusato coletado pela veia renal, previamente cateterizada (*Equação 1*).

$$\text{Tempo de Perfusão (min)} = \text{Tempo final} - \text{Tempo inicial} \quad 1$$

b. Volume total Perfundido

Da mesma forma a mensuração do *volume total* utilizado na perfusão foi feita através da observação do volume utilizado no início da perfusão e o volume restante após o final do experimento. Assim, a diferença entre os volumes citados (inicial - final) nos dará o volume total perfundido (*Equação 2*).

$$\text{Volume Total Perfundido (ml)} = \text{Volume inicial} - \text{Volume final} \quad 2$$

c. Fluxo de Perfusão imediata e após conservação por 1 e 24 horas

O *fluxo de perfusão*, tanto a imediata quanto após o período de conservação, é resultante da razão entre o volume total perfundido e o tempo de perfusão, sendo o resultado expresso em ml/min (*Equação 3*).

$$\text{Fluxo de perfusão} = \frac{\text{Volume total perfundido}}{\text{Tempo de Perfusão}} \quad 3$$

Após 1 e 24 horas de conservação, foram medidos os volumes inicial e final da solução de perfusão utilizada na reperfusão do órgão (*Equação 1*) bem como o tempo (inicial e final) gasto durante esta perfusão (*Equação 2*). Tendo em mãos estes parâmetros, obteve-se o fluxo de perfusão após 1 e 24 horas, pelo mesmo cálculo da *Equação 3*.

d. Percentagem de Rins filtrantes

Entende-se por rins filtrantes aqueles que, durante o procedimento experimental produziram quantidade de filtrado suficiente para ser detectado pelas nossas condições experimentais e devidamente coletado em tubo de ensaio graduado. Assim, quantidades muito pequenas de filtrado, eventualmente produzidas, porém não detectadas, não foram consideradas neste estudo devido à limitação da técnica.

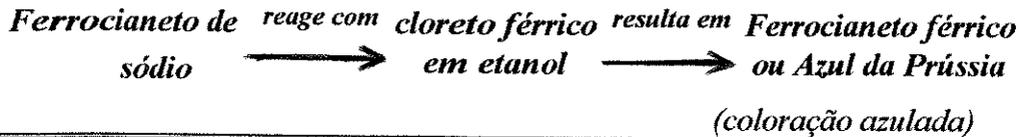
Após a cateterização do ureter direito com cateter de polietileno (PE-10), durante o processo de perfusão renal por gravidade, coletou-se em tubo graduado o eventual filtrado produzido. Este procedimento foi importante para a obtenção do percentual de rins que filtraram a solução de filtração, através da razão entre aqueles rins filtrantes e o total de rins por grupo, multiplicando-se tal razão por 100.

$$\textit{Percentagem de Rins filtrantes} = \frac{\textit{Total de Rins Filtrantes}}{\textit{Total de Rins no grupo}} \times 100$$

F. Técnica de Hanssen modificada

A avaliação da distribuição da solução de perfusão pelo parênquima renal foi avaliada pela *Técnica de Hanssen modificada* pelo nosso Laboratório, adaptada às nossas condições experimentais (OISHI, 1987⁵⁸).

Após a nefrectomia nos grupos nos quais não se sucedeu período de conservação renal e, após período de conservação renal a frio, naqueles grupos em que tal procedimento foi necessário, procedeu-se a perfusão do órgão, nas mesmas condições anteriormente descritas (com pressão de aproximadamente 80 mmHg), com solução de *ferrocianeto de sódio a 1%*, durante aproximadamente 3 minutos. Após tal perfusão, o rim foi cortado sagitalmente com lâmina cortante (*bisturi*), e armazenado durante 16-20 horas, no freezer (-20° C), em solução de *cloreto férrico em etanol* (95 ml de álcool absoluto + 50-60 g FeCl₃ + 5 ml HCl). Após este período, o órgão foi lavado em água destilada para se retirar o excesso desta última solução e armazenado em *formol a 10%*. A reação do *ferrocianeto de sódio 1%* com o *cloreto férrico em etanol* resulta em *ferrocianeto férrico* ou *azul da Prússia*, facilmente visualizada devido a sua intensa coloração azulada. Assim, é possível, através de tal propriedade, visualizarmos a distribuição de determinada solução perfusora pelo parênquima renal, observando o padrão de coloração resultante da reação entre o ferrocianeto de sódio e cloreto férrico em etanol.



G. Grupos Experimentais

O presente estudo foi dividido em duas partes: *a. estudo morfológico* e *b. estudo funcional*.

a. Estudo Morfológico

O estudo morfológico constou da análise subjetiva da coloração resultante da Técnica de Hanssen modificada aplicada nos grupo experimentais a saber:

- **Grupo de Perfusão imediata*: a Técnica de Hanssen foi aplicada após a perfusão por gravidade
- **Grupo de Conservação 1 hora*: a Técnica de Hanssen foi aplicada após 1 hora de conservação hipotérmica.
- **Grupo de Conservação 24 horas*: a Técnica de Hanssen foi aplicada após 24 horas de conservação hipotérmica.

As soluções utilizadas foram : Krebs-Henseleit modificada como controle; Collins, Euro-Collins e Universidade de Wisconsin como soluções conservadoras.

Utilizou-se a solução de Krebs-Henseleit modificada como *controle* por esta ser uma solução eletrolítica bastante semelhante ao plasma porém sem apresentar características conservadoras. Assim, esta vem a ser um controle representando uma solução não adequada para a conservação de órgãos.

A representação utilizada para os grupos será:

*** Grupo de Perfusão imediata:**

$KH-CO_i$ - Perfusão com Krebs-Henseleit modificada

Co_i - Perfusão com Collins

EC_i - Perfusão com Euro-Collins

UW_i - Perfusão com solução da Universidade de Wisconsin

*** Grupo de Conservação 1 hora**

$KH-CO_{1h}$ - Perfusão/Conservação com Krebs-Henseleit modificada

Co_{1h} - Perfusão/Conservação com Collins

EC_{1h} - Perfusão/Conservação com Euro-Collins

UW_{1h} - Perfusão/Conservação com solução da Universidade de Wisconsin

*** Grupo de Conservação 24 horas**

$KH-CO_{24h}$ - Perfusão/Conservação com Krebs-Henseleit modificada

Co_{24h} - Perfusão/Conservação com Collins

EC_{24h} - Perfusão/Conservação com Euro-Collins

UW_{24h} - Perfusão/Conservação com solução da Universidade de Wisconsin

b. Estudo Funcional

Os parâmetros *tempo de perfusão*, *volume total perfundido*, *fluxo de perfusão* e *percentagem de rins filtrantes* foram obtidos, nos três grupos acima mencionados, durante a perfusão por gravidade, igualmente realizada em todos os grupos. Assim, para a análise destes parâmetros, levou-se em consideração o total de elementos de todos os grupos analisados.

Procedeu-se a perfusão após 1 e 24 horas de conservação somente nos grupos conservados nos respectivos tempos. Assim, somente nestes grupos foram calculados os fluxos de perfusão após o tempo de preservação.

H. Conservação por 1 e 24 horas

O órgão é colocado, após a sua retirada, em recipiente contendo a solução utilizada na perfusão, e mantido em banho de gelo com temperatura aproximada de 4° C (*Foto 2*).

Após passado o respectivo tempo de conservação, o rim foi reperfundido com a solução utilizada inicialmente, nas mesmas condições de temperatura e pressão da perfusão inicial, anteriormente descrita em detalhes. Procedeu-se, então, a *Técnica de Hanssen modificada* pelo nosso Laboratório, acima descrita.

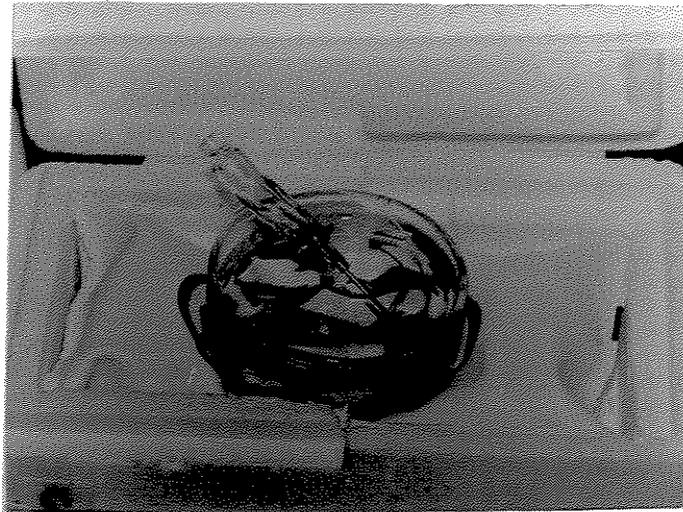


FOTO 2 - Recipiente utilizado para conservação renal. O material é mantido envolto em gelo reciclável, permitindo que a temperatura permaneça em torno de 4° C durante todo o período experimental.

GRUPOS EXPERIMENTAIS*a. Estudo Morfológicos*

<i>Solução/Período</i>	<i>Perfusão Imediata</i>	<i>Conserv. 1 hora</i>	<i>Conserv. 24 horas</i>
<i>Krebs-Henseleit (Controle)</i>	KH-CO _i n=6	KH-CO _{1h} n=6	KH-CO _{24h} n=6
<i>Collins</i>	Co _i n=6	Co _{1h} n=6	Co _{24h} n=6
<i>Euro-Collins</i>	EC _i n=6	EC _{1h} n=6	EC _{24h} n=6
<i>Univ. Wisconsin</i>	UW _i n=6	UW _{1h} n=6	UW _{24h} n=6

b. Estudo Funcional

Para os parâmetros *Tempo de perfusão*, *Volume total perfundido*, *Fluxo de perfusão imediata* e *Porcentagem de rins filtrantes*, utilizou-se para as soluções de *Krebs-Henseleit*, *Collins*, *Euro-Collins* e *Universidade de Wisconsin*, número de experimentos (*n*) igual a 15, 20, 17 e 25, respectivamente. Para os Parâmetros *Fluxo de Perfusão após 1 e 24 horas* de conservação, utilizou-se *n=6* para cada uma das soluções.

SOLUÇÕES DE PERFUSÃO

Foram utilizadas as seguintes soluções para perfusão por gravidade:

SOLUÇÃO DE KREBS-HENSELEIT MODIFICADA (CONTROLE)(KH-CO)

Acetato de Na ⁺⁺	10 mM
Glicose	8 mM
NaCl	105 mM
NaHCO ₃	25 mM
KCl	5 mM
CaCl ₂	1,8 mM
MgSO ₄	1,0 mM
NaH ₂ PO ₄	2,3 mM
KH ₂ PO ₄	0,6 mM
<i>pH</i>	7,0 - 7,4
<i>Osmolalidade</i>	280 mOsm/kg H ₂ O

SOLUÇÃO DE COLLINS (Co) E EURO-COLLINS (EC)*(DREIKORN et al., 1980³⁴; RIJKMANS et al., 1982⁷⁵; FIGUEIREDO et al., 1986³⁶)*

	<i>COLLINS</i>	<i>EURO-COLLINS</i>
NaHCO ₃	10 mM	10 mM
KCl	15 mM	15 mM
KH ₂ PO ₄	15 mM	15 mM
KH ₂ PO ₄	42 mM	42 mM
Glicose	139 mM	139 mM
MgSO ₄	28 mM	-----
<i>pH</i>	7,0	7,0
<i>Osmolalidade</i>	317 mOsm/kg H ₂ O	300 mOsm/kg H ₂ O

SOLUÇÃO DA UNIVERSIDADE DE WISCONSIN (UW)*(Du Pont - USA) (BELZER et al., 1988)*

Hidróxido de amido	50 g/l
Lactobionato de K ⁺	100 mM
KH ₂ PO ₄	25 mM
MgSO ₄	5 mM
Adenosina	5 mM
Alopurinol	1 mM
Glutathiona total	3 mM
Rafinose	30 mM
<i>pH</i>	7,4
<i>Osmolalidade</i>	320 mOsm/kg H ₂ O

Obs: Não foram utilizados aditivos nas soluções conservadoras.**Concentração final:** Na⁺⁺ 30 ± 5 mM; K⁺ 120 ± 5 mM**Osmolalidade/litro:** 320 ± 5

ANÁLISE MORFOLÓGICA

A avaliação morfológica foi feita pela observação da distribuição do *ferrocianeto férrico* pelo parênquima renal, nos diferentes grupos experimentais. Tais observações foram realizadas em Lupa (Zeiss, Alemanha Ocidental) e o registro feito por processo fotográfico não convencional, com *iluminação halogênica fluorescente*.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram apresentados como média e desvio padrão da média.

A análise estatística empregada para comparação intergrupos foi a de *Variância corrigida por Bonferroni* com nível de significância $p < 0,016$ (GODFREY, 1986³⁷).

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

RESULTADOS

RESULTADOS

A proposta deste trabalho foi a avaliação da distribuição das soluções conservadoras utilizadas atualmente no transplante clínico, pelo parênquima renal, após a perfusão destas soluções a 10° C e 80 mmHg e conservação por 0, 1 e 24 horas. Esta avaliação foi feita através da *Técnica de Hanssen modificada*, conforme descrita anteriormente.

A. Análise Morfológica

O material devidamente fixado em *formol 10%* foi cuidadosamente fotografado sob Lupa com *iluminação halogênica fluorescente* a fim de serem documentados.

1. Grupo 1.A - Perfusão com solução de Krebs-Henseleit modificado (KH-CO₂) sem conservação posterior

A solução de *Krebs-Henseleit modificada* (n=6) não é uma solução conservadora, pois não possui as características que propiciem a preservação do órgão perfundido com a mesma. Os rins perfundidos com esta solução apresentaram seu parênquima corado *heterogêneamente*, com áreas corticais coradas e região medular não corada (*Foto 3A*).

2. Grupo 1.B e 1.C - Perfusão com solução de Collins (Co) e Euro-Collins (EC) sem conservação posterior

A perfusão renal com as soluções de *Collins* e *Euro-Collins* resultou num padrão **homogêneo** de distribuição, porém o último grupo apresentou-se mais corado que o primeiro. (*Foto 3B e 3C*).

3. Grupo 1.D - Perfusão com solução da Universidade de Wisconsin (UW) sem conservação posterior

Quando se compara o padrão de coloração resultante da aplicação da Técnica de Hanssen modificada, no grupo perfundido com a solução da *Universidade de Wisconsin*, é nítida a diferença entre este grupo e os demais já analisados. O parênquima renal, neste grupo, mostra-se corado **homogeneamente**, além desta coloração ser bem mais intensa que os demais grupos observados. (*Foto 3D*).

