



Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Carla Andréa de Lima
Ribeiro
é aprovada pela Comissão Julgadora
Campinas, 21/08/92.

Doris Falkenstein

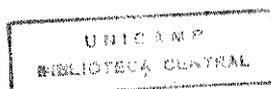
ESTUDO DO EFEITO DAS SOLUÇÕES CONSERVADORAS
DE COLLINS, EURO-COLLINS E UNIVERSIDADE DE WISCONSIN
SOBRE A PERMEABILIDADE À ÁGUA DE TÚBULOS COLETORES
CORTICAIS DE COELHO "IN VITRO"

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

ORIENTADORA: Dra. Doris Falkenstein

Campinas - São Paulo

1992



26032226

ERRATA

1. Página 27, tabela "Composição das Soluções Conservadoras"

Onde se lê: pH das Solução da Universidade de Wisconsin = 7,0

Leia-se: 7,4

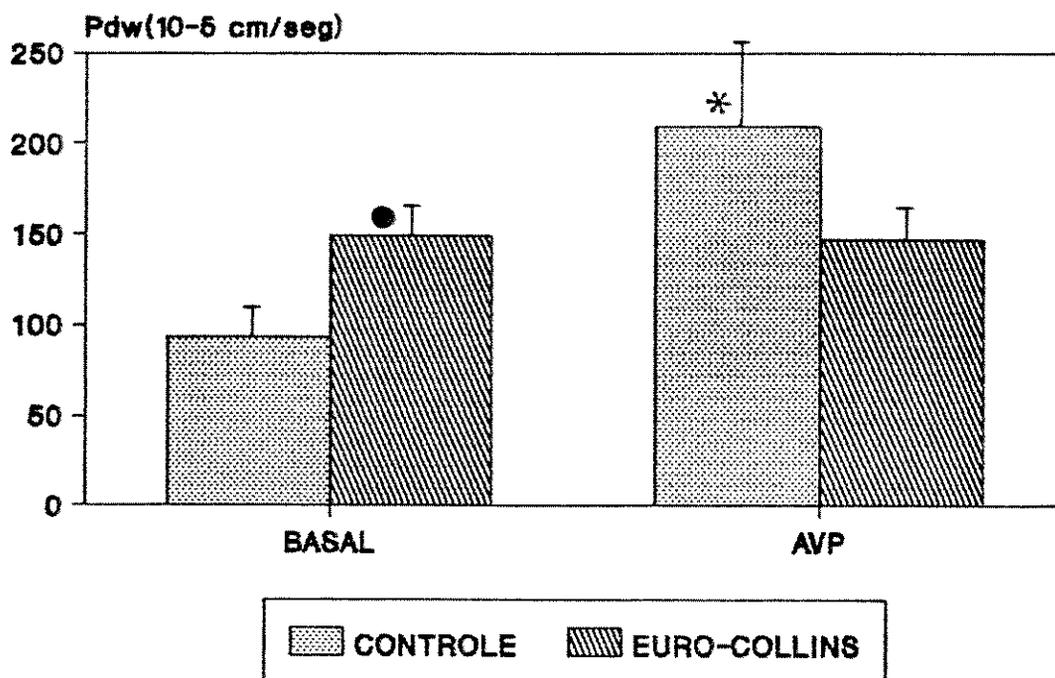
2. Página 58, linha 2

Onde se lê: ...nenhum dos valores encontrados difere

Leia-se: ...nenhum dos valores, exceto aqueles encontrados no grupo con-
servado em Euro-Collins durante 24 horas, difere

3. Página 61, figura 12

O valor da Pdw no período AVP do grupo controle foi de 209,1 e não de
148, como está no gráfico. A figura correta é a que segue:



*Aprendamos a sonhar, senhores,
e então, pode ser
que encontremos a verdade.*

Kekulé

A minha família,

por terem feito de mim o que sou

Ao Robson,

pelo amor e por fazer tudo valer

Agradecimentos Especiais

Dra Doris Falkenstein,

*pela orientação, pelos ensinamentos, pela convivência,
pela formação, enfim, por tudo.*

Dr. J.F. Figueiredo,

*por me honrar com sua sabedoria e experiência e pela
colaboração.*

Andréa R. Pompeu,

*pela amizade e carinho e por me dar a honra de sua
confiança.*

Aos Professores do Depto de Fisiologia e Biofísica,

*pela transmissão dos conhecimentos necessários para minha
formação e pela oportunidade de realizar este trabalho.*

*Aos amigos do N.M.C.E., aos colegas da Pós-Graduação e a todos
aqueles que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização
deste trabalho.*

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

ÍNDICE

| | |
|----------------------------------|----|
| INTRODUÇÃO | 1 |
| OBJETIVO | 15 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 16 |
| RESULTADOS | 29 |
| DISCUSSÃO | 63 |
| SUMÁRIO E CONCLUSÕES | 76 |
| SUMMARY | 79 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 81 |

INTRODUÇÃO

Ter a capacidade de estocar órgãos inteiros é uma velha ambição do homem. Nos últimos anos, com o crescimento da prática do transplante de órgãos no tratamento do estágio terminal de doenças renais, a realização dessa ambição se tornou imperativa. No campo dos transplantes de órgãos, é, certamente, o transplante renal que tem alcançado o maior sucesso.

Um dos principais obstáculos no sucesso do reimplante renal é a obtenção de órgãos viáveis e que sejam compatíveis imunologicamente com o receptor. Com o advento do transplante renal de cadáver e a troca de órgãos entre os centros transplantadores, métodos relativamente efetivos de conservação e transporte de rins têm sido estabelecidos, embora de forma controversa. Assim, um rim de cadáver, antes de ser reimplantado, passa por uma fase intermediária de conservação a frio. Em geral, a conservação renal a longo prazo proporciona tempo para uma boa preparação do receptor e da equipe cirúrgica, além da execução dos testes de histocompatibilidade e intercâmbio regional do órgão.

Atualmente, existem dois métodos de conservação renal. A escolha do melhor método é controversa, uma vez que cada um difere tecnicamente do outro (CLARK et al., 1973; ROTH et al., 1974). Um

doles consiste na perfusão contínua do rim com um perfusato semelhante ao plasma (BELZER et al., 1967). A perfusão é feita por uma bomba pulsátil e o perfusato é hipotérmico e contém crioprecipitados protéicos sem atividade antigênica. Esse método demonstrou bons resultados com rins conservados por longos períodos de tempo (até 72 horas) (BELZER et al., 1967). Todavia essa técnica exige uma aparelhagem bastante complexa, além de pessoal especializado no seu manuseio, o que a torna mais complicada e dispendiosa (MARSHALL, 1980). Assim, COLLINS e col (1969) introduziram um segundo método no qual o órgão, após uma rápida perfusão, é armazenado a frio em soluções iônicas com propriedades conservadoras. Esse método tem sido preferido pela maioria dos centros transplantadores, devido ao seu baixo custo e à facilidade de confecção das soluções conservadoras (MARSHALL, 1980). Além disso, essa técnica forneceu resultados tão bons quanto aqueles obtidos com a perfusão contínua (COLLINS & HALASZ, 1975; AGUILO et al., 1975; ROSS et al., 1976; OPELZ & TERASAKI, 1976). Mas, qualquer que seja o método usado para a conservação, o critério de sucesso no transplante é o funcionamento do rim imediatamente após o reimplante, com as estruturas renais bem conservadas.

O rim é um órgão de alto consumo de oxigênio pois é altamente vascularizado e possui um grande número de bombas (ATPases), o que torna difícil sua conservação à temperatura corporal. Porém, em baixas temperaturas, a atividade glomerular e das bombas e, conseqüentemente, o consumo de oxigênio diminui (MARTIN et al., 1972; ACQUATELLA et al., 1972) bastante.

Porém, a hipotermia pode causar efeitos deletérios sobre as células renais. Geralmente, o rim armazenado a frio, além de estar em estado de hipotermia, também se encontra em hipóxia. Nessas

condições, não há oxigênio e, portanto, não há produção de ligações fosfato de alta energia. Isto significa que todas as bombas dependentes de fosfato (ATP-ases) devem estar inibidas ou com taxa reduzida de função, com a subsequente alteração (despolarização) do potencial de membrana. Além disso, a própria hipotermia leva a uma diminuição na atividade das bombas Na-K-ATPase e Ca-ATPase. Isto pode resultar num aumento intracelular de sódio, seguido da água, cálcio e cloreto e num aumento do efluxo de potássio e magnésio. Como consequência, a célula perde sua capacidade de regular seu volume e começa a inchar. (JOHNSON, 1972; ACQUATELLA et al., 1972; COFFEY & ANDREWS, 1983; BELZER & SOUTHARD, 1986; PIRIE & POTTS, 1986)

A isquemia, freqüente na hipotermia, estimula a glicólise e a glicogenólise para a produção de energia. Essa via, menos efetiva que a via aeróbica, aumenta a produção de ácido láctico, com subsequente aumento na concentração de íons hidrogênio. A acidose do tecido pode prejudicar as células e induzir à instabilidade lisossomal, por ativar enzimas lisossomais. Além disso, sob condições de acidose metabólica, os túbulos renais produzem amônia, a qual é livremente difusível através da membrana celular e, em altos níveis, tem efeito tóxico direto sobre o rim (JAMART & LAMBOTTE, 1982). Outra consequência da isquemia é que a hipóxia decorrente leva a um acúmulo excessivo de íons cálcio no interior celular, o que pode induzir a alterações nas propriedades mitocondriais. Em condições fisiológicas de oxigênio, o conteúdo de cálcio mitocondrial é mantido em equilíbrio, porque a taxa de influxo celular passivo de cálcio é igual à taxa de extrusão, provavelmente através da Ca-ATPase. Esse balanço é mantido mesmo durante uma pequena hipóxia. Severa hipóxia, no entanto, parece desordenar esse balanço muito provavelmente devido à limitada capacidade de a mitocôndria produzir ATP sob essas

condições (TAKANO et al., 1985). Além disso, sabe-se que a isquemia tecidual seguida por reperfusão com sangue oxigenado, ocorre em um grande número de situações clínicas, inclusive no transplante de órgãos. Tal reoxigenação poderia causar um *stress* oxidante, o qual contribuiria para a lesão do tecido, por exercer um efeito tóxico sobre proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos e outros constituintes celulares (McCOY et al., 1988).

Considerando-se todos esses fatores, foram desenvolvidas várias soluções conservadoras de composição iônica, imitando o meio intracelular, ao invés de se assemelharem ao meio extracelular. A razão original para se usar uma solução do tipo "intracelular" foi a suposição de que ela poderia minimizar a troca de íons através das membranas celulares e, assim, desacelerar o processo do aumento de volume celular decorrente da conservação hipotérmica. Dessa forma, COLLINS e col (1969, 1984b) aumentaram o tempo de conservação de 12 para 30 horas, utilizando um fluido rico em potássio e magnésio, e pobre em sódio, além de utilizar glicose como soluto osmoticamente ativo, na tentativa de inibir o aumento do volume celular. Para reduzir a acidose intracelular, a solução possuía ânions fosfato e bicarbonato, os quais funcionariam como tampões.

A partir daí, conservando os princípios básicos da solução de Collins, ACQUATELLA e col (1972) conseguiram uma redução maior no processo de aumento do volume celular, usando um fluido sem magnésio, cloreto e fosfato e com concentrações aumentadas de glicose e potásio. SACKS e PETRITSCH (1973) substituíram glicose por manitol, alegando que esse soluto é um potente agente osmótico, permanece no espaço extracelular, não é metabolizado e possui pouco efeito tóxico para o rim. Além disso, substituíram o ânion sulfato por fosfato e demonstraram sucesso na conservação de rins de cães por 72 horas.

Embora o transplante renal tenha se tornado uma rotina clínica, a procura por perfusatos de composição apropriada e por técnicas ideais de conservação ainda continua, como é demonstrado pelo grande número de experimentos realizados nas últimas décadas (ACQUATELLA et al., 1972; SACKS & PETRITSCH, 1973; DOWNES et al., 1973; ROTH et al., 1974; AGUILO et al., 1975; ROSS et al., 1976; OPELZ & TERASAKI, 1976; HALASZ & COLLINS, 1976; DAHLAGER & BILDE, 1976; PEGG, 1977; TOLEDO-PEREYRA & CONDIE, 1978; JABLONSKI et al., 1980; DREIKORN et al., 1980; BELZER et al., 1982; BENNETT et al., 1982; HOFFMANN et al., 1983; SEGAL & GUTTMAN, 1983; BESARAB et al., 1984; COLLINS et al., 1984^a; COLLINS et al., 1984^b; BRY et al., 1984; BELZER & SOUTHARD, 1988; LODGE et al., 1991). Os resultados experimentais e clínicos obtidos com os vários perfusatos de diferentes composições (hiperosmolar - intracelular, hiperosmolar - extracelular, com ou sem aditivos de magnésio, colóides, procraina, fenoxibenzamina e heparina) são contraditórios e mesmo inconsistentes, o que torna ainda mais complicado decidir-se qual das soluções seria a melhor.

A questão do magnésio parece ser, dentre todas, a mais controversa. O valor do sulfato de magnésio na composição das soluções conservadoras ainda permanece muito discutido. Enquanto muitos pesquisadores defendem a noção de que o magnésio é um componente indispensável, outros têm questionado seu valor e outros, ainda, têm condenado sua inclusão nos fluidos de conservação. Os argumentos teóricos para sua presença incluem sua ação potencial como inibidor metabólico, vasodilatador e preservador da concentração intracelular de potássio, bem como sua habilidade de inibir o efeito da rigidez da membrana, causada pelo cálcio ligado à mesma. Sabe-se bem que o magnésio é parte integrante de muitos sistemas enzimáticos

intracelulares. Certas ATPases, em particular, são dependentes do magnésio e o próprio ATP atua como um quelante de magnésio. Além disso, o magnésio tem sido considerado um preservador do potencial transmembrana. Sugeriu-se, inclusive, que o efeito protetor do sulfato de magnésio nas soluções do tipo "intracelular" deve residir na relativa impermeabilidade dos íons sulfato e magnésio às células tubulares do rim; portanto, como sacarose ou glicose, eles inibiriam o aumento de volume celular. Demonstrou-se, também, que a administração de ATP combinado com cloreto de magnésio restaura os níveis de ATP teciduais após a isquemia (SACKS et al., 1978; SIEGEL et al., 1980; SCHWEIZER & SUTPHIN, 1982; COLLINS et al., 1984a).

A despeito das muitas virtudes teóricas do magnésio, o comportamento físico dessa substância nas soluções intracelulares a frio tem sido uma constante fonte de frustração, devido à formação de cristais de fosfato de magnésio. A quantidade de precipitado parece ser proporcional à concentração de íons magnésio (SACKS et al., 1978; COLLINS et al., 1984a). Esses cristais de magnésio precipitados poderiam levar à lesão da membrana celular durante a conservação. Além disso, sucessos na conservação de rins com soluções sem magnésio mostraram que a presença desse íon não é necessária (SACKS et al., 1978; DREIKORN et al., 1980; JAMART & LAMBOTTE, 1983; SHWEIZER & SUTPHIN, 1982).