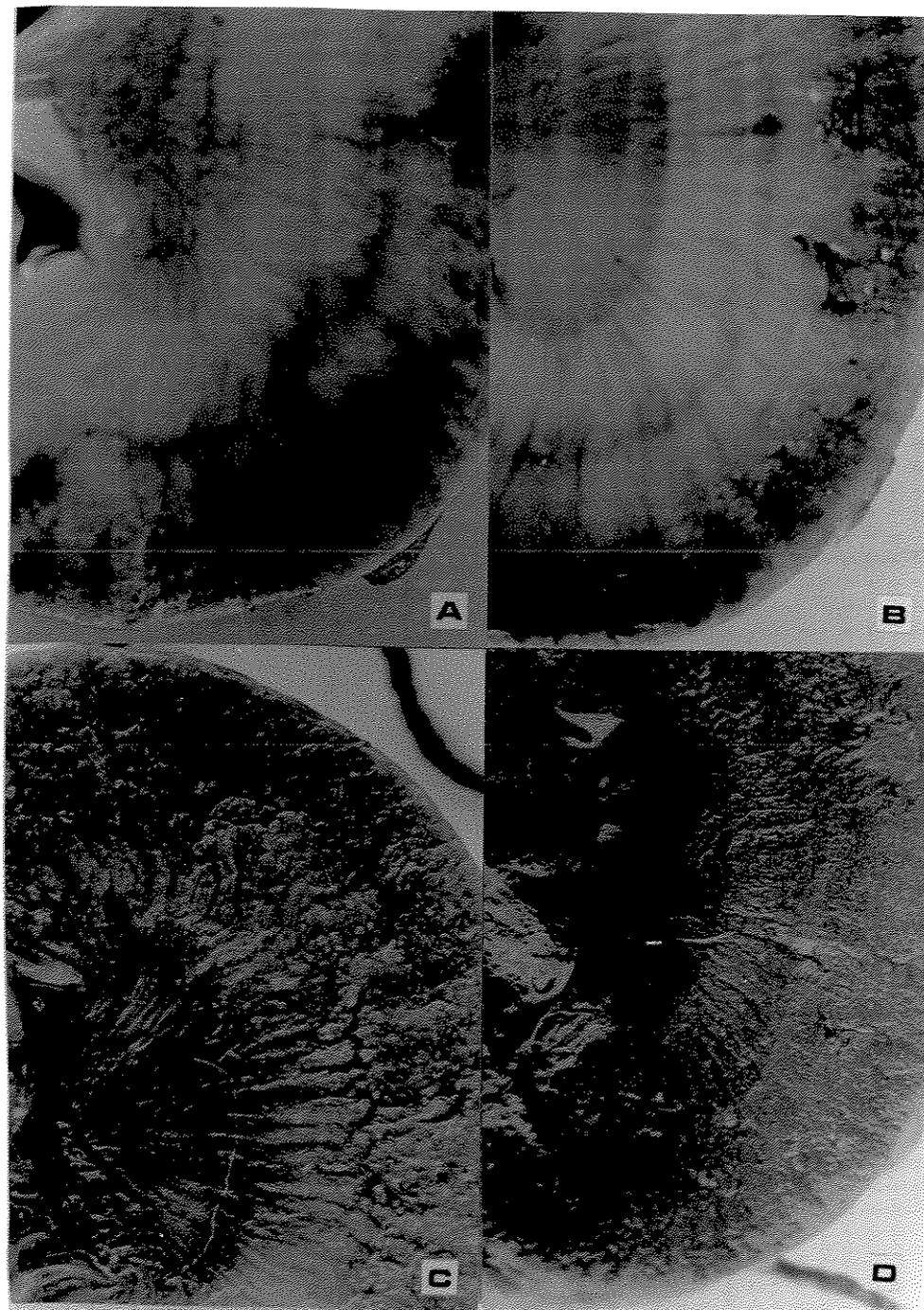


FOTO 3 - Parênquima renal corado após rápida perfusão com as soluções estudadas: **A.** Coloração *heterogênea* após perfusão com solução de *Krebs-Henseleit modificado* (n=6); **B. e C.** Coloração *homogênea* após perfusão com as soluções de *Collins* (n=6) e *Euro-Collins* (n=6) respectivamente; **D.** Coloração *homogênea e intensa* após perfusão com a solução da *Universidade de Wisconsin* (n=6). (Aumento de 8x - Fotografia feita sob *Lupa Zeiss*, Alemanha Ocidental)

4. Grupo 2.A - Preservação por 1 hora na Solução de Krebs-Henseleit modificada (KH-CO₁₁) após perfusão utilizando-se esta mesma solução

Assim como o observado nos rins do **Grupo KH-CO₂ (CONTROLE)** - quando esta mesma solução foi utilizada na perfusão por gravidade -, onde a coloração mostra uma distribuição *heterogênea* pelo parênquima renal,- os rins (n=6), perfundidos e conservados com esta mesma solução por um período de *1 hora* em banho de gelo (4° C), também se apresentaram corados de forma *heterogênea*, permanecendo a medula não corada e a camada cortical corada (**Foto 4A**).

5. Grupo 2.B - Preservação por 1 hora na Solução de Collins (Co₁₁) após perfusão utilizando-se esta mesma solução

O parênquima renal daqueles rins (n=6) perfundidos e conservados por *1 hora* na solução de **Collins**, a 4° C em banho de gelo, apresentou-se corado de maneira *heterogênea*, morfológicamente semelhantes àqueles rins perfundidos e preservados em *Krebs-Henseleit modificada*. Neste grupo, os rins tiveram seu córtex corado enquanto a região medular do mesmo não se apresentou corada (**Foto 4B**).

6. Grupo 2.C - Preservação por 1 hora na Solução de Euro-Collins (EC_{1h}) após perfusão utilizando-se esta mesma solução

O padrão de coloração do parênquima renal deste grupo (n=6), após perfusão renal com a respectiva solução conservadora e conservação por 1 hora na mesma (4° C em banho de gelo), foi **homogêneo** comparando-se aos rins do grupo CONTROLE (**Grupos KH-CO₂ e KH-CO_{1h}**). Observa-se, na região medular, porções isoladas do parênquima que não foram coradas (**Foto 4C**).

7. Grupo 2.D - Preservação por 1 hora na Solução da Universidade de Wisconsin (UW_{1h}) após perfusão utilizando-se esta mesma solução

A utilização da solução da *Universidade de Wisconsin* para a perfusão e conservação renal (n=6) por um período de 1 hora resultou num padrão de distribuição de coloração **homogêneo extremamente corado**, por toda a extensão do parênquima renal, quando comparado aos demais grupos estudados (**Foto 4D**).

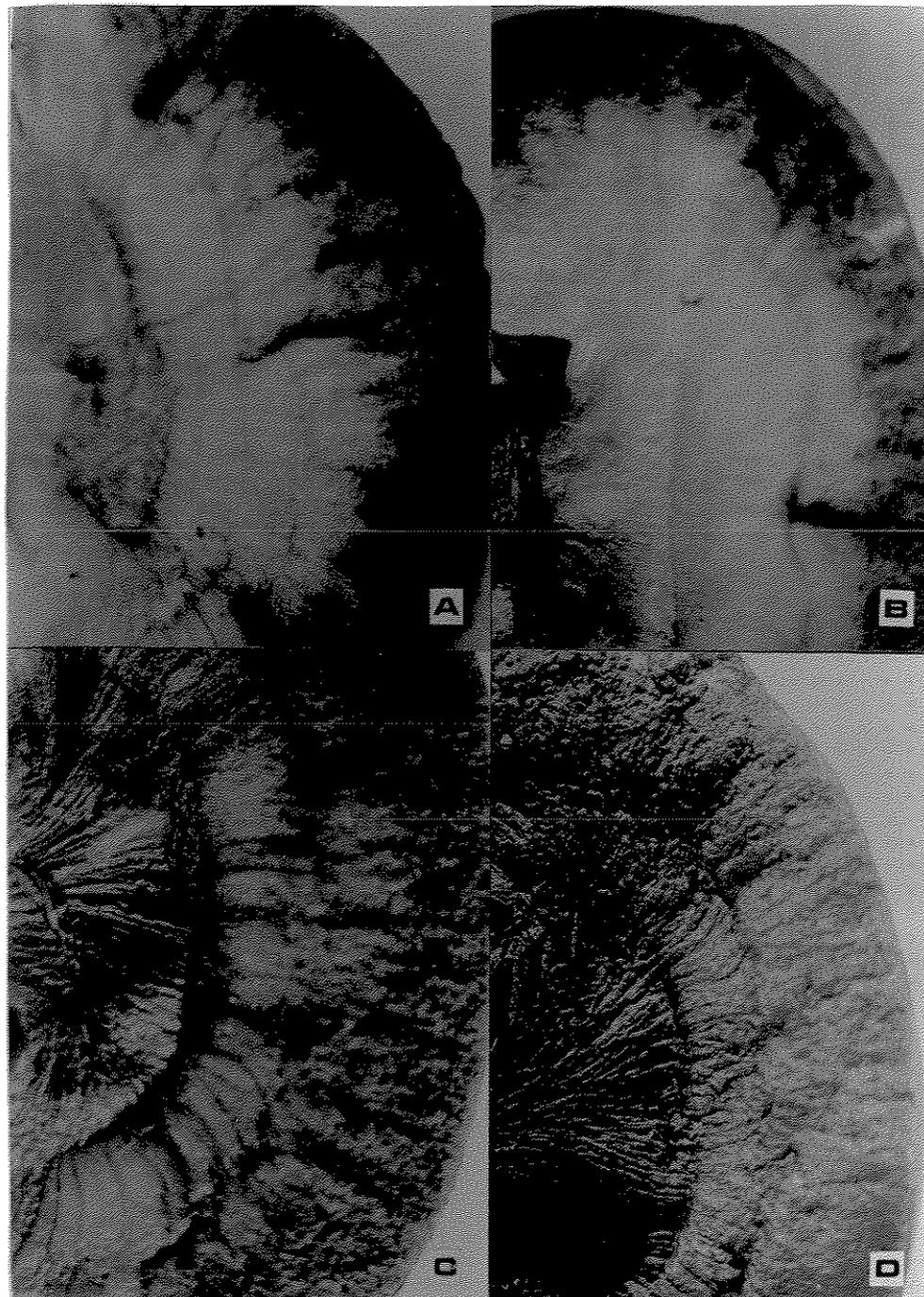


FOTO 4 - Parênquima renal corado após perfusão e conservação por 1 hora com as soluções estudadas: **A.** Coloração *heterogênea* após perfusão e conservação com solução de *Krebs Henseleit modificado* (n=6); **B.** Coloração *heterogênea* após perfusão e conservação com a solução de *Collins* (n=6); **C.** Coloração *homogênea* após perfusão e conservação com a solução de *Euro-Collins* (n=6); **D.** Coloração *homogênea e intensa* após perfusão e conservação com a solução da *Universidade de Wisconsin* (n=6). (Aumento de 8x - Fotografia feita sob *Lupa Zeiss*, Alemanha Ocidental).

8. **Grupo 3.A** - *Preservação por 24 horas na Solução de Krebs-Henseleit modificada (KH-CO_{24h}) após perfusão utilizando-se esta mesma solução*

O padrão *heterogêneo* de distribuição do ferrocianeto férrico neste grupo (n=6) foi o mesmo observado naqueles grupos onde utilizamos a solução de *Krebs-Henseleit modificada* como solução de perfusão e/ou conservação por *1 hora (Foto 5A)*.

9. **Grupo 3.B** - *Preservação por 24 horas na Solução de Collins (Co_{24h}) após perfusão utilizando-se esta mesma solução*

Após perfusão e conservação por *24 horas* na solução de *Collins* (n=6), a distribuição de coloração pelo parênquima renal foi *homogênea* quando comparada aos grupos anteriores onde esta solução foi utilizada, porém apresentando regiões não coradas e, provavelmente, não perfundidas e conservadas (*Foto 5B*).

10. Grupo 3.C - Preservação por 24 horas na Solução de Euro-Collins (EC_{24h}) após perfusão utilizando-se esta mesma solução

O padrão de coloração *heterogêneo* observado no grupo controle (KH-CO_{24h}) foi o mesmo obtido no grupo perfundido e conservado por 24 horas na solução de Euro-Collins (n=6) (Foto 5C).

11. Grupo 3.D - Preservação por 24 horas na Solução da Universidade de Wisconsin (UW_{24h}) após perfusão utilizando-se esta mesma solução

Como já foi observado nos demais grupos onde se utilizou a solução da Universidade de Wisconsin na perfusão e/ou conservação, os rins perfundidos e conservados por 24 horas (n=6) com a mesma apresentaram o parênquima *extremamente e homogeneamente corado* (Foto 5D).

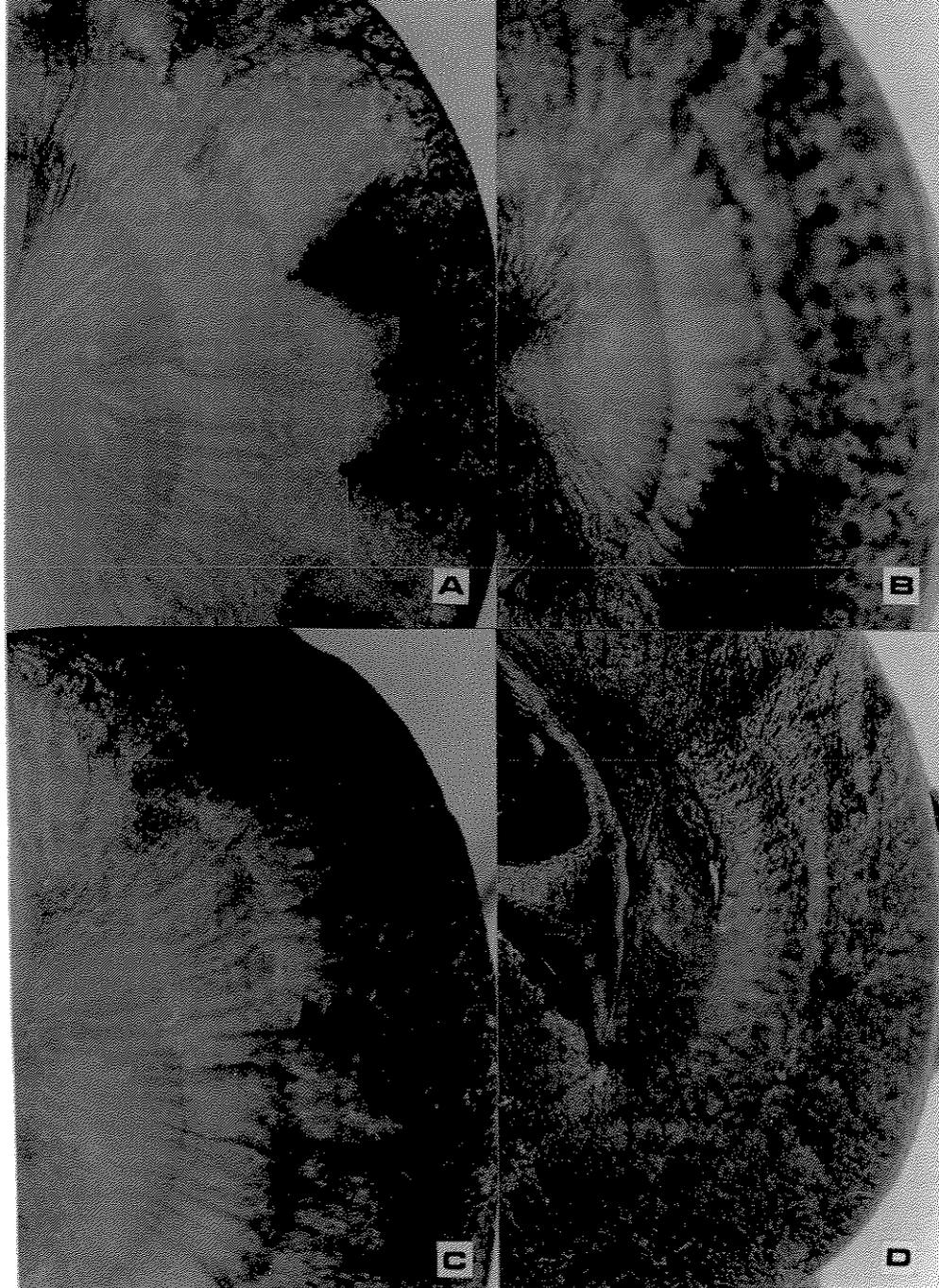


FOTO 5 - Parênquima renal corado após perfusão e conservação por 24 horas com as soluções estudadas: *A.* Coloração *heterogênea* após perfusão e conservação com solução de *Krebs-Henseleit modificado* (n=6) ; *B.* Coloração *homogênea* após perfusão e conservação com a solução de *Collins* (n=6); *C.* Coloração *heterogênea* após perfusão e conservação com a solução de *Euro-Collins* (n=6); *D.* Coloração *homogênea e intensa* após perfusão e conservação com a solução da *Universidade de Wisconsin* (n=6). (Aumento de 8x - Fotografia feita sob *Lupa Zeiss*, Alemanha Ocidental).

B. Parâmetros funcionais

Na *Tabela 1* estão representados a média e desvio padrão da média dos demais parâmetros analisados neste estudo (*Tempo de Perfusão, Volume total perfundido, fluxo de perfusão, % rins filtrantes, e fluxo de perfusão após 1 e 24 horas de conservação*) dos Grupos **KH-CO, Co, EC e UW**. Os grupos experimentais foram comparados ao controle, procedendo-se a análise estatística pelo teste *t de Student não pareado*, e os grupos experimentais (**Co, EC, UW**) comparados entre si através da *análise de variância (ANOVA) corrigida por Bonferroni*. Vale ressaltar que para a análise dos parâmetros funcionais levou-se em consideração os elementos de todos os grupos, com exceção do parâmetro *Fluxo de Perfusão 1 e 24 horas* em que somente os elementos destes grupos foram considerados, pois o procedimento técnico de perfusão por gravidade inicial utilizada na lavagem do órgão é igual em todos os grupos.

a. Tempo de perfusão, Volume total perfundido e Fluxo de perfusão

O tempo de perfusão renal a 10° C e 80 mmHg, nos grupos **Co e UW** ($27,5 \pm 9,4$ e $34,3 \pm 14,1$ min respectivamente) foi igual ao grupo **KH-CO** ($27,5 \pm 13,2$ min), enquanto este mesmo parâmetro analisado no grupo **EC** é estatisticamente diferente do controle

($47,9 \pm 12,4$ min)(**Figura 2**). Proferindo-se a *análise de variância (ANOVA) corrigida por Bonferroni*, entre os grupos **Co**, **EC** e **UW**, temos que os três grupos foram diferentes entre si, sendo **EC** diferente de **UW** e **Co**, e estes dois últimos grupos iguais entre si (**Figura 3 e Tabela 2**).