Assim, devido ao risco de formação de precipitado e à falta de convicção quanto ao valor do íon magnésio, decidiu-se, em 1976, pelo uso de apenas uma solução na maioria dos centros transplantadores europeus (DREIKORN et al., 1980). Tal solução, denominada Euro-Collins, é uma variante da solução de Collins, na qual o sulfato de magnésio foi substituído por uma quantidade equivalente de glicose (COLLINS et al., 1984a). Estudos com essa

solução demonstraram que a mesma poderia conservar rins de cães de 72 a 96 horas e rins humanos por mais de 50 horas, com taxas de necrose tubular aguda inferiores a 20% (COLLINS et al., 1984a).

Logo que o rim é removido do sistema circulatório, a homeostase metabólica do órgão é interrompida. Entretanto, o mesmo continua a realizar vários processos metabólicos, devido à sua alta atividade ATPásica. A idéia de suprimir toda a atividade metabólica pelo abaixamento da temperatura do rim parece, teoricamente, uma maneira possível de prevenir-se mudanças progressivas na organização estrutural e funcional desse órgão. Porém, trabalhos anteriores mostraram que a hipotermia não pára o metabolismo, apenas retarda as taxas de reações enzimáticas e a morte celular (BURG e ORLOFF, 1964; BELZER & SOUTHARD, 1980; BELZER & SOUTHARD, 1988).

Dentre os eventos patológicos relacionados com a conservação hipotérmica, incluem-se a depleção de estoques celulares de nucleotídeos de adenosina, o acúmulo de metabólitos, a autólise por liberação de enzimas lisossomais, a prejuízo às membranas celulares com perda dos fosfolípidos contituíntes e a lesão vascular que resulta em edema, perda de proteínas e vazamento de células sanguíneas para o compartimento extravascular (BELZER & SOUTHARD, 1980; TAKANO et al., 1985; GREEN et al., 1986).

O acúmulo de metabólitos tóxicos é um problema potencial na conservação a longo prazo. Além dos íons H^+ , a formação de radicais livres de oxigênio (superóxidos, radicais de hidroxilas, peróxidos de lipídios) podem exercer efeitos prejudiciais sobre as funções ligadas às membranas celulares e mitocondriais. As membranas biológicas contêm ácidos graxos poliinsaturados que são altamente susceptíveis à peroxidação. Pode-se evitar a lesão oxidativa com o uso de substâncias que atuariam como seqüestradores de radicais livres

(BELZER & SOUTHARD, 1980; FREEMAN & CRAPO, 1982, BRY et al., 1984; GREEN et al, 1986).

Levando-se em conta esses fatores, uma apropriada e efetiva conservação a frio do órgão deve levar em consideração quatro princípios básicos (PLOEG et al., 1988):

- 1 - a perfusão com as soluções conservadoras e o fluxo vascular durante a coleta do órgão devem rapidamente resfriar o mesmo, remover-lhe o sangue e permitir o equilíbrio entre a solução de conservação fria e o tecido;
- 2 - a solução conservadora deve prevenir o aumento do volume celular, pela inclusão de substâncias osmoticamente ativas e impermeáveis à célula;
- 3 - a solução conservadora deve prevenir a acidose intracelular, por conter uma concentração suficiente de agentes tamponantes;
- 4 - a solução deve reduzir o gradiente de concentração entre o meio intra e extracelular, para reduzir o ganho ou perda de íons.

Além disso, tal solução deve prevenir a lesão causada por radicais livres de oxigênio e proporcionar substratos para a regeneração de compostos fosfatados de alta energia durante a reperusão (BELZER & SOUTHARD, 1988).

Recentemente, alguns laboratórios iniciaram estudos bioquímicos e fisiológicos sistemáticos do efeito da hipotermia sobre a célula renal. A partir desses estudos, foi lançada uma nova solução conservadora, denominada solução da Universidade de Wisconsin (UW). Essa nova solução foi desenvolvida pelo grupo de Belzer e col (BELZER & SOUTHARD, 1988; PLOEG et al., 1988) e, segundo os autores, pode

conservar um rim por 72 horas. Além do mais, a solução se mostrou efetiva na conservação de outros órgãos intra-abdominais, como fígado, pâncreas e coração, fazendo parte das chamadas soluções de terceira geração.

A solução de Wisconsin possui, em sua composição, potássio e magnésio. Porém, é uma solução muito mais elaborada do que as outras existentes. A concentração de potássio foi aumentada, o que permite a manutenção de concentrações normais de potássio intracelular, mesmo em face da diminuição da atividade da bomba. Para prevenir o aumento do volume celular, a glicose foi substituída por lactobionato de potássio, sendo-lhe ainda adicionada rafinose, para um suporte osmótico complementar. Hidroxietil amido, um colóide estável e não tóxico, foi também adicionado, para prevenir a expansão do espaço extracelular e o colapso vascular. A solução contém ainda glutathione (um componente essencial na redução de agentes citotóxicos como H_2O_2 , peróxidos de lipídios e radicais livres) e alopurinol, que inibe a xantina-oxidase e a geração de radicais livres de oxigênio.

Vários estudos científicos mostram um efeito protetor do alopurinol contra a lesão renal induzida pela isquemia, provavelmente pela inibição da produção de radicais superóxidos (PARKS et al., 1983). Além disso, a glutathione foi utilizada para substituir os íons cloreto, uma vez que possui um peso molecular maior que o desses íons, sendo, assim, muito menos permeável e auxiliando, conseqüentemente, na prevenção do aumento do volume celular. (BELZER et al., 1982).

Uma combinação de altas concentrações de fosfato e adenosina na solução previne a perda de ligações fosfato de alta energia e estimula a síntese de ATP após a reperfusão (FERNANDO et al., 1976; FERNANDO et al., 1977; SIEGEL et al., 1980; BELZER et

al., 1983; BELZER & SOUTHARD, 1986; BELZER & SOUTHARD, 1988). Demonstrou-se que a adenosina, no perfusato, estimula a síntese de ATP em rins conservados hipotermicamente (SOUTHARD et al., 1985; TAKANO et al., 1985; SUMPPIO et al., 1987). Além disso, a integridade funcional e estrutural da mitocôndria pode ser preservada por níveis intramitocondriais de nucleotídeos de adenosina (SOUTHARD et al., 1977). Nenhum cálcio foi adicionado ao fluido, devido ao influxo ou aumento intracelular desses íons, que ocorre durante a hipotermia (BELZER & SOUTHARD, 1986; BELZER & SOUTHARD, 1988).

A partir daí, vários estudos foram desenvolvidos para a verificação clínica e experimental da eficácia desta solução. Estudos experimentais em rins de cães revelaram sucesso na conservação com essa solução por 72 horas (PLOEG, 1988). Estudos clínicos também demonstraram que a solução UW produziu resultados melhores na conservação de rins para transplante, quando comparada com a solução de Euro-Collins, reduzindo, inclusive, a porcentagem de necrose tubular aguda pós-transplante e a taxa de diálise pós-operatória (PLOEG, 1990; MOUKARZEL et al., 1990; PORTEOUS et al., 1991).

Embora a solução de Wisconsin tenha se mostrado altamente eficiente na conservação de vários órgãos intra-abdominais, ela é uma solução cara e de difícil preparo, o que torna o seu uso dispendioso. Dessa maneira, estudos têm sido realizados para investigar a possibilidade de se modificar essa solução, com a intenção de simplificá-la, de modo que possa ser facilmente formulada para uso de rotina no transplante. Assim, MEL e col (1990) substituíram rafinose por manitol e lactobionato por citrato de potássio (que são ingredientes químicos mais facilmente disponíveis, além de propiciarem benefícios adicionais tais como uma capacidade aumentada de tamponamento e quelação de cátions divalentes) e conseguiram uma

melhora na função metabólica em rins de ratos imediatamente após o período de estoque e MARSHALL e col (1990; 1991) substituíram lactobionato por gluconato e rafinose por sacarose ou por lactobionato extra e obtiveram sucesso na preservação de rins de rato por 48 horas e rins de cães por 3 dias. Esses resultados indicam que rafinose e lactobionato podem não ser essenciais para a conservação da função, quando se usa UW para conservar o rim a frio.

O hidroxietil amido é um componente caro e sua importância na solução de Wisconsin, bastante questionada. Tem-se demonstrado que esse componente pode ser omitido na solução UW, sem qualquer prejuízo na preservação de rins de rato (MARSHALL et al., 1990) e cães (MARSHALL et al., 1991; SCHLUMPF et al., 1991).

Porém, ainda existem algumas dúvidas quanto à eficiência dessa nova solução. Alguns pesquisadores relatam melhoria na função de fígados conservados em solução de UW, quando comparados àqueles conservados em Euro-Collins (COFER et al., 1990). Outros, no entanto, não encontraram diferenças nas funções desses órgãos conservados em UW, em relação àqueles conservados em Euro-Collins (OLTHOFF et al., 1990). Na conservação renal, os resultados dos estudos ainda são contraditórios (LODGE et al., 1991; HEFTY et al., 1991).

Embora as soluções conservadoras do tipo intracelular sejam amplamente utilizadas na conservação de rins de cadáver, persistem as incertezas básicas quanto ao seu preciso modo de ação. Apesar do avanço nos estudos bioquímicos e fisiológicos da conservação de rins para transplante, a maioria dos estudos ainda são feitos em órgãos inteiros, avaliando-se o "clearance" global e muito pouco se sabe dos efeitos diretos dessas soluções conservadoras sobre as células tubulares. Estudos das células tubulares renais podem ser usados como

uma amostra celular para danos generalizados, com a vantagem de que pequenos graus de danos podem ser detectados (MORGAN, 1982).

Existem poucos estudos de função ou lesão tubular pós-conservação. Alguns deles foram desenvolvidos por FALKENSTEIN e col (1982), FALKENSTEIN (1984, 1990), FIGUEIREDO e col (1986), PIRIE e POTTS (1985, 1986), OISHI (1987), RIBEIRO et al. (1987); HELOU (1988) e SILVA (1991), nos quais a função de túbulos proximais de coelho e ductos coletores de rato ou coelho foi medida, através da técnica de microperfusão de túbulo isolado *in vitro* ou de estudos enzimáticos de fragmentos renais após a preservação com diferentes soluções conservadoras. No entanto, ainda se faz necessário estudar outros segmentos, uma vez que há uma diversidade muito grande de tipos e funções celulares ao longo do néfron.

O túbulo coletor raramente é estudado na prática clínica e, quando isto é feito, as duas funções testadas são a secreção de íon hidrogênio e a reabsorção de água. Nosso interesse tem sido a reabsorção de água, sendo que a falha dessa função, naturalmente, levará à poliúria, o que pode gerar um desbalanço hídrico no organismo. Alguns estudos pioneiros foram realizados neste laboratório onde se testou a função de túbulos coletores corticais de coelho, após manobras de conservação aguda com diversas soluções preservadoras (FALKENSTEIN, 1990).

Nas primeiras horas após o transplante, pode ocorrer uma poliúria, a qual necessita de atenção e cuidado para se prevenir sérios desarranjos no balanço hidro-eletrolítico do paciente. Os mecanismos dessa poliúria ainda não foram elucidados. Diversos possíveis mecanismos foram propostos, tais como super-expansão pré-operatória do volume extracelular, alteração da hemodinâmica renal, quebra do gradiente de concentração medular, diurese osmótica

de uréia ou natriurese de desnervação. Outra possibilidade é um sistema de transporte tubular de sódio anormal, em consequência da lesão mecânica, isquêmica ou anóxica no rim transplantado (SIMÕES et al., 1984). Um outro possível mecanismo ligado a essa poliúria pós-transplante também poderia estar relacionado a defeitos na função de reabsorção de água à nível do túbulo coletor (HENDERSON et. al., 1968).

Até os anos 50, pensava-se que o túbulo coletor não possuía função especializada, exceto a de servir como um conduto para o fluido tubular (SMITH, 1951). O desenvolvimento da técnica de túbulo isolado e perfundido *in vitro* (BURG et al., 1966), e da aplicação da microscopia de varredura e de transmissão no estudo do tecido renal permitiu um grande avanço no conhecimento a respeito do sistema da função e morfologia dos ductos coletores.

O túbulo coletor é constituído por dois tipos celulares: as células principais e as intercaladas. Além disso, esse segmento apresenta um epitélio tipo "tight", isto é, suas células são unidas por complexos juncionais de baixa condutância elétrica (HELMAN, 1971; STONER, 1974; STOKES et al., 1978; MADSEN & TISHER, 1986).

Vários estudos demonstraram que o túbulo coletor exerce um papel decisivo na regulação da excreção de água e eletrólitos (FROMTER, 1988; BREYER, 1991). Esse segmento é capaz de reabsorver sódio, cloreto e água e secretar potássio. Pode, ainda, absorver ou secretar HCO_3^- dependendo do estado de acidose ou alcalose do organismo. As células principais estão envolvidas, principalmente, no transporte de sódio e potássio e as células intercaladas podem estar envolvidas no transporte $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ (MOREL & DOUCET, 1986; FROMTER, 1988).

O transporte no túbulo coletor está sob complexas

influências multihormonais e neurais. Dentre os fatores que podem influenciar o transporte de eletrólitos nesse túbulo, incluem-se esteróides adrenais, vasopressina, cininas, prostaglandinas e agonistas β -adrenérgicos (TOMITA et al., 1985; MOREL & DOUCET, 1986; BREYER, 1991).

O epitélio do túbulo coletor é responsivo à vasopressina (hormônio antidiurético - HAD). Portanto, esse segmento exerce um papel importante na diluição e concentração urinária (MADSEN & TISHER, 1986; KOKKO, 1987). Na ausência de vasopressina, a permeabilidade à água da membrana apical é baixa, enquanto que a permeabilidade à água da membrana basolateral é alta. Em resposta à ação da vasopressina, canais de água são inseridos na membrana apical, para conferir alta permeabilidade à água nessa membrana e, assim, alta permeabilidade transepitelial (VERKMAN, 1989).

Levando-se em conta que os trabalhos sobre conservação renal ainda são inconsistentes e que poucos estudos têm levado em consideração o efeito da hipotermia e das soluções conservadoras sobre os diferentes segmentos do néfron e conhecendo-se todas essas características do túbulo coletor, resolvemos estudar o efeito das soluções conservadoras de Collins, Euro-Collins e da Universidade de Wisconsin, utilizadas no transplante renal, sobre a função de túbulos coletores corticais de coelho, através da técnica da microperfusão de túbulo isolado e perfundido *in vitro*.

OBJETIVO

A proposta deste trabalho foi investigar:

- o efeito do tempo de conservação a frio de fragmentos renais de coelho incubados em diversas soluções utilizadas no transplante renal clínico sobre a resposta hidrosmótica de túbulos coletores corticais;
- a função de túbulos coletores corticais isolados e conservados diretamente nessas soluções a 4°C.