TABELA 1 - Média \pm desvio padrão da média dos parâmetros obtidos na perfusão renal a 10^0 C e 80 mmHg com a solução de **Krebs-Henseleit (KH-CO)** (**CONTROLE**) e as soluções de **Collins (Co)**, **Euro-Collins (EC)** e **Universidade de Wisconsin (UW)** (**CONSERVADORAS**).

Parâmetro/ Solução	Krebs- Henseleit (KH-CO)	Collins (Co)	Euro-Collins (EC)	Universidade de Wisconsin (UW)
Tempo de Perfusão (min)	$27,5 \pm 13,2$ <i>n</i> =15	$27,5 \pm 9,4$ <i>n</i> =20	$47,9 \pm 12,3$ <i>n</i> =17 *	$34,3 \pm 14,1$ <i>n</i> =25
Volume total perfundido (ml)	$30,8 \pm 12,6$ <i>n</i> =15	$23,5 \pm 9,4$ <i>n</i> =20	$22,4 \pm 14,4$ <i>n</i> =17	$56,0 \pm 18,4$ <i>n</i> =25 *
Fluxo de Perfusão (ml/min)	$1,4 \pm 0,9$ <i>n</i> =15	$0,8 \pm 0,4$ <i>n</i> =20 *	$0,6 \pm 0,5$ <i>n</i> =17 *	$1,8 \pm 0,7$ <i>n</i> =25
% Rins filtrantes	56,2 % <i>n</i> =9/16	61,9 % <i>n</i> =13/21	40,9 % <i>n</i> =9/22	8 % <i>n</i> =2/25
Fluxo de perfusão - 1 hora (ml/min)	$0,9 \pm 0,9$ <i>n</i> =6	$1,5 \pm 1,1$ <i>n</i> =6	$3,1 \pm 2,7$ <i>n</i> =6	$4,3 \pm 1,8$ * <i>n</i> =6
Fluxo de perfusão - 24 horas (ml/min)	$1,5 \pm 1,5$ <i>n</i> =6	$1,7 \pm 1,0$ <i>n</i> =6	$3,8 \pm 1,1$ * <i>n</i> =6	$2,8 \pm 0,3$ <i>n</i> =6

* *Teste t não pareado (p<0.05): CONTROLE X demais grupos experimentais*

TABELA 2 : Média \pm desvio padrão dos parâmetros obtidos na perfusão renal a 10⁰ C e 80 mmHg com as soluções de *Collins (Co)*, *Euro-Collins (EC)* e *Universidade de Wisconsin (UW)* (CONTROLE)..

<i>Parâmetro/ Solução</i>	<i>Collins (Co)</i>	<i>Euro-Collins (EC)</i>	<i>Universidade de Wisconsin (UW)</i>
Tempo de Perfusão (min)	27,5 \pm 9,4 n=20	47,9 \pm 12,3 n=17	34,3 \pm 14,1 n=25
Volume Total perfundido (ml)	23,5 \pm 9,4 n=21	22,4 \pm 14,4 n=17	56,0 \pm 18,4 n=25
Fluxo de Perfusão (ml/min)	0,8 \pm 0,4 n=20	0,6 \pm 0,5 n=17	1,8 \pm 0,7 n=25

* *Análise de Variância (ANOVA) corrigida por Bonferroni (p<0.016):*

a. Co x EC e UW (p<0.016)
b. EC x UW (p<0.016)

Analisando-se o *volume total de solução perfundida*, o grupo *KH-CO* (30,8 \pm 12,6 ml), chamado de *controle*, foi estatisticamente diferente do grupo *UW* (56,0 \pm 18,4 ml), permanecendo iguais ao controle os grupos *Co* (23,5 \pm 9,4 ml) e *EC* (22,4 \pm 14,4 ml)(*Figura 4*). Comparando-se os grupos experimentais, pela *análise de variância (ANOVA) corrigida por Bonferroni* (p<0,016), estes grupos foram diferentes entre si ficando *UW* diferente de *Co* e *EC* (*Figura 5 e Tabela 2*).

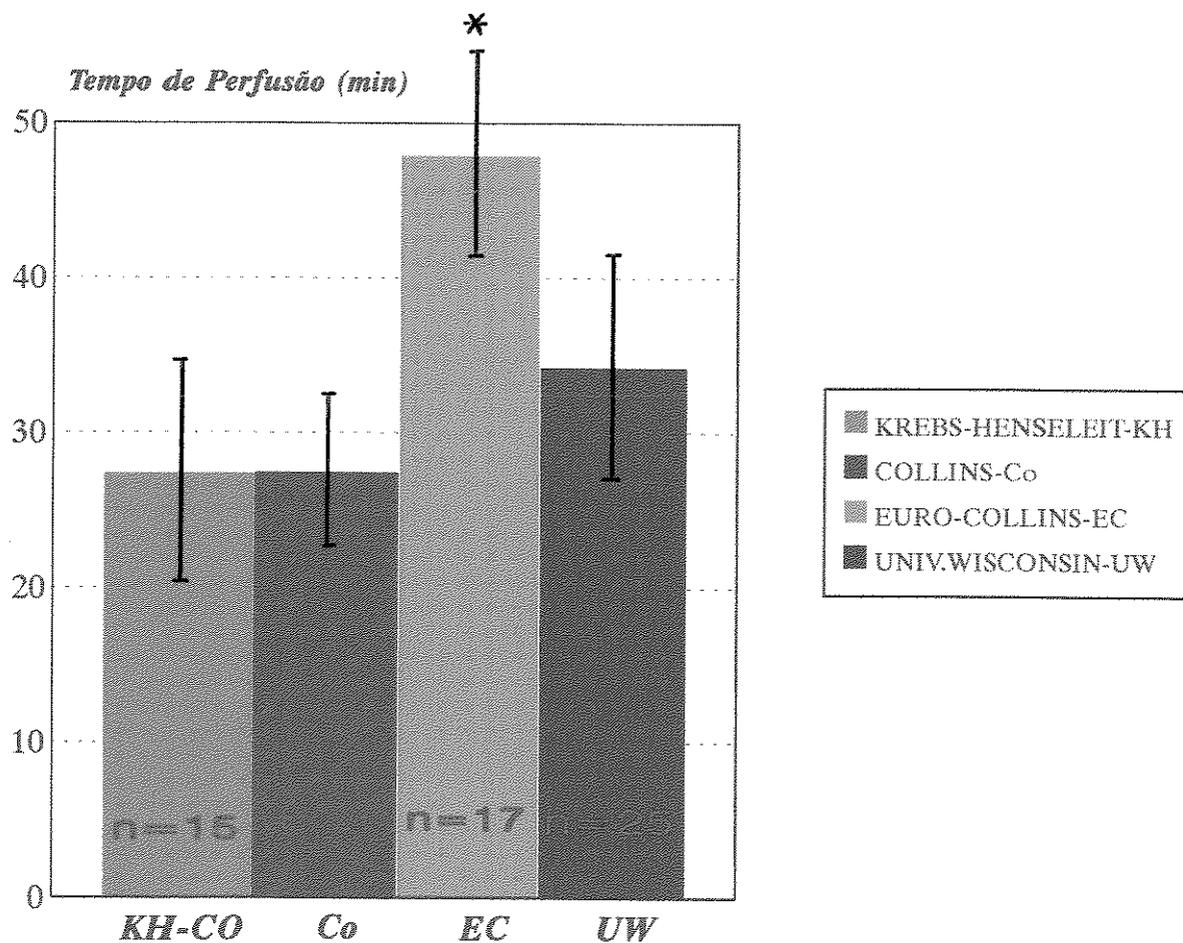


FIGURA 2 - Valores médios do tempo, em minutos (min), durante a perfusão renal por gravidade, a 10⁰ C e 80 mmHg nos seguintes grupos: *Controle* (Krebs-Henseleit - KH-CO), *Collins* (Co), *Euro-Collins* (EC) e *Universidade de Wisconsin* (UW).

***Teste t de Student não pareado (p < 0,05): CONTROLE x demais grupos experimentais**

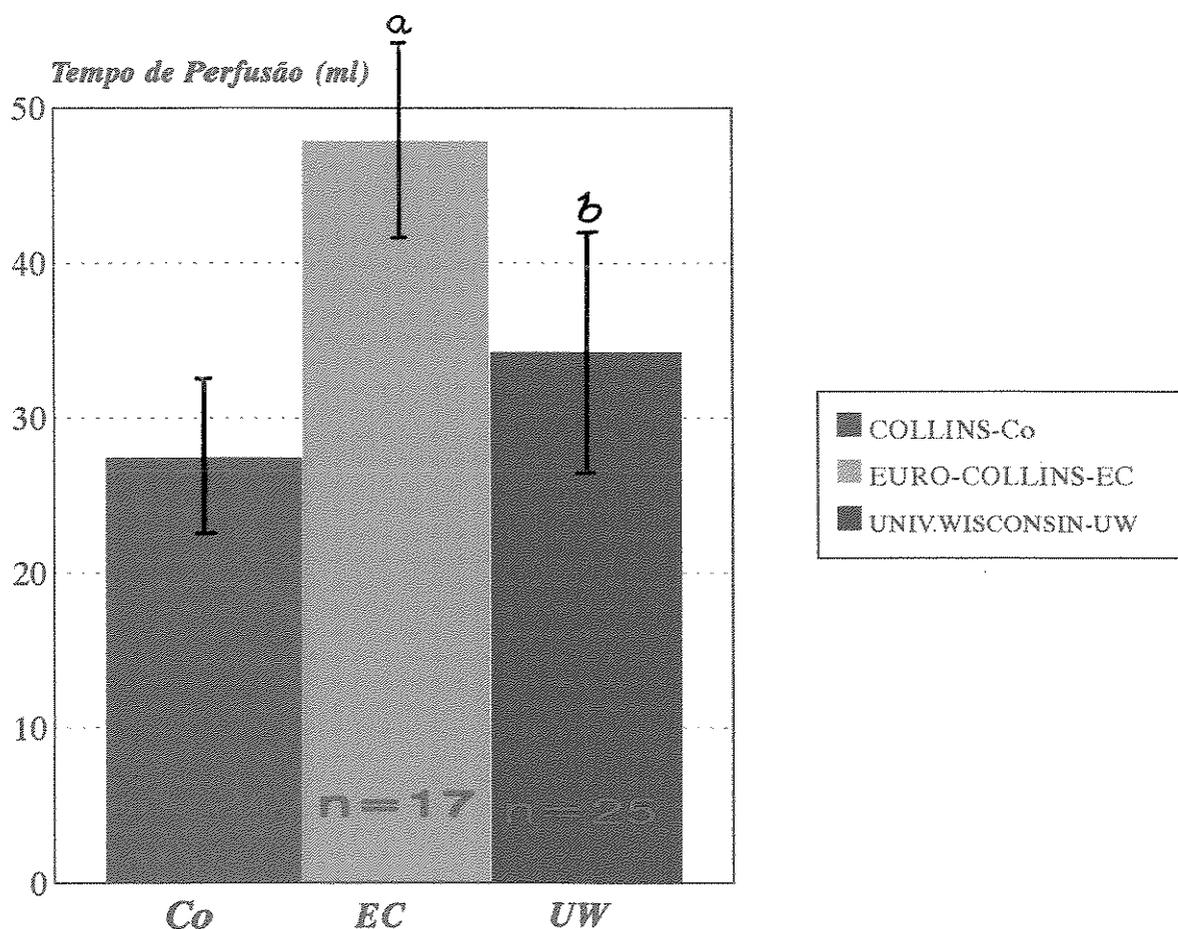


FIGURA 3 - Valores médios do tempo, em minutos (min), durante a perfusão renal por gravidade, a 10^o C e 80 mmHg nos seguintes grupos: *Collins* (Co), *Euro-Collins* (EC) e *Universidade de Wisconsin* (UW), a 10^o C e 80 mmHg.

*Análise de Variância (ANOVA) corrigida por Bonferroni ($p < 0,016$):

a. Co x EC e UW ($p < 0,016$)

b. EC x UW ($p < 0,016$)

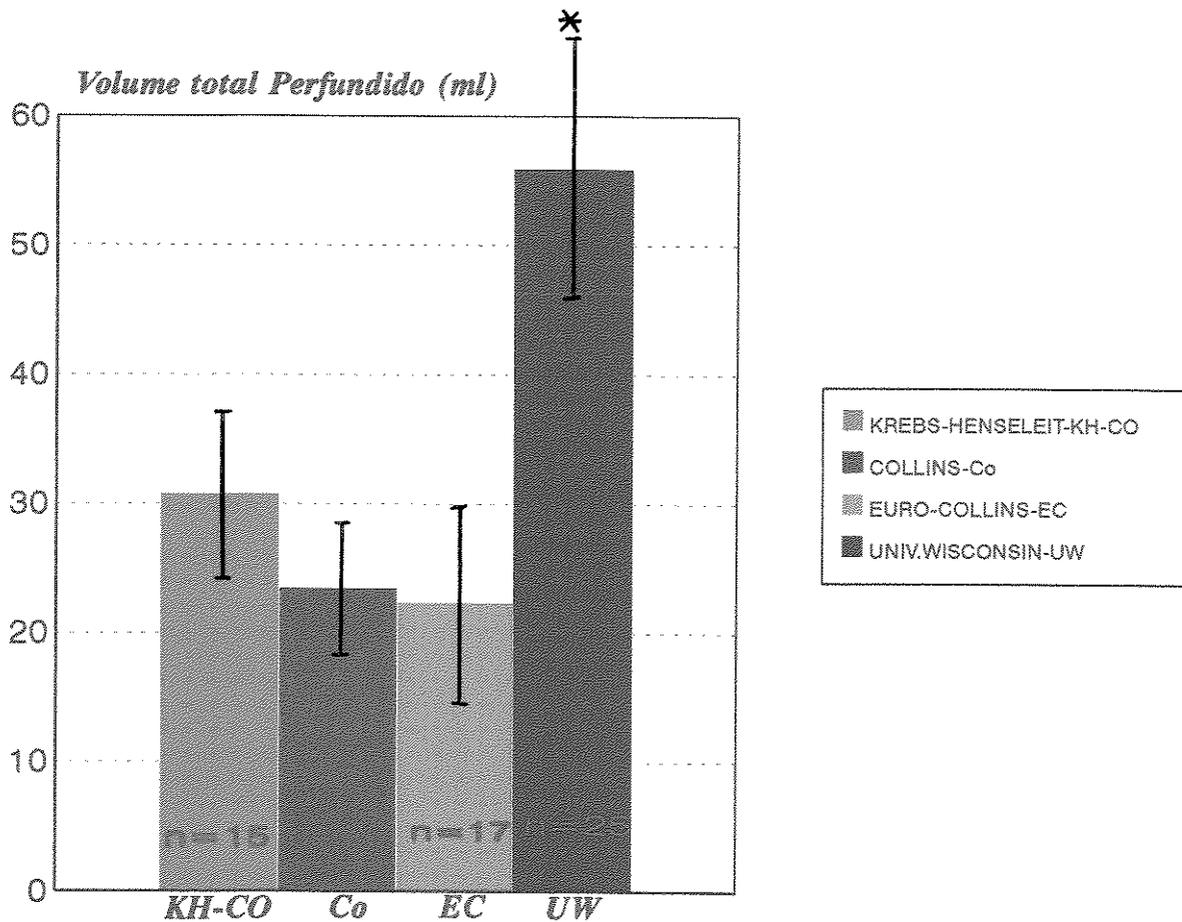


FIGURA 4 - Média do Volume total perfundido, em mililitros (ml), a 10⁰ C e 80 mmHg das soluções: *Controle-Krebs-Henseleit (KH-CO)*; *Collins (Co)*; *Euro-Collins (EC)* e *Universidade de Wisconsin (UW)*.