Para a realização do trabalho, foi utilizada a técnica da microperfusão de túbulo isolado *in vitro*. O parâmetro funcional avaliado foi a condutividade hidráulica, obtida pela imposição de um gradiente osmótico entre o lado luminal e o lado peritubular dos túbulos. Em alguns casos, foi também avaliada a permeabilidade difusional à água.

As medidas de condutividade hidráulica e de permeabilidade difusional à água foram feitas pré e pós-estimulação com hormônio anti-diurético, pela adição de arginina-vasopressina no lado peritubular.

MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos dos efeitos da conservação hipotérmica com diversas soluções preservadoras sobre a resposta hidroosmótica de túbulos coletores foram desenvolvidos através da técnica da microperfusão de túbulos isolados *in vitro*, descrita por BURG e col. em 1966. Essa técnica consiste na dissecação de um dos segmentos do néfron a partir de um fragmento renal e na perfusão do mesmo por um sistema de micropipetas concêntricas.

Na preparação, coelhos brancos mestiços, pesando entre 1,0 a 2,5 kg (mantidos em dieta normal e com livre acesso à água), foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo retirado um de seus rins. Esse rim foi descapsulado e cortado sagitalmente em fragmentos de aproximadamente 1 mm de espessura. Tais fragmentos foram transferidos para uma placa de Petri pequena, contendo uma solução eletrolítica do tipo Ringer-Bicarbonato, mantida a 4 °C e é gaseificada com 5% de CO₂ e 95% de O₂.

Nessas condições, efetuou-se a dissecação tubular, separando-se, por meio de pinças de ponta fina de 30 µm de largura (A. Dumont & Fills, n°5 - Suíça), um túbulo coletor cortical dentro várias estrias cortico-justamedulares, com o auxílio de um microscópio estereoscópico com dispositivo "zoom" (Bausch & Lomb,

New York - USA), com aumentos variando entre 10-70 vezes.

Após a dissecação, o túbulo foi transferido, através de uma pipeta Pasteur modificada, para uma câmara especial de perfusão, consistindo de uma placa de acrílico com uma fenda no meio, vedada por uma lamínula de vidro, onde repousa o túbulo e o banho. Essa placa contém uma microresistência em seu interior, conectada a um regulador de temperatura (Yellow Springer, mod. 73 A, Ohio - USA), que mantém o banho aquecido a 37 °C. A câmara possui também pequenos orifícios para a entrada das conexões de gaseificação e de solução banhante e acha-se adaptada a um microscópio invertido (Reichert, Bio-Star, Austria) de alta magnitude (40-450 X), para a focalização do túbulo e das micropipetas.

Logo após a transferência do túbulo, este foi conectado, através de pressão negativa, a um sistema de micropipetas concêntricas, fixadas por encaixes de acrílico a micromanipuladores especiais (J. H. Emerson Co., Massachusetts - USA) que permitem a movimentação nos planos X,Y,Z. Uma das extremidades do túbulo foi aspirada dentro da pipeta suporte do lado perfusor, no interior da qual havia outra pipeta de menor diâmetro e de ponta fina (12-14 μ m), introduzida no centro do lúmen tubular. Essa pipeta foi previamente preenchida com um perfusato hipotônico, marcado com ¹⁴C-carboxi-Inulina (New England Nuclear, Massachusetts -USA).

Após a introdução da ponta da pipeta perfusora no lúmen tubular, iniciou-se a perfusão, por meio da pressão hidrostática produzida por uma coluna de água. Após a perfusão de toda a extensão tubular, conectou-se a outra extremidade do túbulo na pipeta suporte do lado coletor. A pipeta suporte coletora foi previamente preenchida com um óleo n-tetradecano hidrofóbico (Sigma Co., Missouri - USA), corado com Sudan Black (Merck, Alemanha), que permitia a visualização

da entrada da amostra perfundida na pipeta suporte. As extremidades do túbulo foram isoladas eletroquimicamente pela adição, na ponta das pipetas suportes, de uma pequena quantidade de resina de silicone, o óleo Sylgard 184 (Dow Corning, Michigan -USA). O sistema de microperfusão acha-se esquematizado na figura 1.

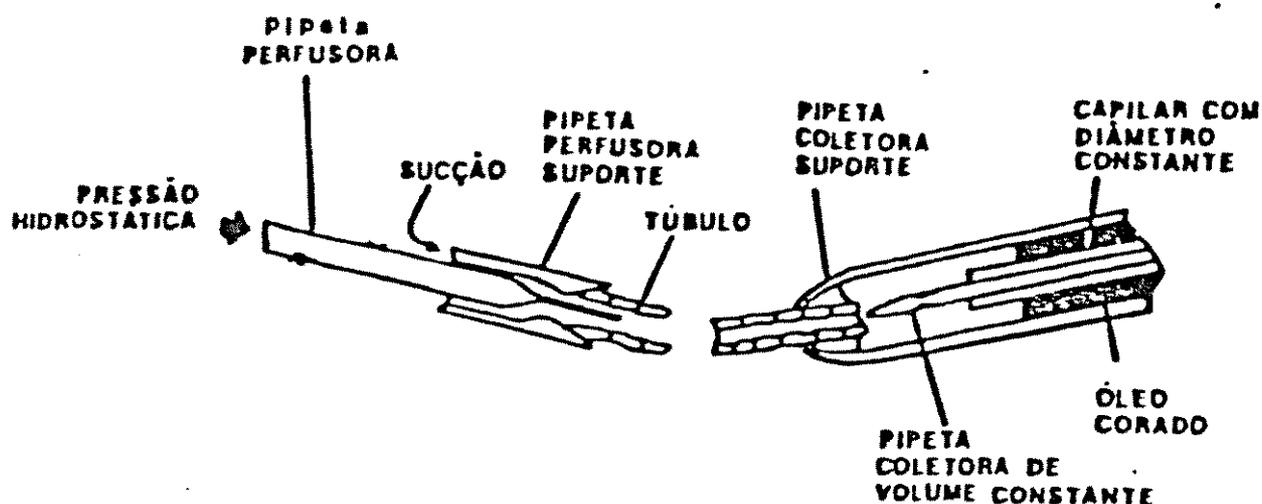


Figura 1. Esquema da Técnica de Microperfusão *in Vitro* de Segmentos

Logo após o início da perfusão, o banho foi aquecido a 37°C e gaseificado continuamente com 95% de O₂ e 5% de CO₂. A coleta das amostras perfundidas começou após um período de equilíbrio, que variou de 60 a 120 minutos após a morte do animal, sendo feita por uma pipeta coletora calibrada, de volume constante.

As soluções que banham o túbulo foram trocadas constantemente, a um fluxo de 0,3 nl/min, através de sua infusão contínua na câmara de perfusão, por meio de uma bomba de infusão (Harvard, mod. 975, Massachusetts - USA) e a sucção do meio por uma bomba de pressão negativa (Nevoni Ltda, São Paulo - Brasil). Em cada

período de coleta, foram obtidas amostra da solução banhante para a análise do vazamento do perfusato marcado com ^{14}C -carboxi-Inulina. Experimentos com vazamentos superiores a 5% do marcador de volume na amostra foram desprezados, pois indicavam lesão do epitélio tubular ou problemas técnicos da preparação. Trocas rápidas e com fluxo superior a 1 ml/min foram realizadas, quando houve necessidade de se mudar o tipo da solução banhante por outra de composição diferente.

Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente de 25°C.

Composição das Soluções Banhante e Perfusora:

Para dissecar e banhar o túbulo coletor cortical de coelho, utilizou-se uma solução de Ringer-Bicarbonato modificado com a seguinte composição (em mM): NaCl 105, NaHCO_3 25, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}_9$ 10, NaH_2PO_4 2,3, KCl 5, MgSO_4 1, CaCl_2 1,8, glicose 8,3 e alanina 5. A osmolalidade dessa solução foi de 286 ± 4 mOsmoles/kg H_2O , medida pelo ponto de congelamento em um osmômetro (Advanced mod. 3WII, Massachusetts - USA); o seu pH foi de 7,38, após a gaseificação com 95% de O_2 e 5% de CO_2 .

Nos estudos de condutividade hidráulica à água (Lp) utilizou-se um perfusato hipotônico com a mesma composição da solução banhante, com exceção do NaCl que foi diminuído para 15 mM. Esse perfusato apresentou uma osmolalidade de 126 ± 5 mOsmoles/kg H_2O e o pH de 7,38, sendo-lhe adicionado de 5 a 10 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{14}C -carboxi-Inulina (New England Nuclear, Massachusetts - USA), que serviu como marcador de volume para as medidas diretas de condutividade hidráulica. Nos estudos de permeabilidade difusional à

água (Pdv), adicionou-se NaCl ao perfusato, em quantidade suficiente para que não houvesse um gradiente osmótico entre o banho e o perfusato e 50 $\mu\text{Ci/ml}$ de água triciada (New England Nuclear, Massachussets - USA) para estudo direto do transporte de água.

A avaliação dos parâmetros funcionais de condutividade hidráulica ou permeabilidade difusional à água foi realizada através de amostras coletadas em um período basal (que serviu como controle da integridade da preparação) e no período de estimulação hormonal, após a adição de 200 $\mu\text{UI/ml}$, equivalente a concentração de 460 pM de arginina-vasopressina (Sigma Co., Missouri - USA) à solução banhante peritubular (ANDO, 1989). As amostras foram transferidas para 0,1 ml de água, completadas com 1 ml de líquido de cintilação Aquasol II e analisadas em um espectrofotômetro de cintilação Beta (Beckman, mod. LS-100C e LS-6000TA, Califórnia - USA).

Medidas de Condutividade Hidráulica:

A condutividade hidráulica ($L_p = 10^{-7} \text{cm/seg.atm}$) é a medida de permeabilidade à água de um epitélio, quando se impõe um gradiente osmótico entre a solução banhante (isotônica) e a solução perfusora (hipotônica), sendo calculada pela fórmula (HORSTER et al., 1982):

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

onde:

R - constante universal dos gases;

T - temperatura absoluta em graus K;

- A - área do túbulo perfundido (cm^2), obtida através da medida do comprimento e do diâmetro tubular no final do experimento, utilizando-se um micrômetro calibrado adaptado à ocular do microscópio;
- Vi - fluxo infundido (cm^3/seg), calculado através da razão de $[(^{14}\text{C-Inulina}) \text{ coletada}/(^{14}\text{C-Inulina}) \text{ perfundida}] \times \text{Vo}$;
- Vo - volume da amostra coletada em um determinado período de tempo (cm^3/seg);
- Ci - osmolaridade da solução perfusora (atm);
- Co - osmolaridade da solução coletada, calculada a partir da razão $[(^{14}\text{C-Inulina}) \text{ coletada}/(^{14}\text{C-Inulina}) \text{ perfundida}] \times \text{Ci}$ (atm);
- Cb - osmolaridade da solução banhante (atm).

Medida da Permeabilidade Difusional à Água:

A permeabilidade difusional à água ($\text{Pd}_v \times 10^{-5} \text{cm}/\text{seg}$) é a medida da permeabilidade efetiva do epitélio à água, que avalia o fluxo e a condutância à água, quando não há um gradiente osmótico entre a solução banhante e a perfusora. Nesse caso, consideramos que não há um fluxo efetivo de fluido sendo a Pd_v calculada através da fórmula (HEBERT & ANDREOLI, 1980):

$$\text{Pd}_v = \frac{\text{Vi}}{\text{A}} \times \ln \frac{\text{Ci}}{\text{Co}}$$

onde:

- A - área do túbulo perfundido (cm^2), obtida através da medida do comprimento e do diâmetro tubular no final do experimento, utilizando-se um micrômetro calibrado adaptado à ocular do

microscópio;

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

Vo - volume da amostra coletada em um determinado período de tempo (cm^3/seg);

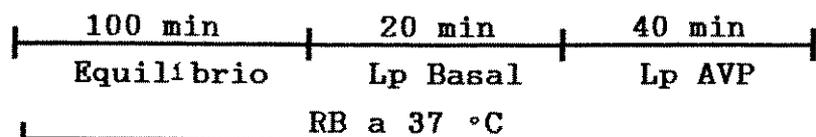
Ci - concentração de água [^3H] perfundida;

Co - concentração de água [^3H] coletada.

Protocolos Experimentais

Através dessa técnica, estudamos a função de túbulos coletores corticais, após diversas manobras experimentais de conservação hipotérmica *in vitro*, com diferentes soluções utilizadas no transplante renal, de acordo com os seguintes protocolos:

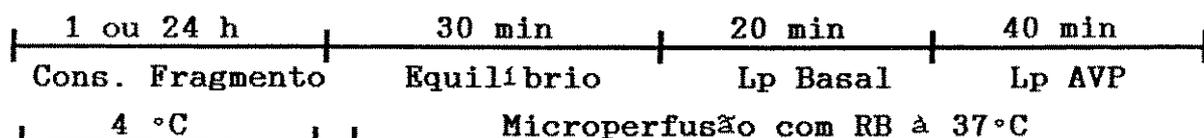
I - Estudo Funcional de Túbulos Coletores Corticais Recém-Isolados



Nesse protocolo, obtivemos o grupo controle. Assim, túbulos coletores corticais (TCCs) provenientes de fragmentos renais de coelho não conservados (frescos) foram banhados e perfundidos com Ringer-Bicarbonato (RB) isoosmótico e hipoosmótico, respectivamente, gaseificados com 95% de O_2 e 5% de CO_2 e aquecidos a 37°C . Os túbulos coletores foram expostos a um período de equilíbrio de cerca de 100 minutos, contados a partir da morte do animal, incluindo o tempo de

dissecção a frio e de perfusão a 37°C, para depletar o hormônio anti-diurético endógeno. Após esse período, foram coletadas as amostras no período basal (sem hormônio). Em seguida, foram adicionadas ao banho, do lado peritubular, 200 μ U/ml de arginina-vasopressina (AVP) e realizaram-se coletas nesse período, para o estudo da condutividade hidráulica (Lp), durante aproximadamente 40 minutos.

II - Estudo Funcional de Túbulos Coletores Corticais Isolados de Fragmentos Renais Conservados



Fragmentos renais foram incubados durante o período de uma ou 24 horas em diversas soluções conservadoras, a 4°C. Após o período de incubação, TCCs foram dissecados na mesma solução de conservação e transferidos para a câmara de perfusão contendo Ringer-Bicarbonato. Os túbulos foram, então, banhados, perfundidos, gaseificados com 95% de O₂ e 5% de CO₂ e aquecidos de acordo com os procedimentos do grupo controle. Após um equilíbrio de, aproximadamente, 30 minutos do início da perfusão, foram coletadas amostras no período basal. Seguiu-se, então, a adição de 200 μ U/ml de AVP ao banho, com coletas de amostras também nesse período.