* *Teste t de Student não pareado (p<0,05): CONTROLE x demais grupos experimentais.*

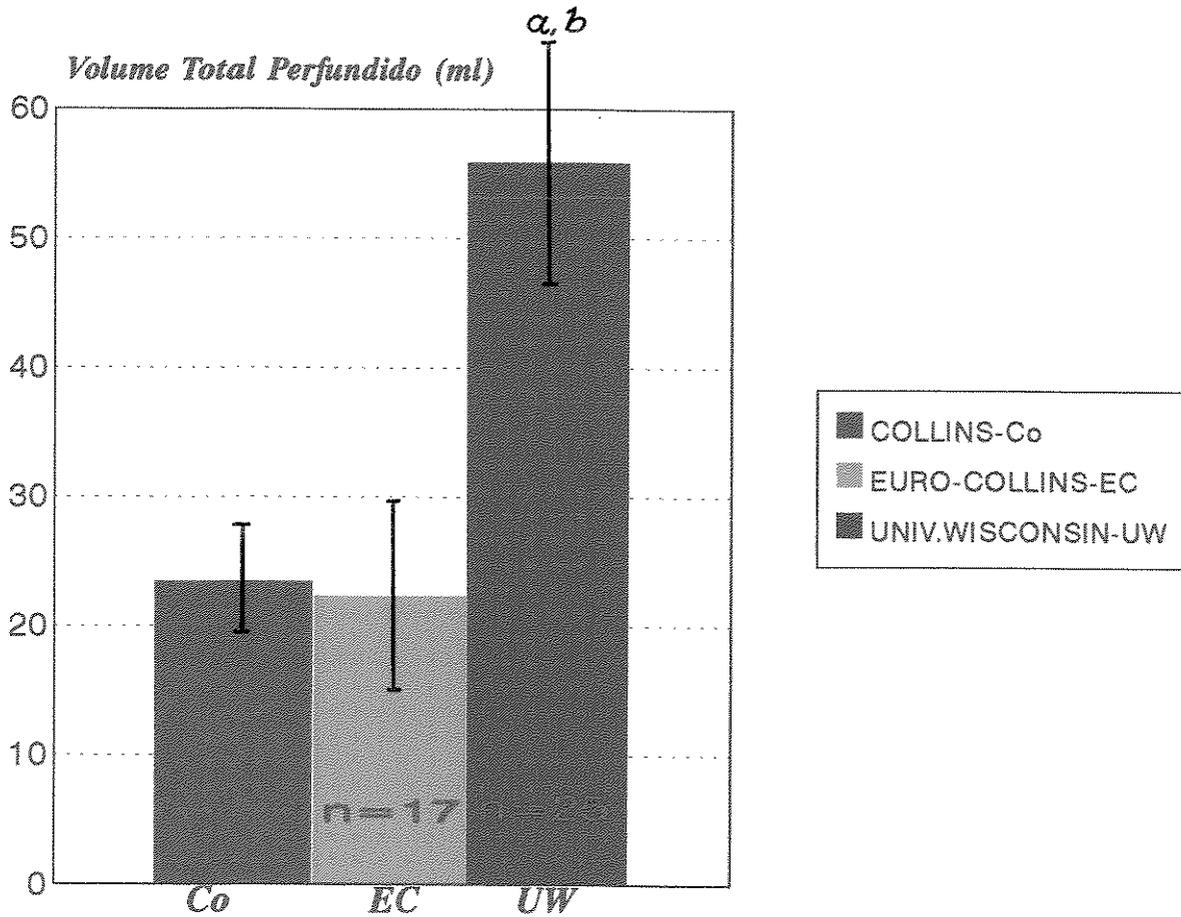


FIGURA 5 - Média do volume total perfundido, em mililitros (ml), a 10^o C e 80 mmHg das soluções: *Collins (Co)*, *Euro-Collins (EC)* e *Universidade de Wisconsin (UW)*.

* *Análise de Variância (ANOVA) corrigida por Bonferroni (p<0,016):*

a. Co x EC e UW (p<0,016)

b. EC x UW (p<0,016)

A Análise do *fluxo de perfusão*, o qual leva em consideração o volume total perfundido pelo tempo da perfusão (ml/min), nos mostra que as soluções de **Co** ($0,8 \pm 0,4$ ml/min) e **EC** ($0,6 \pm 0,5$ ml/min) foram diferentes do grupo **KH-CO** ($1,4 \pm 0,9$ ml/min), mantendo-se igual ao controle o grupo de **UW** ($1,8 \pm 0,7$ ml/min)(**Figura 6**). Este parâmetro foi diferente quando analisamos a variância do mesmo, corrigido por *Bonferroni* ($p < 0,016$), entre os grupo de **Co**, **EC** e **UW**, sendo **UW** diferente de **Co** e **EC**. Por outro lado, procedendo-se esta mesma análise de variância corrigida por *Bonferroni*, **Co** e **EC** foram iguais (**Figura 7 e Tabela 2**).

b. Análise da Percentagem de rins filtrantes,

No grupo **KH-CO** (n=16), 56,2% dos rins produziram filtrado, enquanto no grupo de **Co** (n=21), **EC** (n=22) e **UW** (n=25) os valores percentuais de tal ocorrência foram de 61,9%, 40,9% e 8%, respectivamente (**Figura 8 e Tabela 1**).

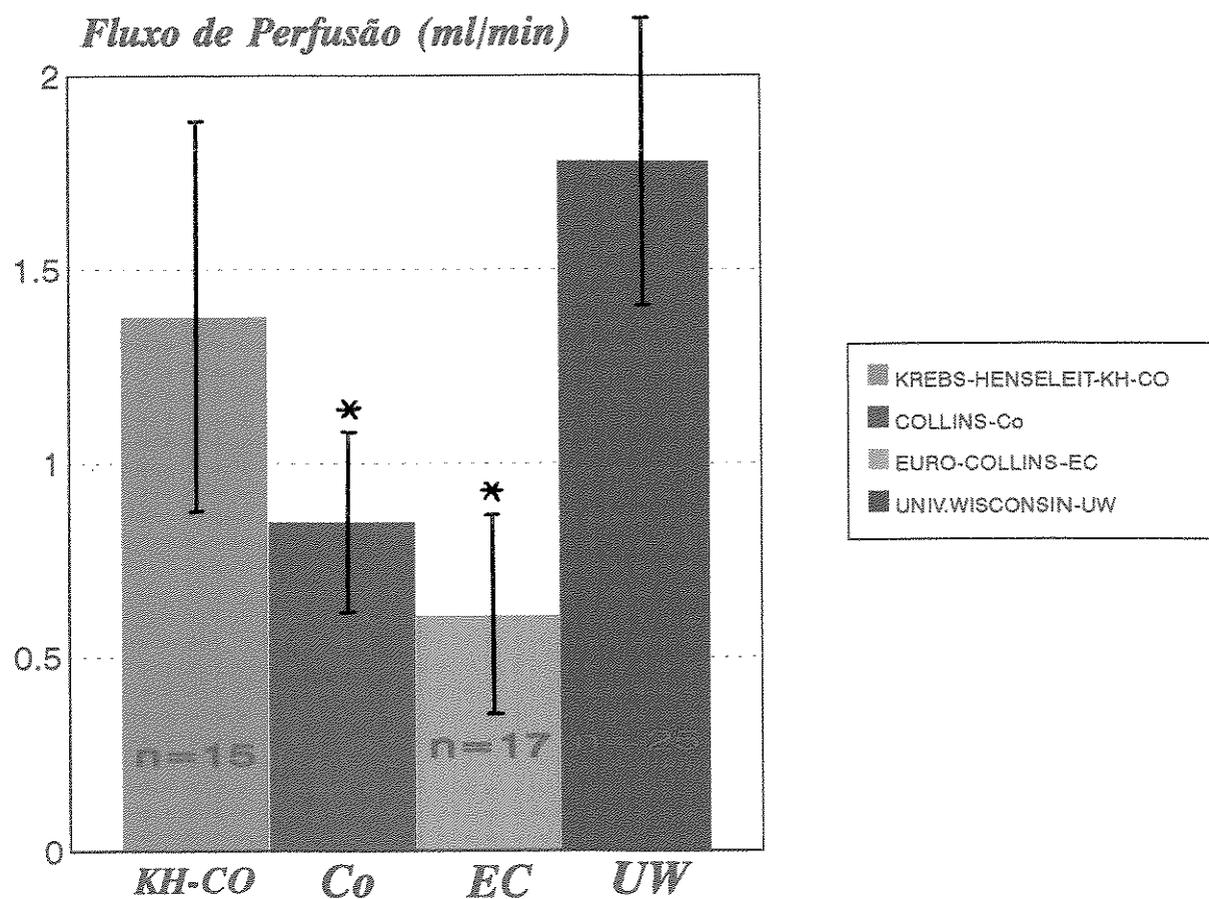


FIGURA 6 - Fluxo imediato de Perfusão renal, em mililitros/minuto, utilizando-se as soluções de Krebs-Henseleit (KH-CO), Collins (Co), Euro-Collins (EC) e Universidade de Wisconsin (UW), perfundidas a 10⁰ C e 80 mmHg.

* Teste t de Student não pareado ($p < 0,05$): CONTROLE x demais grupos experimentais:

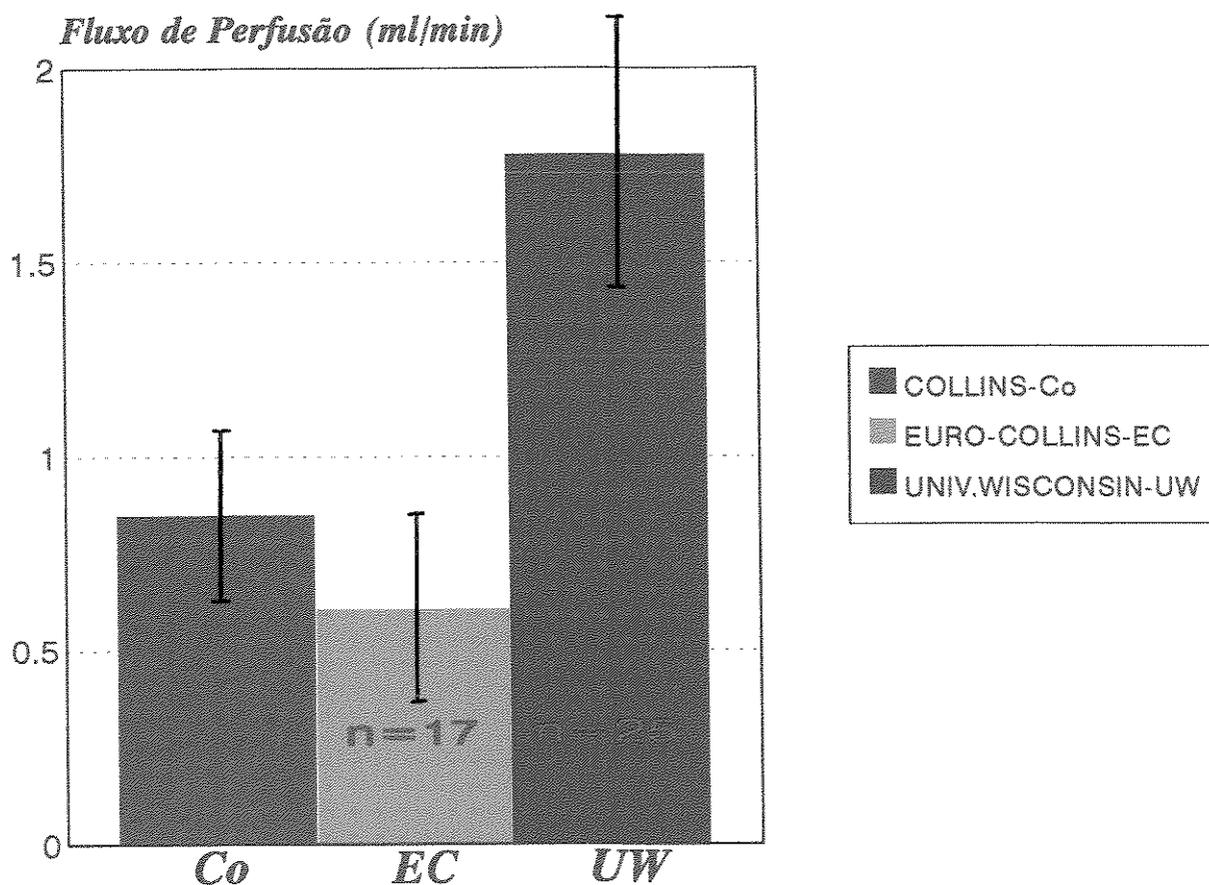


FIGURA 7 - Fluxo imediato de Perfusão renal, em mililitros/minuto, utilizando-se as soluções de Collins (Co), Euro-Collins (EC) e Universidade de Wisconsin (UW), perfundidas a 10^o C e 80 mmHg.

* *Análise de Variância (ANOVA) corrigida por Bonferroni (p<0,016):*

a. Co x EC x UW (p<0,016)

b. EC x UW (p<0,016)

c. Co x UW (p<0,016)

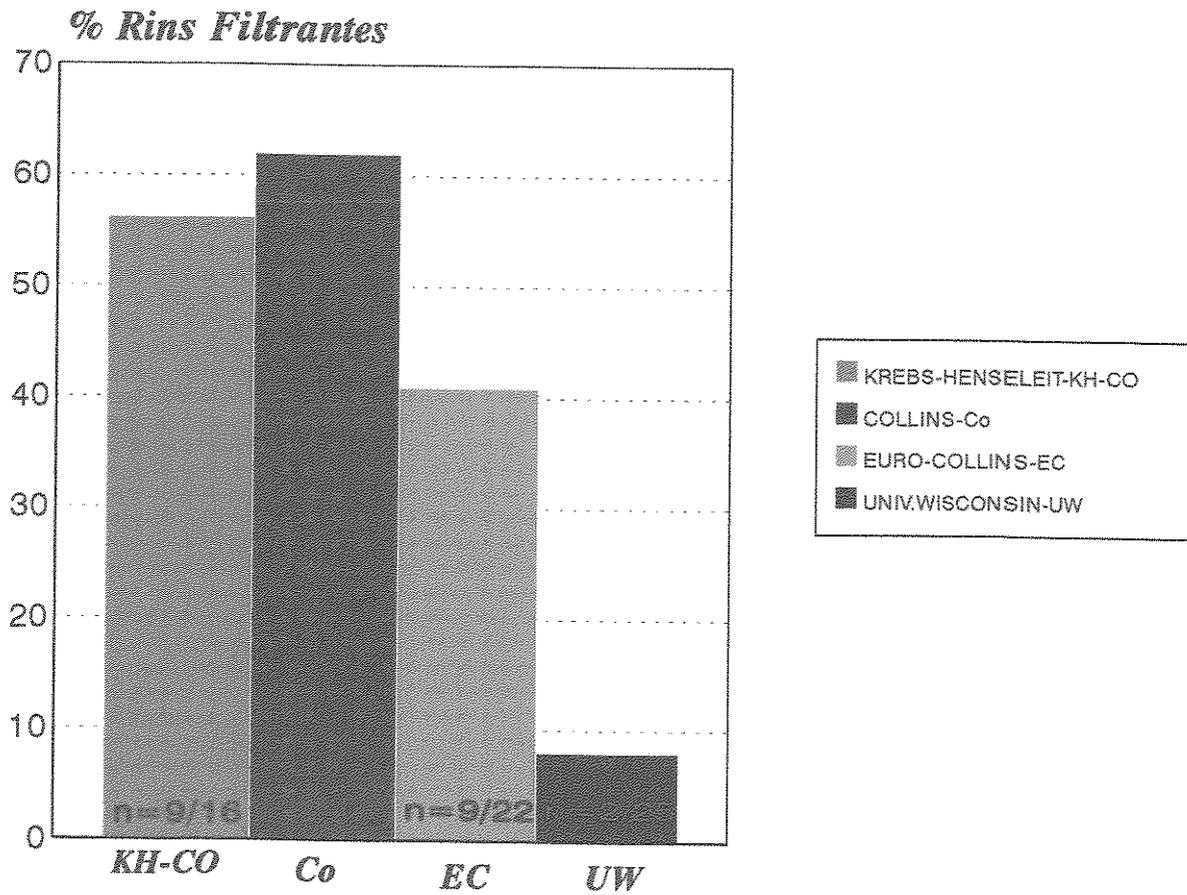


FIGURA 8 - Percentagem de rins que apresentaram filtrado, detectado pela técnica, durante a perfusão renal com as soluções de *Krebs-Henseleit (KH-CO)*, *Collins (Co)*, *Euro-Collins (EC)* e *Universidade de Wisconsin (UW)*.

c. Fluxo de perfusão após 1 e 24 horas de conservação

O termo *fluxo de perfusão 1 e 24 horas* é utilizado aqui como o volume de solução perfundida por minuto após o período de conservação, nos grupos onde este período perdurou durante *1 e 24 horas*.

Após *1 hora* de conservação a 4^o C, em banho de gelo, o *fluxo de perfusão* com a solução de *UW* (4,3+1,8 ml/min) foi diferente do obtido no grupo controle - *KH-CO* (0,9+0,9 ml/min) - enquanto os demais grupo - *Co e EC* - foram iguais ao controle (1,5+1,1 e 3,1+2,7 ml/min respectivamente)(*Figura 9*). Pela análise de variância corrigida por Bonferroni, os grupo perfundidos e conservados por 1 hora em *Co* e *UW* foram diferentes enquanto não houve diferença entre *EC* e as demais soluções conservadoras.