Nesse protocolo estudamos dois grupos, de acordo com o tempo de incubação dos fragmentos. Cada grupo foi subdividido de acordo com as soluções conservadoras utilizadas:

1. Grupo 1 - Conservação de Fragmento Durante Uma Hora

- a → TCCs obtidos de fragmentos renais conservados em solução de Collins (com $MgSO_4$);
- b → TCCs dissecados de fragmentos de rins conservados em solução de Euro-Collins (sem $MgSO_4$);
- c → TCCs obtidos de fragmentos conservados na solução da Universidade de Wisconsin (UW);

2. Grupo 2 - Conservação de Fragmento Durante 24 Horas

- a → TCCs obtidos de fragmentos incubados em solução de Collins (com Mg);
- b → TCCs obtidos de fragmentos preservados em solução de Euro-Collins (sem Mg);
- c → TCCs provenientes de fragmentos renais preservados na solução da Universidade de Wisconsin (UW).

III - Estudo Funcional de Túbulos Coletores Corticais Isolados, Conservados em Câmaras Especiais

| | 60 min | 1, 3 e 24h | 30 min | 20 min | 40 min |
|-----------------------|----------------------|---------------------------|------------------------------|----------|--------|
| m o r t e | dissecção tubular | Cons Câmaras Especiais | Equilíbrio | Lp Basal | Lp AVP |
| | RB à 4 °C | Sol Cons 4°C | Microperfusão com RB à 37 °C | | |

Nesse protocolo, foram utilizadas câmaras especiais construídas originalmente no Laboratório de Conservação de Órgãos (NMCE-FCM, UNICAMP), que continham 1 ml das soluções conservadoras, para a incubação dos túbulos.

Essas câmaras constituem-se de uma lâmina de vidro utilizada na microscopia, sobre a qual foi montada uma pequena caixa, oriunda da colagem de pedaços retangulares de lâminas de vidro (figura 2).

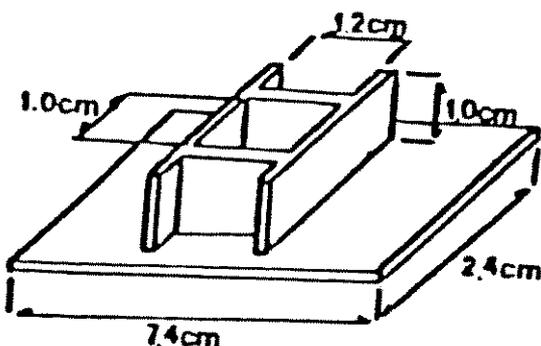


Figura 2: Esquema da Câmara Especial de Conservação

A finalidade desse procedimento foi evitar-se o fator de sorteio de túbulos mais viáveis morfológicamente, que certamente teria ocorrido na dissecação tubular do fragmento renal. Assim, foram dissecados de 8 a 10 túbulos de fragmentos não conservados (frescos) e colocados nessas câmaras especiais com as soluções conservadoras a frio. Após os períodos de incubação (1, 3 e 24hs), os túbulos foram

transferidos para a câmara de perfusão, perfundidos, banhados com Ringer-Bicarbonato a 37°C e gaseificados com 95% de O₂ e 5% de CO₂. Após um período de equilíbrio de aproximadamente 20 minutos, foram realizadas coletas do período basal e AVP, como nos grupos anteriores.

Com essa manobra experimental, estudou-se a função dos TCCs, incubados diretamente com a solução conservadora de maior (UW) e menor (Euro-Collins) eficiência na conservação de fragmentos. Os grupos estudados foram os seguintes:

Grupo 3 → TCCs isolados e incubados diretamente em câmaras contendo solução de Euro-Collins (sem MgSO₄) a 4°C, durante uma, três e 24 horas;

Grupo 4 → TCCs isolados e incubados diretamente em câmaras contendo solução conservadora da Universidade de Wisconsin a 4°C, durante uma, três e 24 horas.

IV - Estudo da Permeabilidade Difusional à Água (P_dw)

Nesse protocolo, avaliou-se como se encontrava a permeabilidade difusional à água, quando não havia imposição de gradiente osmótico na perfusão de túbulos coletores provenientes da conservação em câmaras especiais com solução de Euro-Collins, na qual os TCCs apresentavam uma elevação significativa da condutividade hidráulica no período basal. Nesse protocolo desenvolvemos 2 grupos:

Grupo controle 2 → TCCs dissecados de fragmentos renais

frescos (não conservados), perfundidos (com o perfusato marcado com água triciada) e banhados com Ringer-Bicarbonato, ambos isoosmóticos, gaseificados (95% O₂ e 5% CO₂) e aquecidos (37°C).

Após um período de equilíbrio de, aproximadamente, 100 minutos da morte do animal, coletou-se amostras no período basal. Em seguida, foram adicionados 200 µU/ml de arginina-vasopressina (AVP) ao banho peritubular e coletadas novas amostras.

Grupo 5 ⇒ TCCs isolados de fragmentos renais frescos e incubados durante, aproximadamente, 3 horas em câmaras especiais de conservação contendo solução de Euro-Collins a 4°C.

Após o período de incubação, os túbulos foram transferidos para o sistema de microperfusão, perfundidos e banhados em solução de Ringer-Bicarbonato de mesma osmolalidade, a 37°C, com gaseificação.

Após um equilíbrio de cerca de 30 minutos do início da perfusão, foram coletadas amostras no período basal e, em seguida, adicionadas 200 µU/ml de AVP ao banho, realizando-se novas coletas nesse período.

Composição das Soluções Conservadoras:

| | Collins | Euro-Collins | UW | |
|---|---------|--------------|---------------------------------|--------|
| NaHCO ₃ | 10 mM | 10 mM | Hidróxido amido | 50 g/l |
| KH ₂ PO ₄ | 15 mM | 15 mM | lactobionato | 100 mM |
| K ₂ HPO ₄ | 42 mM | 42 mM | KH ₂ PO ₄ | 25 mM |
| KCl | 15 mM | 15 mM | MgSO ₄ | 5 mM |
| MgSO ₄ | 28 mM | — | Rafinose | 30 mM |
| Glicose | 139 mM | 139 mM | Adenosina | 5 mM |
| | | | Alopurionol | 1 mM |
| | | | Glutationa | 3 mM |
| osmolaridade (mOsm/KgH ₂ O) | 317±5 | 310±4 | | 320 |
| pH | 7,0 | 7,0 | | 7,0 |

Obs: as soluções foram usadas sem aditivos

Análise Estatística

Os resultados individuais obtidos representam a média de 3 a 4 coletas em cada período experimental; no final, foram expressos pela média e erro-padrão da média de cada grupo.

Os testes estatísticos utilizados foram:

- para comparações intragrupos: teste t pareado de Student;
- para comparações inter-grupos: teste t não pareado de Student, análise de variância (Anova) e teste de regressão linear.

O nível de significância utilizado para a rejeição da hipótese de nulidade foi de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Este trabalho foi desenvolvido para avaliar o efeito direto de diversas soluções conservadoras, utilizadas no transplante renal, sobre a função de túbulos coletores corticais. Para tanto, utilizou-se a técnica da microperfusão de túbulo isolado *in vitro*.

Os resultados obtidos foram os seguintes:

I - Estudo Funcional de Túbulos Coletores Corticais Recém-Isolados

Inicialmente, antes de se desenvolver os protocolos de conservação, realizou-se o estudo dos parâmetros funcionais de túbulos coletores corticais de coelho a 37°C, obtendo-se grupo controle (n = 5).

A tabela 1 mostra os valores individuais e médios, com seus respectivos erros-padrão, da condutividade hidráulica (Lp) de túbulos coletores corticais (TCCs) provenientes de fragmentos renais frescos de coelhos, perfundidos a 37°C.