Após conservação a frio por 24 horas, o grupo perfundido com a solução de *EC* (3,8+1,1 ml/min) teve seu fluxo diferente daquele observado no grupo controle - *KH-CO* (1,5+1,5 ml/min) - enquanto o fluxo de perfusão nos grupo de *Co e UW* (1,7+1,0 e 2,8+0,3 ml/min respectivamente) foram iguais ao controle e, portanto, diferentes de *EC*. As três soluções conservadoras tiveram fluxo de perfusão diferentes entre si quando se procedeu a análise de variância corrigida por Bonferroni, sendo também diferentes as soluções de *Co e EC* (*Tabela 1 e Figura 10*).

Procedendo-se a análise comparativa entre os *fluxos de perfusão imediata e perfusão 1 e 24 horas* dentro de cada grupo temos que os fluxos de perfusão e reperfusão nos diversos períodos acima mencionados foram estatisticamente iguais entre si quando da análise dos grupos perfundidos com *KH-CO e Co*. Nos grupos de *EC e UW* houve diferença estatística entre o fluxo nos três períodos de conservação sendo em ambos os grupos o fluxo de *1 e 24 horas* diferentes do fluxo em *0 horas (Tabela 3)*. Não houve diferença estatística entre os períodos *1 e 24 horas* em todos os grupos analisados (*Tabela 4*).

TABELA 3 - Média \pm desvio padrão da média dos Fluxos de perfusão imediata e após 1 e 24 horas de conservação renal a 10⁰ C e 80 mmHg após 0, 1 e 24 horas de conservação nas soluções de *Krebs-Henseleit (KH-CO)* (*CONTROLE*), *Collins (Co)*, *Euro-Collins (EC)* e *Universidade de Wisconsin (UW)* (*CONSERVADORAS*).

<i>Solução/Parâmetro</i>	<i>Fluxo de Perfusão - 0 horas</i>	<i>Fluxo de perfusão - 1 hora (ml/min)</i>	<i>Fluxo de perfusão - 24 horas (ml/min)</i>
<i>Krebs-Henseleit</i>	1,4+0,9 <i>n=20</i>	0,9+0,9 <i>n=6</i>	1,5+1,5 <i>n=6</i>
<i>Collins</i>	0,8+0,4 <i>n=20</i>	1,5+1,1 <i>n=6</i>	1,7+1,0 <i>n=6</i>
<i>Euro-Collins</i>	0,6+0,5 <i>n=17</i>	3,1+2,7 <i>a</i> <i>n=6</i>	3,8+1,1 <i>a</i> <i>n=6</i>
<i>Universidade de Wisconsin</i>	1,8+0,7 <i>n=25</i>	4,3+1,8 <i>a</i> <i>n=6</i>	2,8+0,3 <i>a</i> <i>n=6</i>

*Análise de Variância (ANOVA) corrigida por Bonferroni ($p < 0,016$):

a. 0x1e 24 horas ($p < 0,016$)

b. 1x24 ($p < 0,016$)

TABELA 4 - Média \pm desvio padrão da média dos Fluxos de perfusão renal a 10⁰ C e 80 mmHg após 1 e 24 horas de conservação nas soluções de *Krebs-Henseleit (KH-CO) (CONTROLE)*, *Collins (Co)*, *Euro-Collins (EC)* e *Universidade de Wisconsin (UW) (CONSERVADORAS)*.

<i>Solução/Parâmetro</i>	<i>Fluxo de perfusão - 1 hora (ml/min)</i>	<i>Fluxo de perfusão - 24 horas (ml/min)</i>
Krebs-Henseleit (KH-CO)	0,9+0,9 <i>n=6</i>	1,5+1,5 <i>n=6</i>
Collins (Co)	1,5+1,1 <i>n=6</i>	1,7+1,0 <i>n=6</i>
Euro-Collins (EC)	3,1+2,7 <i>n=6</i>	3,8+1,1 <i>n=6</i>
Universidade de Wisconsin (UW)	4,3+1,8 <i>n=6</i>	2,8+0,3 <i>n=6</i>

* *Teste t de Student não pareado (p<0,05): 1 hora x 24 horas (não se detectou diferenças na análise através deste teste).*

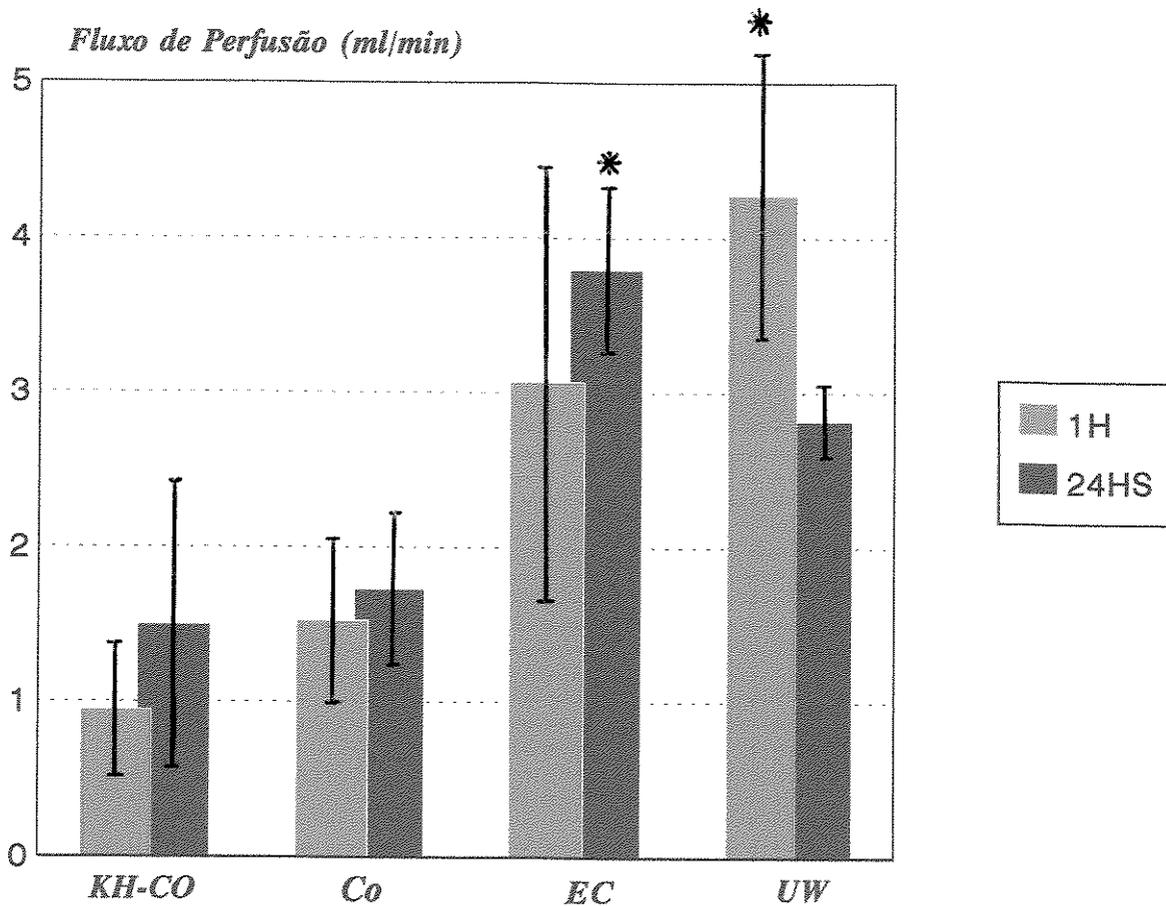


FIGURA 9 - Fluxo de perfusão após 1 e 24 horas de conservação nas soluções de Krebs-Henseleit (KH-CO), Collins (Co), Euro-Collins (EC) e Universidade de Wisconsin (UW) e reperfundidas a 10⁰ C e 80 mmHg.

* *Teste t de Student não pareado (p<0,05): CONTROLE x demais grupos experimentais*

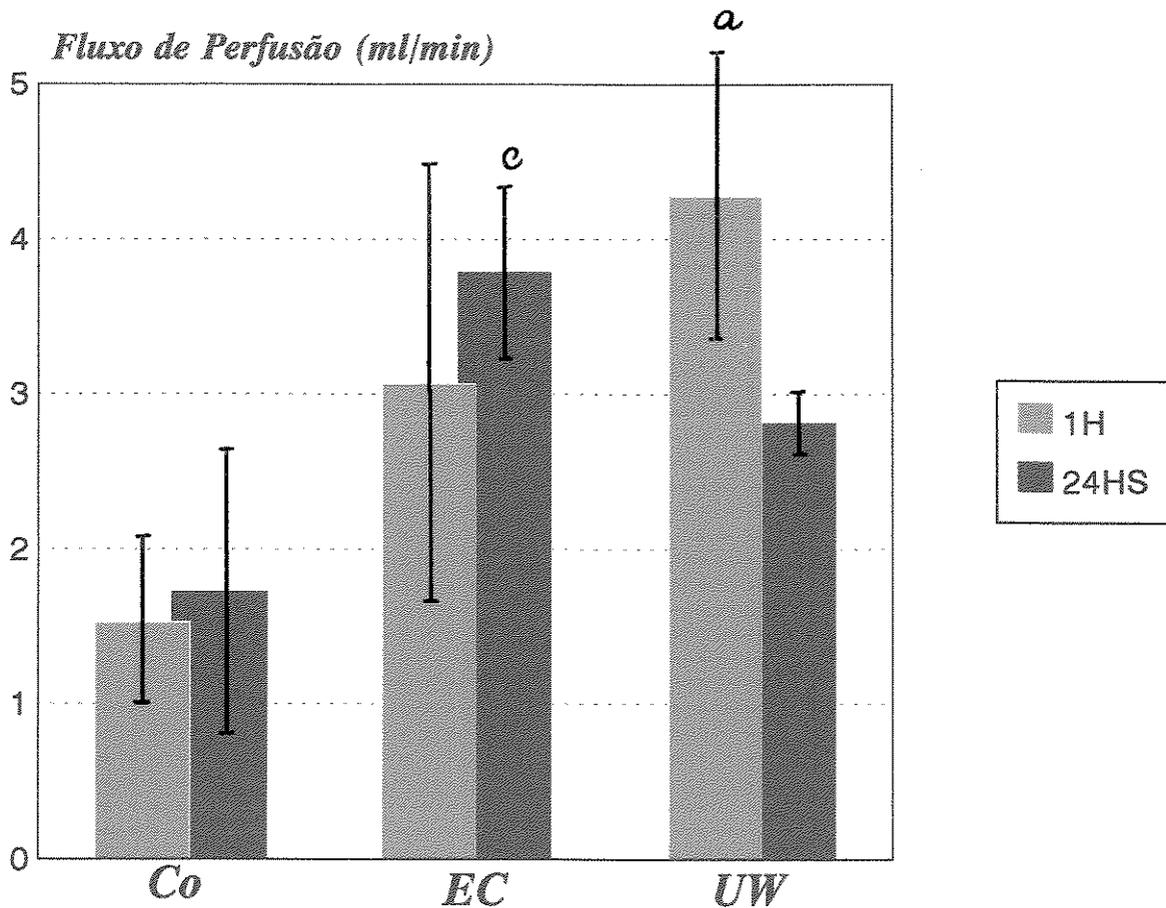


FIGURA 10 - Fluxo de perfusão após 1 e 24 horas de conservação nas soluções de Collins (Co), Euro-Collins (EC) e Universidade de Wisconsin (UW) e reperfundidas a 10° C e 80 mmHg.

* *Análise de Variância (ANOVA) corrigida por Bonferroni:*

- a. Co x EC e UW - 1hora ($p < 0,016$)
- b. EC x UW - 1hora ($p < 0,016$)
- c. Co x EC e UW - 24horas ($p < 0,016$)
- d. EC x UW - 24horas ($p < 0,016$)

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A preservação do órgão transplantado até a revascularização seguida do funcionamento adequado do mesmo no período pós-operatório são aspectos relevantes no sucesso do transplante de órgãos (BELZER *et al*, 1982⁷; BENNETT *et al*, 1982¹⁴).

Várias técnicas de conservação do órgão destinado ao transplante são utilizadas a fim de permitir melhor preservação tecidual e funcional do mesmo no período pós-operatório. O *armazenamento a frio*, após lavagem do órgão com soluções conservadoras, foi o método escolhido pela maioria dos Centros Transplantadores mundiais por ser simples e menos dispendioso que as outras formas de conservação renal (BESARAB *et al*, 1987¹⁶; RIBEIRO *et al*, 1994⁷⁴). Porém, ainda existem controvérsias em torno da eficiência de tais soluções, chamadas conservadoras, no tocante à preservação adequada, por períodos variados, da integridade do tecido renal. Assim, ainda permanecem obscuras as causas de eventuais fracassos de transplantes renais no que se refere à conservação do órgão, embora alguns mecanismos fisiológicos e moleculares já tenham sido melhor documentados e relacionados a tais fracassos (*depleção de estoques celulares de nucleotídeos de adenina; acúmulo de metabólitos, principalmente de íons*

hidrogênio; autólise e liberação de enzimas lisossomais, lesão de membranas e de vasculatura e lesões primárias devido à liberação de radicais livres) (BELZER & SOUTHARD, 1980¹⁰; TAKANO et al, 1985⁸⁹; GREEN et al, 1986³⁸; POMPEU et al, 1993a⁶⁹; POMPEU et al, 1993b⁷⁰; POMPEU, 1993c⁷¹).

Tomando-se como universo de estudo a conservação de órgãos destinados ao transplante, a procura de uma solução ideal para tal finalidade ainda é um grande desafio no campo experimental e na prática clínica (ACQUATELA et al, 1972¹; AGUILO et al, 1975²; BELZER et al, 1982⁷; BELZER & SOUTHARD, 1980¹⁰). A inibição do edema celular, mais do que o conteúdo celular de potássio, parece ser um dos fatores mais importantes do efeito preservador das soluções que mimetizam o meio intracelular, utilizadas no armazenamento a frio (COLLINS et al, 1969²⁶; COLLINS et al 1980²⁷; DOWNES et al, 1973³³; SIMÕES et al, 1984b⁸⁷). Outra forma de se tentar prolongar o período de preservação é a adição de componentes vasodilatadores à solução conservadora, como o peptídeo natriurético atrial, efetivo também no aumento do ritmo de filtração glomerular (MARUMO et al, 1990⁵³).

Assim, uma das maneiras de análise do processo de conservação de órgãos destinados ao transplante, visualizadas originalmente pelo nosso Laboratório, seria o estudo dos efeitos morfológicos das soluções conservadoras sobre o rim após a perfusão e conservação do mesmo. Assim, GUILLAUMON (1991³⁹) relatou que o órgão perfundido com a solução de Collins apresentou suas células epiteliais mais estáveis, com pouca regeneração e melhores índices funcionais do que quando

comparadas ao parênquima renal daqueles rins perfundidos com solução de diálise e salina.

No presente estudo, a distribuição de tais soluções pelo parênquima renal foi avaliada pela *Técnica de Hanssen modificada* pelo nosso Laboratório a fim de encontrar ou de se definir a proporção de estruturas alcançadas pela solução conservadora. Tal avaliação pode ser de grande valia pois supõe-se que quanto maior for a distribuição destas soluções pelo parênquima do órgão, um número maior de estruturas vitais ao funcionamento deste, após o reimplante, serão atingidas permitindo uma melhor preservação global do rim.

Esta técnica, descrita inicialmente por HANSSSEN (1958⁴¹), está baseada no fato de que o ferrocianeto de sódio é considerado um indicador para demonstração histoquímica da filtração glomerular (BERLINER *et al*, 1950¹⁵) e distribuição do filtrado através da população de néfrons em condições experimentais, comparando-se a quantidade de ferrocianeto férrico precipitado em cada néfron (HANSSSEN, 1958⁴¹). Porém, pela técnica original, um bólus de ferrocianeto de sódio a 10% é injetado intravenosamente ou pela aorta, acima do nível da artéria renal, numa dosagem de 0,2 ml/100 gramas de peso corporal durante 10-12 segundos, sendo o pedículo renal ligado e o rim congelado posteriormente. Em nossos estudos, o rim foi perfundido com ferrocianeto de sódio numa concentração em torno de 1%, não marcado radioativamente, e posteriormente tratado como a técnica original.

Alguns estudos utilizaram o ferrocianeto de sódio marcado ou não com ^{14}C injetando-o continuamente nos animais, por mais de cinco minutos, nas concentrações de 0,7 a 0,3 mM (COLLINS *et al*, 1984^{a25}) ou 1,0 a 1,5 mM (BESARAB *et al*, 1984¹⁷). O ferrocianeto pode funcionar como indicador da filtração glomerular embora sua utilização tenha sido abandonada nos estudos de *Fisiologia Renal*, pois os dados referentes a tal substância são muito heterogêneos, existindo possível efeito tóxico da mesma sob o rim. Por outro lado, sua utilização tem sido de grande valia para estudos morfológicos deste órgão.

Para uma melhor visualização da distribuição do *Azul da Prússia* pelo parênquima renal, e devido à elevada concentração descrita originalmente, utilizamos uma concentração menor do que a descrita por HANSSEN (1958⁴¹). A utilização de uma concentração elevada (*em torno de 10%*) de *ferrocianeto de sódio* resultou, em nossas condições experimentais - onde tal solução não é injetada pela aorta, com chance de se distribuir por todo o corpo do animal estudado, mas sim diretamente na artéria renal -, numa coloração de *Azul da Prússia* por demais intensa, dificultando a visualização final da distribuição pelo parênquima renal da solução estudada. A concentração de 1% utilizada se mostrou ideal para os nossos objetivos.

a. Análise Morfológica

A utilização da *Solução de Krebs-Henseleit modificada (CONTROLE)*, a 10° C e em condições de hipóxia, após perfusão rápida da mesma ou conservação renal por períodos de 1 hora e 24 horas, resultaram, morfológicamente, numa distribuição *heterogênea* da mesma pelo parênquima do órgão (*Fotos 3A, 4A e 5A*). Tal resultado também foi observado por OISHI (1987⁶²), utilizando-se desta mesma técnica porém perfundindo o rim com solução de *Krebs-Henseleit com albumina bovina*, a 37° C e gaseificação de O₂/CO₂ (95/5% respectivamente). Após 1 hora e 24 horas de conservação na solução acima mencionada, a 4° C, seguido de reperfusão utilizando-se a mesma solução, nas condições de temperatura e pressão utilizadas na perfusão inicial, o padrão de distribuição se aproximou muito daquele observado no grupo onde se analisou tal distribuição após rápida perfusão do órgão. Provavelmente este padrão se deva à alteração da resistência vascular do órgão pela solução em questão. Isto pode ser devido ao fato de que esta solução, acrescida por albumina (plasma artificial), em baixas temperaturas, é eficiente quanto à distribuição pelo parênquima renal quando utilizada em bomba perfusora e não somente perfundida por pressão hidrostática. Neste caso, há necessidade de uma maior pressão, produzida pela bomba, juntamente com a pressão oncótica resultante da própria solução, para se forçar a entrada do perfusato no parênquima renal, promovendo a perfusão adequada do órgão e evitando as áreas de

heterogeneidade observadas na utilização de somente pressão hidrostática para perfusão (OISHI, 1987⁶²).

Observando-se os resultados obtidos após perfusão com as soluções conservadoras (*Collins*, *Euro-Collins* e *Universidade de Wisconsin*), após rápida perfusão, temos um padrão de distribuição mais **homogêneo** quando comparado ao grupo de rins perfundidos com a solução de *Krebs-Henseleit modificado*. Porém, temos que tal padrão *homogêneo* se mostrou efetivo entre os três períodos de conservação (imediate, 1 e 24 horas) somente naqueles grupos perfundidos e conservados na solução da *Universidade de Wisconsin* enquanto as demais soluções variaram seu padrão de distribuição conforme o tempo de conservação hipotérmica. Estes achados indicam a razão pela qual tais soluções que se distribuem de forma homogênea são utilizadas como "flushing solutions", onde o emprego de somente a pressão hidrostática como força de perfusão garante a sua distribuição adequada pelo órgão, além de tais soluções, por suas próprias características, diminuírem a resistência vascular facilitando a sua entrada pelo parênquima renal (OISHI, 1987⁶²).

O padrão de distribuição da solução obtido no grupo perfundido com *Collins*, na ausência de conservação hipotérmica posterior, mostra-se mais **homogêneo** ao compararmos com a solução *CONTROLE*,

porém não alcançando os níveis apresentados pelos grupos perfundidos com *Euro-Collins* e solução da Universidade de Winsconsin. A análise da ultraestrutura renal após a perfusão com solução de Collins mostrou a sua maior eficiência na manutenção da integridade tecidual renal quando comparada à morfologia celular resultante da perfusão com tampão fosfato de sódio (ANDREWS & COFFEY, 1982³). No entanto os dados funcionais deste trabalho no túbulo e no rim isolado não foram melhores que a solução de Euro-Collins. Este achados indicam que nem sempre a boa forma histológica significa melhor eficiência funcional pois podem mimetizar quadro de mumificação celular (SIMÕES *et al*, 1984^{a86}; OISHI, 1987⁶²). Após 1 hora de conservação, a coloração daqueles rins perfundidos com *Collins* se mostrou *heterogênea*, corando preferencialmente a região cortical enquanto a medular permaneceu sem coloração. Após 24 horas de conservação, o padrão de coloração se mostra *homogêneo*, com algumas regiões medulares e todo o córtex corados. Estudos ultraestruturais mostram que a estocagem por 24 horas na solução de Collins resulta em danos consideráveis na integridade morfológica dos néfrons, incluindo a degeneração das células tubulares, edema extenso, degeneração das células endoteliais e do epitélio glomerular, com acúmulo de debris celulares floculentos no espaço capsular de Bowman (ANDREWS & COFFEY, 1982³). Tais danos estruturais do órgão podem ser responsáveis pela distribuição mais homogênea da solução de Collins, na reperusão após 24 horas de conservação bem como do ferrocianeto ferrico

utilizado como corante, ficando assim a difusão pelos espaços parenquimatosos e tubulares mais acessível do que quando da perfusão inicial. Assim, tal distribuição colorimétrica pode não indicar que o rim está íntegro e apto ao bom funcionamento pós-transplante mas sim que a diferença encontrada após o período de conservação é devida à difusão desenfreada da solução pelo órgão com sinais de deterioração tecidual.

Analisando-se os grupos perfundidos com as solução de *Euro-Collins*, após perfusão rápida e conservação por *1 hora*, temos um padrão de coloração **homogêneo** quando comparado aos grupos de *Collins* e *Krebs-Henseleit*. Notamos diferenças de padrão de coloração quando colocamos para a análise o grupo de *Euro-Collins* perfundido e conservado por *24 horas*, em condições de hipotermia (4° C), apresentando esta **heterogeneidade** quanto à distribuição de corante, ou seja, o córtex corado em contraponto com a medula sem coloração. A perfusão inicial com a solução de *Euro-Collins* é mais efetiva na sua distribuição, sendo capaz de ultrapassar a barreira vascular e atingir os espaços parenquimatosos, bem como ser filtrada e atingir a luz do túbulo. Desta forma, uma quantidade maior de estruturas estaria preservada durante a estocagem a frio. Quando da reperfusão após *1 hora* de conservação hipotérmica, esta capacidade de distribuição ainda se mantém. Porém, o mesmo não se observa após *24 horas* de conservação ao notarmos diferenças de padrão de coloração, apresentando este **heterogeneidade** quanto à distribuição de corante, ou seja, o córtex

corado e medula sem coloração. A vasoconstrição resultante desta manobra de conservação pode ser a responsável pela diferença de distribuição da solução pelo parênquima. Isto pode indicar que a reperfusão após períodos prolongados de estocagem pode ser prejudicial ao órgão.

Por outro lado, aqueles rins perfundidos e conservados com a solução da *Universidade de Wisconsin* nos diversos períodos de tempo apresentaram coloração além de **homogênea**, extremamente intensa quando comparada aos demais grupos. Tal fato se deve provavelmente à capacidade de manutenção da integridade vascular por esta solução com características coloidosmóticas (*hidróxido de amido*) e à facilidade deixada por esta solução na penetração do ferrocianeto de sódio para as regiões do parênquima, não normalmente atingidas pelas demais soluções. Dados provenientes de estudos com a técnica de Microfil para análise morfológica da microvasculatura renal demonstraram que rins conservados na solução de *UW* por 72 horas apresentaram o sistema vascular tanto cortical como medular totalmente intacto, enquanto a preservação por este mesmo período de tempo na solução de Euro-Collins mostrou mudanças obstrutivas e necróticas da microvasculatura e deterioração da hemodinâmica renal (*UEDA et al, 1989²¹*).

Devido às características químicas desta solução, como a riqueza de componentes osmoticamente ativos, observamos em nossas condições experimentais um elevado *coeficiente de difusão* da solução de *UW* pelas diversas regiões do parênquima renal. Entende-se aqui por "*coeficiente de difusão*", o qual não foi ainda calculado matematicamente, a capacidade de determinada solução em ultrapassar as barreiras vasculares e atingir uma maior população de elementos celulares tanto daqueles componentes dos túbulos renais quanto das células do parênquima. Este parâmetro, juntamente com a ausência de uma possível toxicidade do ferrocianeto férrico, refletiram igualmente em todos os rins dos diferentes grupos. Em se tratando das soluções eletrolíticas, este coeficiente estaria diminuído em relação à solução de *UW*, pois esta possui componentes coloidosmóticos importantes, dificultando a saída dos mesmos pelo sistema vascular renal, o que poderia levar à manutenção da sua capacidade conservadora.

A distribuição de ferrocianeto férrico ou Azul da Prússia pelo parênquima renal, responsável pela coloração observada no manuseio desta técnica, obtida nos grupos perfundidos com *Euro-Collins e Solução da Universidade de Wisconsin* nos leva a considerar relevante tal distribuição *homogênea* quando analisamos o relativo sucesso da utilização das mesmas no transplante clínico. Tais resultados podem indicar que a distribuição de uma solução uniformemente pelo parênquima renal é um requisito importante para que a mesma possa exibir características conservadoras (*OISHI, 1987⁶²*), atingindo uma maior população de néfrons e garantindo o funcionamento adequado do órgão após o reimplante.

Outro aspecto importante para análise seria a diferença de tempo de conservação após perfusão a 80 mmHg, a frio, por zero, 1 hora e 24 horas (em banho frio envolto em gelo, a aproximadamente 4°C). Nestas condições não se observam diferenças de coloração do parênquima entre os grupos correlatos de *Krebs-Henseleit* (0, 1 e 24 horas), *Collins* (0 e 1 hora), *Euro-Collins* (0 e 1 hora) e *Universidade de Wisconsin* (0, 1 e 24 horas) enquanto diferenças foram observadas ao se analisar os grupos de *Collins* (24 horas) e *Euro-Collins* (24 horas) em comparação aos demais grupos perfundidos com estas mesmas soluções. Este fato nos leva a acreditar que quando período de tempo de conservação for curto (1 hora), este não é suficiente para alterar o padrão de distribuição da solução pelo parênquima renal mas, dependendo da solução utilizada, o aumento do tempo de conservação levará a diferenças neste padrão de coloração, como foi observado nos grupos de *Collins e Euro-Collins* (24 horas).

Quando observamos o padrão *homogêneo* de distribuição, dentre os grupos perfundidos com as soluções de *Collins, Euro-Collins e solução da Universidade de Wisconsin*, temos que este último apresenta uma coloração extremamente intensa mesmo após submetido a condições de hipotermia por 1 hora e 24 horas. A solução da *Universidade de Wisconsin* utilizada nesta análise, quando focado este aspecto, pode ser considerada a solução atual que melhor se distribui pelo parênquima renal, nas nossas condições experimentais, podendo assim atingir as estruturas do órgão como um todo,

resultando numa conservação mais efetiva. Esta propriedade certamente tem como aliada a riqueza de componentes existente na formulação da *solução da Universidade de Wisconsin*, composição esta que deve ser a responsável pela obtenção de rins em melhores condições funcionais após o reimplante, com tem sido relatado na literatura (BELZER & SOUTHARD, 1988¹²; MARSHAL *et al*, 1991b⁵²; MEL *et al*, 1990⁵⁵; MOUKARZEL *et al*, 1990⁵⁸; PLOEG *et al*, 1988⁶⁷; PLOEG, 1990⁶⁸; RIBEIRO *et al*, 1994⁷⁴; SCHLUMPF *et al*, 1991⁸¹; BAATARD *et al*, 1993⁵). Esta solução apresenta dentre os seus componentes, o hidróxido de amido (HES) com a finalidade de aumentar a pressão osmótica intravascular bem como o lactobionato de potássio e a rafinose também como agentes osmóticos os quais não são difusíveis e raramente metabolizados. Contém, também, captadores de radicais de oxigênio como a glutathione e o alopurinol como inibidor da xantina oxidase. O tamponamento nesta solução é feito por radicais fosfato e não carbonato. Foi também adicionado a esta solução a adenosina, um estimulante da produção de ATP provendo energia ao órgão logo após a revascularização sendo este um dos principais componentes que aumentam o custo desta solução (BAATARD *et al*, 1993⁵). Desta forma, alguns autores tem se preocupado em selecionar dentre estes componentes aqueles que são perfeitamente substituíveis por outros mais acessíveis como é o caso da substituição do HES por dextran (SCHLUMPF *et al*, 1991⁸¹) ou mesmo excluindo componentes com o próprio HES, a adenosina e o alopurinol (BAATARD *et al*, 1993⁵).

Estes dados morfológicos indicam que existem fatores químicos na composição destas soluções que influem decididamente na sua distribuição pelo parênquima renal. Certamente, outros fatores devem estar implicados no sucesso dessa conservação e devem ser investigados a fim de garantir a sobrevida do enxerto e funcionamento efetivo do órgão pós-reimplante, elevando os índices de sucesso do transplante renal.

b. Análise Funcional

Complementando a análise morfológica demonstrada anteriormente, observou-se de forma original na literatura alguns aspectos sobre as condições em que ocorre a perfusão (*fluxo de perfusão, volume de perfusato, % rins filtrantes tempo de perfusão*) relevantes à conservação efetiva do órgão destinado ao transplante.

O fluxo de perfusão observado nos grupos onde se utilizou a solução da *Universidade de Wisconsin* foi maior e diferente daquele observado nos demais grupos experimentais e igual ao controle, apresentando resultados semelhantes à literatura (0,5-1,25 ml/min) (*BIGUZAS et al, 1990¹⁸*). Tal resultado demonstra que esta solução, sendo mais eficaz quanto à distribuição pelo parênquima renal, também se mostra mais efetiva na perfusão renal por unidade de tempo, permitindo uma melhor lavagem do órgão durante a preparação do mesmo para o transplante. Por outro lado as soluções eletrolíticas (*Collins e Euro-Collins*)

apresentaram índices estatisticamente iguais entre si no tocante ao fluxo de perfusão e diferentes do grupo controle e Universidade de Wisconsin. Sabendo-se da elevada eficiência no que tange à conservação renal para o transplante bem como à complexidade da solução da *Universidade de Wisconsin*, o fluxo elevado da mesma durante a perfusão por gravidade aliado à complexidade desta solução deve ser um parâmetro importante na manutenção da viabilidade funcional do órgão em questão. Assim, o elevado fluxo pelo órgão bem como o elevado coeficiente de difusão já observado nas análises morfológicas dos rins perfundidos com a solução da *Universidade de Wisconsin* permitem-nos concluir que esta solução é a mais eficiente no que se diz respeito à conservação renal dentre aquelas aqui estudadas (*Tabelas 1 e 2 e Figuras 6 e 7*).

Por outro lado, houve diferença no tempo necessário para a efetiva lavagem do órgão dentre a solução de *Euro-Collins* e as demais utilizadas neste estudo (*Tabela 1 e 2*). Tal fato ressalta as características inerentes de cada solução tornando-as mais ou menos capazes de perfundirem e lavarem todo o leito vascular renal com maior rapidez. Assim, mesmo se utilizando de um período maior para a perfusão adequada, a solução de *Collins* apresentou um fluxo de perfusão mais baixo daquele observado pelas soluções de *Krebs-Henseleit* e *Universidade de Wisconsin*, com conseqüente utilização de volumes menores para tal perfusão (*Tabelas 1 e 2 e Figuras 2, 3, 4 e 5*).

Ao observarmos a percentagem de rins que produziram filtrado durante a perfusão por gravidade (rins filtrantes), os grupos *Controle*, *Collins* e *Euro-Collins* foram aqueles que apresentaram grandes valores percentuais enquanto somente 8% dos rins perfundidos com a solução da *Universidade de Wisconsin* produziram filtrado (*Tabelas 1 e 3 e Figura 8*).

Existem evidências experimentais de nosso Laboratório que a conservação tubular renal pelo lado luminal é deletéria para a célula do túbulo proximal e da pars recta e que o melhor local para a atuação da solução conservadora seria o lado peritubular compreendendo a via sanguínea, o interstício e a membrana basal (*FIGUEIREDO et al, 1986³⁶; SILVA et al, 1993⁸⁵; SILVA et al, 1992⁸⁴*). Assim, observando-se o fluxo de perfusão bem como o baixo índice de filtração da solução da *Universidade de Wisconsin*, esta solução possui pouca probabilidade de atingir o epitélio tubular, não acarretando efeitos deletérios do lado luminal das células tubulares, caso esta atingisse tal epitélio (*Tabelas 1 e 3 e Figuras 6, 7 e 8*). Deste modo, a preservação da integridade renal se torna mais efetiva garantindo ao órgão conservado nesta solução maiores índices de sucesso quando do reimplante e do período pós operatório.

A perfusão após o período de conservação hipotérmica afeta inicialmente as células adjacentes à circulação como as células endoteliais e, secundariamente, o parênquima renal. Soluções especialmente formuladas para a reperfusão (solução de lavagem terminal

como a solução de Carolina) contém uma variedade de agentes designados a fornecer metabólitos às células, controlar a entrada de cálcio, e prevenir a oxidação (COLLINS & WICOMB, 1992³⁰). PARROTT *et al.* observaram que a reperfusão com a solução de Collins após estocagem hipotérmica de rins de cadáver reduziu significativamente os níveis de NTA (1990⁶⁴).

Os fluxos de perfusão entre 1 e 24 horas foram iguais nas diferentes soluções utilizadas neste estudo. Porém, quando analisamos o fluxo de perfusão imediata (0 horas) e reperfusão (1 e 24 horas), a solução de *Krebs-Henseleit* tem seus valores iguais estatisticamente, o mesmo ocorrendo com a solução de *Collins*. Assim, não há diferença na perfusão do órgão tanto na perfusão imediata quanto após os diferentes períodos de conservação. A análise destes parâmetros das soluções de *Euro-Collins* e *Universidade de Wisconsin* mostram diferenças entre a perfusão inicial e a perfusão após 1 e 24 horas, sendo os fluxos de perfusão maiores quando comparados à perfusão imediata. Assim, após o período de conservação, *EC* e *UW* são capazes de penetrar com maior facilidade pelo parênquima renal do que quando o fizeram inicialmente (*Tabelas 1, 4 e 5 e Figuras 9 e 10*).

Após 1 hora de conservação, o fluxo de perfusão da solução da *Universidade de Wisconsin* foi diferente às demais soluções. Quando da análise do fluxo de perfusão após 24 horas de conservação apenas a solução de *Euro-Collins* foi diferente e maior que as demais soluções perfundidas após este período de conservação (*Tabelas 1, 4 e 5 e Figuras 9 e 10*).

Acreditamos que esta técnica modificada em nosso Laboratório poderia ser utilizada para medir, *experimentalmente*, a distribuição e a eficiência de conservação de soluções destinadas ao transplante. Certamente tal técnica poderia ser também modificada adicionando-se outros marcadores capazes de medir com maior precisão os diversos fatores implicados no sucesso da conservação e, desta forma, garantindo um melhor funcionamento do órgão e sobrevida do mesmo após o reimplante.

□

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Este trabalho se propôs a avaliar os aspectos morfológicos e funcionais da preservação renal utilizando-se diferentes soluções de perfusão (*Krebs-Henseleit modificada*, *Collins*, *Euro-Collins* e *Universidade de Wisconsin*), a 10° C, em sistema de perfusão por gravidade, a 120 cm de altura o que corresponde a uma pressão de escoamento em torno de 80 mmHg, analisados imediatamente ou após 1 ou 24 horas de conservação.

A análise morfológica da distribuição destas soluções no parênquima foi feita pela utilização da *técnica de Hanssen modificada* em nosso laboratório, analisadas a partir dos padrões de coloração desta técnica, enquanto os aspectos funcionais a frio pela diferença de tempo de perfusão, volume de líquido perfundido e a razão destes resultando no fluxo de perfusão.

Diante dos dados obtidos, concluiu-se que:

- A solução da *Universidade de Wisconsin (UW)*, quando utilizada como "flushing solution", imediatamente após a perfusão ou após 1 e 24 horas de conservação hipotérmica, foi a que melhor se distribuiu pelo parênquima, resultando num padrão de coloração extremamente intenso, não observado nos demais grupos. Esta distribuição poderá ser uma das razões pelas quais os dados funcionais apontam esta solução como a mais eficiente na conservação do órgão. Deste modo, *UW* se mostrou mais apta a atingir uma maior população de néfrons e conseqüentemente

capaz de conservar um maior número de estruturas renais, o que garantiria um melhor funcionamento global do órgão diante do reimplante.

- Pelos estudos morfológicos através da técnica utilizada, houve uma certa graduação na distribuição do ferrocianeto férrico pelo parênquima renal. Em ordem decrescente, temos: UW>EC>Co>KH, permanecendo este padrão com variações mínimas, nos diferentes períodos de conservação. As soluções de UW e EC demonstraram ser mais eficientes quanto à distribuição pelo parênquima renal, podendo ser este padrão de distribuição responsável pelo relativo sucesso de ambas na conservação renal.

- Naqueles rins perfundidos com as soluções de Co, EC e KH houve filtração em mais de 40% dos casos durante o processo de perfusão por gravidade, enquanto quando do uso de UW obteve-se tal filtrado somente em 8% dos casos (2/25). Estes dados reforçam a possibilidade de que o contato de tais soluções preservadoras com a porção luminal das células tubulares resultam em efeitos deletérios a tais células, prejudicando assim o processo de conservação. No caso de UW, o sucesso de seu uso como solução conservadora poderia estar ligado ao fato de que esta solução dificilmente atinge o lúmen tubular, retardando os efeitos deletérios tubulares e perda da função global do rim.

- O fluxo de perfusão imediata foi maior quando utilizou-se a solução de UW na perfusão renal por gravidade, sendo a lavagem do órgão realizada em período menor de tempo utilizando-se maior volume

de solução. Esta solução se mostrou mais efetiva na perfusão do órgão para a conservação posterior, garantindo com maior rapidez o resfriamento das estruturas renais, o qual é necessário para a melhor conservação global do rim.

- Perfundindo-se os rins após 1 e 24 horas de conservação hipotérmica, o fluxo observado em ambos os casos e comparados com o fluxo imediato de perfusão, foram estatisticamente iguais dentro dos grupos experimentais.

- A solução de *UW* é a que melhor se distribui pelo parênquima renal durante a perfusão inicial e análise imediata e também durante a perfusão após conservação por 1 e 24 horas.

RESUMO

R E S U M O

ANÁLISE DE ASPECTOS MORFOLÓGICOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE HANSSSEN MODIFICADA E AVALIAÇÃO DE FLUXOS DE PERFUSÃO DURANTE A CONSERVAÇÃO RENAL COM DIFERENTES SOLUÇÕES DE PERFUSÃO: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.

Neste trabalho, avaliamos a distribuição das soluções conservadoras utilizando a *técnica de coloração de Hanssen* modificada em nosso Laboratório, no rim de rato perfundido por uma pressão correspondente a 120 cm de água, aproximadamente 80 mmHg. Esta técnica está baseada em dados que demonstram que o ferrocianeto de sódio pode ser filtrado e se distribui de forma uniforme no parênquima renal pelas vias tubular, venosa e intersticial. A visualização deste ferrocianeto de sódio injetado está baseada na sua propriedade química de que em meio ácido se transforma em ferrocianeto férrico (azul da Prússia) Neste protocolo utilizamos as seguintes soluções para infusão: *Krebs-Henseleit modificada* (KH - Controle), *Collins* (Co), *Euro-Collins* (EC) e *Universidade de Wisconsin* (UW), analisando a sua distribuição após perfusão a 10⁰ C com estas soluções e conservação do órgão por períodos de 0, 1 e 24 horas, em banho de gelo (aproximadamente 4⁰C) . Os nossos resultados morfológicos, avaliados pela coloração, indicam que a solução de KH se distribui heterogeneamente quando comparadas às demais soluções, após os três períodos de conservação, enquanto as soluções de Co, EC e UW se distribuíram com maior eficácia pelo parênquima renal. Dentre estas últimas, observamos que a solução de Co se distribuiu com heterogeneidade maior

após os três períodos de conservação, ficando este fato mais evidente na conservação por 1 hora. *EC* e *UW* se distribuíram homogeneamente em relação a *Co* e *KH* após 0 e 1 hora, enquanto após 24 horas, *EC* apresentou distribuição semelhante à de *Co*. Dentre as soluções utilizadas, *UW*, após os três períodos de conservação, foi a solução que melhor se distribuiu pelo parênquima renal. Este achado nos permite inferir que as soluções de *EC* e *UW* são capazes de atingir uma maior população de néfrons os quais poderiam ser melhor conservados.

Um outro aspecto estudado foi o fluxo de perfusão pelo lado sanguíneo (Artéria-Veia) e a percentagem de rins que apresentaram filtrado passível de coleta durante a perfusão, nos rins de rato perfundidos com as soluções previamente utilizadas na análise morfológica, nas mesmas condições experimentais de temperatura e pressão já citadas acima, bem como nos mesmos grupos experimentais (0,1 e 24 horas de conservação). Os nossos resultados nos permitem concluir que *UW* parece ser a solução que mais se configura à conservação ideal do rim para o transplante pois nas nossas condições experimentais apresentou *fluxo de perfusão-0h* diferente e maior que os demais grupos experimentais sendo maior que todos na primeira hora e apenas menor que *EC* na reperfusão após 24 h, porém com um índice de apenas 8% de filtração na perfusão inicial. Desta forma, nestes períodos de conservação e reperfusão subsequente, seria uma solução com pouca probabilidade de atingir o epitélio tubular, o que poderia acarretar efeitos deletérios do lado luminal destas células tubulares (*Figueiredo et al, Transplantation, 1986*). Tal técnica original pode se constituir numa forma de

avaliação da efetividade da solução conservadora, o que refletiria de certo modo numa melhor função global do rim pós-reimplante. Assim, este tipo de avaliação morfológica e funcional, embora não ideal, poderá abrir perspectivas na experimentação de novas soluções de conservação acopladas com outras técnicas, para análise da distribuição e atuação das mesmas na manutenção da viabilidade do órgão durante o transplante clínico ou experimental.

FINANCIAMENTO: CAPES-CNPq

SUMMARY

SUMMARY

This work was designed to check the distribution of several preservation solutions using the Hanssen's technique modified by our Laboratory. After perfusing the rat kidney with a correspondent pressure of 120 cm of water, about 80 mmHg, with several preservation solutions, it was followed by perfusing with sodium ferrocyanide which can be filtered and distributed uniformly over the kidney parenchima by the tubular, venous and interstitial ways. The sodium ferrocyanide has a chemistry property of been transformed in ferric ferrocyanide (Prussian blue) when exposed to acid medium (ferric chloride) and stained the kidney parenchima. This maneuver permits to see the distribution of the solution. In this protocol, the following solutions used were: *Modified Krebs-Henseleit (KH)*, *Collins (Co)*, *Euro-Collins (EC)* and *University of Wisconsin (UW)*, and the distribution was analysed after their perfusion at 10° C, and conservation periods of 0, 1 and 24 hours in ice bath (nearly 4° C). Our morphological results, analysed by the colour pictures, indicates that the *KH* solution distributes heterogeneously when compared to the other groups, after all conservation periods, while the *Co*, *EC* and *UW* solutions distributes more efficiently by the kidney parenchima. From those solutions, the *Co* distributes heterogeneously after the conservations periods. *EC* and *UW* distributes homogeneously compared to *Co* and *KH* after 0 and 1 hour, while after 24 hours *EC* presented distribution similar to *Co*. Considering the used solutions, *UW*, after all conservation periods, was the best solution that distributes by the kidney

parenchima. This results pointed out that *EC* and *UW* were able to gain a high number of nephron's unit that could get best performance.

Another aspect that was studied was the perfusion flux by the blood side (arterial-venous) and the percentage of kidney able to filter during the perfusion. For this purpose, the kidney were perfused with the preservations solutions used for morphological analyses, at the same condition of temperature and pressure, and at the same groups (0, 1 and 24 hour of conservation periods). Our results led us to conclude that *UW* is more effective to preserve the kidney to transplantation because it presented a different and higher perfusion flux-0h compared to the other experimental groups and it was higher at the 1 hour and lower than *EC* only after 24 hours of preservation. By the other hand, *UW* presented the lowest index of filtration at the beginning perfusion (8%). Therefore, *UW* could be a solution with a little probability of gaining the tubular epithelium layer, fact that would result in deleterious effects at the luminal side of this tubular cells (*Figueiredo et al, 1986*). This original technique can be valuable tool to study effectiveness of preservation solutions, which would works to get better kidney function post reimplant. This kind of morphological and physiological approach is not ideal but could open perspectives to check new preservation solutions and could be associated to the other techniques to analyse their distribution and action for the best maintenance of organ viability during the clinical or experimental transplant.

FINANCIAL SUPPORT: CAPES - CNPq

***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACQUATELA,H.; PÉREZ-GONZÁLES,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. AGUILO,J.J.; WOODS,J.E.; HOLLEY,K.E. Canine kidney preservation for 24 to 72 hours. Arch. Surg., 110: 202-205, 1975.

3. ANDREWS,P.M. & COFFEY,A.K. Factors that improve the preservation of nephron morphology during cold storage. Lab. Invest., 46 (1): 100-120, 1982.

4. ARVIG,B.; ENGBERG,A.; ERICSON,J.I.E. Efects of cold ischemia on the preserved and transplanted rat kidney. Virchows Archiv B cell Path., 34:173-192, 1980.

5. BAATARD,R.; PRADIER,F.; DANTAL,J.; KARAM,G.
CANTAROVICH,D. HOURMANT,M.; BOURBIGOT,B.;
JOULILLOU,J.P. Prospective randomized comparison of
University of Wisconsin and UW-modified, lacking
hydroxyethyl-starch, cold storage solution in kidney
transplantation. Transplantation, 55(1): 31-35, 1993.

6. BELZER,F.O.; ASHBY,B.S.; DUNPHY,J.E. 24 hours and 72
hours preservation of canine kidneys. Lancet, 9: 536-539,
1967.

7. BELZER,F.O.; GLASS,N.R.; SOLLINGER,H.W.; SOUTHARD,
J.H. A new perfusate for kidney preservation.
Transplantation, 33 (3): 322-323, 1982.

8. BELZER,F.O.; HOFFMAN,R.; HUANG,J.; DOWNES,G.
Endothelial damage in perfused dog kidney and cold
sensitivity of vascular Na-K-ATPase. Cryobiology,9:
457-460, 1972.

9. BELZER,F.O.; SOLLINGER,H.W.; GLASS,N.R.; MILLER,A.T.;
HOFFMANN,R.M.; SOUTHARD,J.H. Beneficial effects of
adenosine and phosphate in kidney preservation.
Transplantation, 36(6): 633-635, 1983.

10. BELZER,F.O. & SOUTHARD,J.H. The future of kidney
preservation. Transplantation, 30 (3), 161-164, 1980.

11. BELZER,F.O. & SOUTHARD,J.H. Organ preservation and
transplantation. Transplantation approaches to craft rejection,
291-303, 1986.

12. BELZER,F.O. & SOUTHARD,J.H. Principles of solid organ
preservation by cold storage. Transplantation, 45 (4):
673-676, 1988.

13. BELZER,F.O. Renal Preservation. N.Eng. J. Med. 291(8), 402-
404, 1974.

14. BENNETT,W.M; BARRY,J.M.; NORMAND,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.

15. BERLINER,R.H.; KENNEDY,T.J.; HILTON,J.G. Renal clearance
of ferrocyanide in the dog. Am. J. Physiol., 160 325-329,
1950

16. BESARAB,A.; BRY,W.I.; COLLINS,G.M.; HALAZ,N.S.; The
effect of Oxygen free radicals on the preserved kidney.
Cryobiology 24: 264-269, 1987.

17. BESARAB,A.; MARTIN,G.B.; MEAD,T.; JARREL,B.;
WESSON,L. Effect of plasma protein and buffer in flushing
solution on rat kidney preservation by cold storage.
Transplantation, 37 (3): 239-245, 1984.

- 18.** BIGUZAS,M.; JABLONSKI,P.; THOMAS,A.C.; WALLS,K.; HOWDEN,B.O.; SCOTT,D.F.; MARSHALL,V.C. Evaluation of UW solution in a rat kidney preservation model: I. Effect of hydroxyethyl starch and electrolyte composition. Transplantation, 49(5); 872-875, 1990.
- 19.** BOWMAN,R.H. Gluconeogenesis in the isolated rat kidney. J. Biol. Chem. 245 1604, 1970.
- 20.** BOWMAN,R.H.; MAACK,T. Glucose transport by the isolated perfused rat kidney. Am. J. Physiol., 222: 1499, 1972.
- 21.** BRY,W.F.; COLLINS,G.M.; HALASZ,N.A.; JELLINEK,M. Improved function of perfused rabbit kidneys by prevention of oxidative injury. Transplantation, 38: (6), 579-582, 1984.

22. CERRA,F.B.; RAZA,S. ANDRESS,G.A.; SIEGEL,J.H. The endothelial damage of pulsative renal preservation and its relationship to perfusion pressure and colloidosmotic pressure. Surgery 81: 534, 1977.

23. CLARK,E.A.; MICKEY,M.R.; OPELZ,G.; TERASAKI,P.I.; Evaluation of Belzer and Collins kidney preservation methods. Lancet., 17: 361-363, 1973.

24. 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, 36(2): 136-143, 1983.

25. COLLINS,G.M.; BARRY,J.M.; MAXWELL,J.M.; SAMPSON, D.; WERF,B.A.Y. The value of Magnesium in flush solutions for human cadaveric kidney preservation. J. Urol., 131: 220-222, 1984a.

26. COLLINS, G.M.; BRAVO-SHUGARMAN, M.; TERASAKI, P.I.
Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours ice storage. Lancet., 6: 1219-1222, 1969.

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

28. COLLINS, G.M. & HALASZ, N.H. Composition of intracellular flush solutions for hypothermic kidney storage. Lancet., 25: 220-224, 1975.

29. COLLINS, G.M.; PETERSON, T.; WICOMB, W.N.; HALASZ, N.A. Experimental observation on the mode of action of "intracelular" flush solution. J. Surgical Res., 36(1): 1-8, 1984b.

30. COLLINS, G.M.; WICOMB, W.N. New organ preservation solutions. Kidney Int., 42 Supp 38, S197-202, 1992.

31. DAHLAGER,J.I.; BILDE,T. The integrity of tubular cell function after preservation in Collins or Sacks solution. Transplantation, 21(5): 365-369, 1976.

32. DONOHOE,J.F.; VENKATACHALAM,N.A.; BERNARD,D.B.; LEVINSKY,N.G. Tubular leakage and obstruction after renal ischemia: structural-function correlations. Kidney Int., 13: 208-222, 1978.

33. DOWNES,G.; HOFFMAN,R.; HUANG,J.; BELZER,F.O. Mechanism of action of washout solution for kidney preservation. Transplantation, 16(1): 46-53, 1973.

34. DREIKORN,K.; HORSCH,R; ROHL,L. 48- to 96- hour preservation canine kidney of using the Euro-Collins solution. Euro. Urol., 6: 221-224, 1980.

35. ENGBERGER, A.; NORLEN, B.J.; KALLSKOG, O.; WOLGAST, M.
Pathophysiology of renal ischemia *In: Renal preservation*
Vol. 8: MARBERGER, M.M.; DREIKORN, K. (Edits)
Willians & Wilkins, Baltimore, 1, 1983.
36. FIGUEIREDO, J.F.; FALKENSTEIN, D.; DRAIBE, J.A.;
SIGULEM, D.; RAMOS, O.L. The effect of Collins solution on
the function and structure of isolates proximal convoluted
tubules from rabbit kidneys. Transplantation, 42(1) 80-83,
1986.
37. GODFREY, K. Comparing the means of several groups. *In: Medical*
Uses os Statistics. John c. Bailar III & Frederick Mosteller:
205-229, Ed. NEJM Books, Massachusetts, 1986
38. GREEN, C.J.; HEALING, G.; LUNEC, J.; FULLER, B.J.
SIMPKINS, S. Evidence of free-radical induced damage in
rabbit kidneys after simple hypothermic preservation and
transplantation. Transplantation, 42(2): 161-165, 1986.

39. *GUILLAUMON, A.T.* Estudo experimental de transplante renal com diferentes líquidos de perfusão para conservação de órgão - Aspectos Microcirúrgicos. Tese de Doutorado na área de Ciências Médicas na Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 1991.
40. *HALASZ, N.A. & COLLINS, G.M.* Forty-eight hours kidney preservation. Arch. Surg. 111: 175-177, 1976.
41. *HANSSEN, O.E.* A histochemical method for evaluation for excreted sodium ferrocyanide in isolated tubules of mouse kidney. Acta Path. Microbiol. Scandinav., 44: 363-371, 1958.
42. *HILL, G.S.; LIGHT, J.A.; PERLOFF, L.J.* Perfusion related injury in renal transplantation. Surgery 79: 440, 1976.
43. *HOFFMANN, R.M.; SOUTHARD, J.H.; LUTZ, M.; MACKTY, A. BELZER, F.O.* Synthetic perfusate for kidney preservation. Arch. Surg., 118: 919-921, 1983.

44. JABLONSKI,P.; HOWDE,B.; MARSHALL,V.; SCOTT,D.
Evaluation of citrate flushing solution using the isolated
rat kidney. Transplantation, 30(4): 239-243, 1980.
45. JAMART,J. & LAMBOTTE,L. Efficiency and limitation of Euro-
Collins solution in kidney preservation. J. Surg. Res. 34(3):
195-205, 1993.
46. JOHNSON, R.W.G. The effect of ischemic injury on kidney
preserved for 24 hours before transplantation. Brit. J. Surg.,
59(10): 765-770, 1972.
47. LINDELL,S.L.; GANDOLPH,D.; SOUTHARD,J.H.;
BELZER,F.O. Comparison of PBS, HTK and UW
solutions for kidney preservation. Transplant. Proc. 23(5):
2399-2401, 1991.

48. LODGE,J.P.; PERRY,J.L.; SKINNER,C.; POTTS,D.J.; GILES,G.R. Improved porcine renal preservation with a simple extracellular solution PBS 140. Transplantation, 51: 574-579, 1991.
49. MARSHALL,V.; ROSS,B.D.; BISHOP,M.; MORRIS,P.J. Evaluation of renal preservation using the isolated perfused rat kidney. Transplantation 68: 315-318, 1978.
50. MARSHALL,V.C.; HOWDEN,B.O.; THOMAS,A.C.; BAXTER, K.; WILSON,N.; KUMAR,A.; JABLONSKI,P. Extended preservation of dog kidneys with modified UW solution. Transplantation Proc., 23(5): 2366-2367, 1991a.
51. MARSHALL,V.C. Renal preservation prior to transplantation. Transplantation, 30(3): 165-166, 1980.

52. MARSHALL, V.C.; JABLONSKI, P.; BIGUSAS, M.; HOWDEN, B.O.; WALLS, K. Kidney preservation with UW solution: The nature of the impermeant. Transplantation 51(5): 982-986, 1991b.
53. MARUMO, F.; MASAKI, Y.; IDA, T.; SATO, K.; ANDO, K. Prolongation of the kidney preservation period by simple cold storage up to 72 hours by human atrial natriuretic peptide. Transplantation Proceedings 22(5): 2131-2132, 1990.
54. McANULTY, J.F.; VREUGDENHIL, P.K.; LINDELL, S.; SOUTHARD, J.H.; BELZER, F.O. Successful 7-day perfusion preservation of the canine kidney. Transplantation Proceedings 25(1): 1642-1644, 1993.
55. MEL, T.; FULLER, B.J.; HOBBS, K.E.F. University of Wisconsin solution without lactobionate and raffinose. Protection of metabolism in cold-stored kidneys. Transplantation, 50(5): 906-908, 1990.

56. *MORGAN,D.B.* Assessment of renal tubular function and damage and their clinical significance. Ann. Clin. Biochem. 19: 307-313, 1992.
57. *MORGAN,H.E.; HENDERSON,M.J.; REGEN,D.M.; PARK,C.R.* Regulation of glucose uptake in muscle. J.Biol.Chem.,236-253, 1961.
58. *MOUKARZEL,M.; BENOTT,G.; BENSADOUN,H.; HIESSE, C.; RICHARD,C.; BITTARD,H.; DEPRET,J.; VERDELLI, G. CHARPENTIER,B.; FRIES,D.; JARDIN,A.* Nonrandomized comparative study between University of Wisconsin cold storage and Euro-Collins solution in kidney preservation. Transplantation Proc., 22(5): 2289-2290,1990.
59. *NEELY,J.R.; LIEBERMEISTER,H.; BATTERSBY,E.J.; MORGAN,H.E.* Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart. Am. J. Physiol., 212,; 804, 1967.

60. NISHIITSUTSUJI-UWO, J.M.; ROSS, B.D.; KREBS, H.A. Metabolic activities of the isolated perfused rat kidney. Biochem. J., 103: 852, 1967.
61. NORLEN, B.J.; ENGBERG, A.; KALLSKOG, O.; WOLGAST, M. Intrarenal hemodynamics in the transplanted rat kidneys Kidney, Int., 14: 10, 1978a.
62. 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. Tese de Mestrado na Área de Biologia Molecular apresentada na Escola Paulista de Medicina, 1987.
63. OPERLZ, G. & TERASAKI, P.I. Kidney preservation: perfusion versus cold storage. Transplantation Proc., 8(1): 121-125, 1976.

64. PARROTT,N.R.; FORSYTHE,J.L.R.; MATTHEWS,J.N.S.;
LENNARD,T.W.J.; RIGG,K.M.; PROUD,G.;
TAYLOR,R.M.S. Late perfusion: a simple remedy for renal
allograft primary non-function. Transplantation, 49: 913-
915, 1990.
65. PEGG,D.E. The water and cation content of nonmetabolizing
perfused rabbit kidneys. Cryobiology, 14: 160-167, 1977.
66. PIRIE, S.C. & POTTS, D.S. A comparison of the relative
effectiveness of three transplant preservation fluids upon
the integrity and function of rabbit proximal convoluted
tubules perfused in vitro. Clinical Science, 70: 443-452,
1986.
67. PLOEG,R.J.; GOOSSEENS,D.; McANULTY,J.F.;SOUTHARD,
J.H.; BELZER,F.O. Succesfull 72-hour cold storage of dog
kidneys with UW solution. Transplantation, 46(2): 191-196,
1988.

68. PLOEG,R.J. Kidney preservation with UW and Euro-Collins solutions. Transplantation, 49(2): 281-284, 1990.
69. POMPEU,A.R.; PANDOSSIO,J.E.; FIGUEIREDO,J.F.; FALKENSTEIN,D. Phagocytic activity and superoxide production by mouse peritoneal macrophages in culture preserved in renal solutions used for kidney transplantation (Tx). Anais do XIIth International Congress of Nephrology, page 158, Jerusalem, June 13-18, 1993a.
70. POMPEU,A.R.; PANDOSSIO,J.E.; FIGUEIREDO,J.F.; FALKENSTEIN,D. Atividade fagocitária e liberação de superóxido de macrófagos peritoneais de camundongo em cultura conservados nas soluções de Collins, Euro-Collins e Universidade de Wisconsin por 1 e 24 horas. Anais da VIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, pág. 216, Caxambú, 25-28 agosto, 1993b.

71. POMPEU, A.R.. Efeito das soluções conservadoras renais e da hipotermia sobre a atividade fagocitária e liberação de superóxido de macrófagos peritoniais de camundongos, em cultura. Tese de Mestrado na Área de Fisiologia e Biofísica apresentada na Universidade Estadual de Campinas, 1993c.
72. RIBEIRO, C.A.L.; FIGUEIREDO, J.F.; FALKENSTEIN, D. Avaliação da função in vitro de túbulos coletores corticais isolados e incubados nas soluções de Euro-Collins e Universidade de Wisconsin em câmaras especiais de conservação. Anais da VII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, pág. 109, Caxambú, 26-29 agosto, 1992.
73. RIBEIRO, C.A.L.; FIGUEIREDO, J.F.; FALKENSTEIN, D. Aspects of in vitro isolated cortical collecting ducts incubated in Euro-Collins (EC) and University of Wisconsin (UW) solutions. Anais do XIIth International Congress of Nephrology, page 157, Jerusalem, June 13-18, 1993.

74. RIBEIRO,C.A.L.; FALKENSTEIN,D.; FIGUEIREDO,J.F. Effect of several electrolyte preservation solutions on the water permeability of isolated cortical collecting ducts perfused *in vitro*. Cryobiology, 31, 272-278, 1994. (*in press*).
75. RIJHMANS,B.G.; VAN DER WIJK,J.; DONKER,J.M.; SLOOFF,J.H.; KOOTSTRA,G. Functional studies in 6 days successful preserved canine kidneys. The Journal of Urology, 127: 163-166, 1982.
76. ROHR, M.S. Renal allograft acute tubular necrosis II. A light and electron microscopic study of biopsies taken at procurement and after revascularization. Ann. Surg., 197(6): 663-671, 1983.
77. ROSS,H.; MARSHALL,V.C.; ESCOTT,M.L. 72-hour canine kidney preservation without continuous perfusion. Transplantation,21(6): 498-501, 1976.

78. RÖTH,E.; TÓTH,I.; TÖRÖK,B. Histological features of stored kidneys after simple hypotermic perfusion solution of different types. Inter. Urol. Nephrol., 6: 243-251, 1974.
79. SACKS,S.A. ; PETRITSCH,P.H. & KAUFMAN,J.J. Canine kidney preservation using a new perfusate. Lancet, 12 1024-1028, 1973.
80. SACKS,S.A.; WOO,Y.C.; SMITH,R.B.; EHRLICH,R.M.; KAUFMAN,J.J. Magnesium: not essencial for renal preservation by initial perfusion and hipothermic storage. Transplantation Proc., 10(1): 287-291, 1978.
81. SCHLUMPF,R.; MOREL,P.; LOVERAS,J.J.; CONDIE,R.M.; MATAS,A.; KURLE,J.; NAJARIAN,J.S.;SOUTHERLAN, D.E.R. Examination of the role of the colloids hydroxiethylstarch, dextran, human albumin, and plasma protein in a modified UW solution. Transplantation Proc.,23(5): 2362-2365, 1991.

82. SCHWEIZER, R.T. & SUTPHIN, B.A. Effect of different magnesium level in kidney preservation perfusate. Transplantation, 34(4): 225-226, 1982.
83. SEGAL, N.B. & GUTTMAN, E.M. Rabbit kidney function in vitro: the effect of colloids, energy substrate, a vasodilator perfusion pressure, and bovine serum albumin. Cryobiology, 20: 527-541, 1983.
84. SILVA, L.A.C.V.; FALKENSTEIN, D.; FIGUEIREDO, J.F. Estudo da eficiência da solução da Universidade de Wisconsin (UW) na conservação de pars recta através da técnica de microperfusão isolada *in vitro*. Anais da VII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, pág. 108, Caxambú, 26-29 agosto, 1992.
85. SILVA, L.A.C.V.; RIBEIRO, C.A.L. FALKENSTEIN, D.; FIGUEIREDO, J.F. The direct effect over the pars recta preserved in microchambers with electrolites flushing solution used in kidney preservation. Anais do XIIth International Congress of Nephrology, page 158, Jerusalem, June 13-18, 1993.

86. SIMÕES, J.D.; LIMA, C.C.; MOURA, L.A.R.; SIGULEM, D.; FIGUEIREDO, J.F. Avaliação funcional e morfológica de rins de rato submetidos a diferentes soluções preservadoras pela técnica de perfusão isolada 'in vitro'. An. Acad. Brasil. Ciênc. 56(1): 103-104, 1984a.
87. SIMÕES, J.D.; SIGULEM, D.; AJZEN, H.; FIGUEIREDO, J.F.
Functional behavior of the isolated rat kidney submitted to different renal preservation solutions. Kidney Int., 26: 634, 1984b.
88. SOUTHARD, J.H.; SENZIG, K.A.; HOFFMANN, R.; BELZER, F.O. Denaturation of albumin: a critical factor in long-term kidney preservation. J. Surg. Research, 30: 80-85, 1981.
89. TAKANO, T.; SOLTOFF, S.P.; MURDAUGH, S.; MANDEL, L.J.
Intracellular respiratory dysfunction and cell injury in short-term anoxia of rabbit renal proximal tubules. J. Clin. Invest., 76: 2377-2384, 1985.

90. TOLEDO-PEREYRA, L.M.; CONDIE, R.M. Comparison of Sacks and a new colloid hyperosmolar solution for hypothermic renal storage. Transplantation, 25(3): 166-168, 1978.
91. UEDA, Y.; TODO, S.; IMVENTARZA, O.; FURUKAWA, H.; WU, Y.M.; OGUMA, S. & STARZL, T.E. The UW solution for canine preservation. Its specific effect on renal hemodynamics and microvasculature. Transplantation, 48(6): 913-918, 1989.
92. ZAGER, R.A.; ALTSCHULD, R. Body temperature: an importante determinant of severity of ischemic renal injury. Am. J. Physiol. 251(20): F87-F93, 1986.