Observa-se, de acordo com a tabela 1, que túbulos coletores corticais de $1,5 \pm 0,2$ mm de comprimento, quando perfundidos com um

gradiente osmótico de 159 ± 3 mOsm/l, apresentaram, no período basal, uma condutividade hidráulica (L_p) média de $18,6 \pm 12,7 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm. Quando esses túbulos foram estimulados com a adição de $200 \mu\text{U/ml}$ de arginina-vasopressina (AVP) no banho peritubular, houve uma elevação ($p < 0,05$) da condutividade hidráulica, cujo valor médio foi de $183,3 \pm 28,9 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm. Dessa forma, o incremento médio na condutividade hidráulica, provocado pela estimulação hormonal, foi de $164,8 \pm 32,9 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm.

TABELA 1. Valores individuais ($n = 5$) e médios (\pm EPM) da função de TCCs recém-isolados (grupo controle) e perfundidos *in vitro* com a solução de Ringer-Bicarbonato a 37°C , nos períodos basal e AVP (estimulados com $200 \mu\text{U/ml}$ de arginina-vasopressina).

| Comprimento do túbulo (mm) | Fluxo de perfusão (nl/min) | | Cond. hidráulica (10^{-7} cm/seg.atm) | | ΔL_p 10^{-7} cm/s.atm |
|----------------------------|----------------------------|-------------------|--|----------------------|------------------------------------|
| | Basal | AVP | Basal | AVP | |
| 1,9 | 17,1 | 16,9 | 22,9 | 200,2 | 177,3 |
| 0,9 | 21,3 | 22,2 | 24,3 | 140,4 | 164,7 |
| 1,1 | 18,2 | 17,0 | 55,6 | 106,5 | 50,9 |
| 1,5 | 11,7 | 20,4 | 19,3 | 193,9 | 174,6 |
| 2,1 | 14,8 | 20,4 | 19,3 | 275,6 | 256,3 |
| 1,5 $\pm 0,2$ | 16,6 $\pm 1,6$ | 19,4 $\pm 1,0$ | 18,6 $\pm 12,7$ | 183,3* $\pm 28,9$ | 164,8 $\pm 32,9$ |

$\bar{X} \pm$ EPM

$\Delta L_p = L_p \text{ AVP} - L_p \text{ Basal}$ (= incremento da L_p)

* teste t pareado ($p < 0,05$): Basal x AVP

Como se depreende da tabela acima, não houve aumento significativo no fluxo médio de perfusão, que passou de $16,6 \pm 1,6$ nl/min no período basal para $19,4 \pm 1,0$ nl/min no período de estimulação com AVP.

Pode-se notar que, no período basal, embora os valores do

Lp se mantenha baixos, há uma grande variabilidade de túbulo para túbulo. Em condições normais, isto se deve ao estado de hidratação em que se encontrava o animal na hora de sua morte. Os valores de Lp após a estimulação hormonal encontram-se mais uniformes e elevados, como era de se esperar para essa preparação.

Os valores de condutividade hidráulica individuais, bem como as médias e seus elevados erros-padrão estão de acordo com a literatura (GRANTHAM et al., 1966; HALL & GRANTHAM, 1980; HANLEY, 1980; FRINDT et al., 1982; HORSTER & ZINK, 1982; LORENZEN et al., 1983; REIF et al., 1984; CAMPBELL et al., 1985; COGAN & ABRAMOW, 1986; KOKKO, 1987; DILLIGHAM et al., 1987; DIXON et al., 1987; ANDO et al., 1988; JONES et al., 1988).

II - Estudo Funcional de Túbulos Coletores Corticais Isolados de Fragmentos Renais Conservados

Nesse protocolo, estudou-se o efeito da conservação, a 4°C, de fragmentos renais em diversas soluções conservadoras utilizadas no transplante renal sobre a condutividade hidráulica de túbulos coletores corticais. Foram considerados 2 grupos, dependendo do tempo de conservação, os quais foram subdivididos, de acordo com a solução conservadora utilizada.

1 - Conservação Durante uma Hora

Fragmentos renais de, aproximadamente, 1 mm de espessura foram conservados, durante cerca de uma hora, nas soluções de

Collins, Euro-Collins e Universidade de Wisconsin-UW. Os resultados de condutividade hidráulica (L_p) obtidos estão expressos nas tabelas 2, 3 e 4, em valores individuais e médios, com os respectivos erros-padrão.

- *Conservação em Solução de Collins*

A tabela 2 apresenta a função de TCCs, de $1,8 \pm 0,3$ mm de comprimento, obtidos de fragmentos renais conservados em solução de Collins, a 4°C , durante 1 hora. A L_p média, no período basal, foi de $82,3 \pm 19,4 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm, a qual aumentou ($p < 0,05$) para $208,4 \pm 38,9 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm, durante o período em que houve a estimulação com $200\mu\text{U/ml}$ de AVP. O incremento médio na condutividade hidráulica foi de $126,1 \pm 41,5 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm.

TABELA 2. Valores individuais ($\bar{n} = 5$) e médios (\pm EPM) da função de túbulos coletores corticais, provenientes de fragmentos renais conservados em solução de Collins (com Mg^{++}), a 4°C , durante uma hora, períodos basal e estimulado com AVP.

| Comprimento do túbulo (mm) | Fluxo de perfusão (nl/min) | | Cond. hidráulica (10^{-7} cm/seg.atm) | | ΔL_p 10^{-7} cm/s.atm |
|----------------------------|----------------------------|-------------------|--|----------------------|------------------------------------|
| | Basal | AVP | Basal | AVP | |
| 1,1 | 12,5 | 16,1 | 88,9 | 305,4 | 216,5 |
| 1,6 | 7,7 | 7,7 | 37,4 | 97,8 | 60,4 |
| 1,5 | 17,6 | 16,7 | 113,1 | 142,2 | 29,1 |
| 2,5 | 19,0 | 19,8 | 38,3 | 271,2 | 232,9 |
| 2,1 | 19,1 | 16,4 | 133,6 | 225,4 | 91,8 |
| 1,8 $\pm 0,3$ | 15,2 $\pm 0,5$ | 15,3 $\pm 2,0$ | 82,3 $\pm 19,4$ | 208,4* $\pm 38,9$ | 126,1 $\pm 41,5$ |

$\bar{X} \pm$ EPM

$\Delta L_p = L_p \text{ AVP} - L_p \text{ Basal}$ (= incremento da L_p)

* teste t pareado ($p < 0,05$): BasalxAVP

Não houve uma variação significativa no fluxo de perfusão, que foi de $15,2 \pm 0,5$ nl/min no período basal e de $15,3 \pm 2,0$ nl/min no período de estimulação com AVP. Durante o período basal, observou-se, nesse grupo, uma grande variabilidade nos valores individuais da condutividade hidráulica, o que não ocorreu após a estimulação com AVP, cujos valores foram elevados e uniformes.

- *Conservação em Solução de Euro-Collins*

Na tabela 3, estão expressos os valores individuais e médios da condutividade hidráulica de túbulos coletores corticais, obtidos de fragmentos renais conservados em solução de Euro-Collins, a 4°C, durante 1 hora.

Os TCCs, com comprimento médio de $1,9 \pm 0,2$ mm, apresentaram uma condutividade hidráulica média de $103,3 \pm 38,0 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm no período basal. Quando se adicionou 200 μ U/ml de AVP ao banho, a L_p aumentou ($p < 0,05$) para $214,3 \pm 31,8 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm, o que resultou em um incremento médio de $111,0 \pm 12,5 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm.

Esse grupo apresentou uma variação significativa ($p < 0,05$) no fluxo de perfusão, que passou de $17,4 \pm 1,7$ nl/min, no período basal, para $21,2 \pm 2,0$ nl/min no período de estimulação com AVP. Esse aumento no fluxo de perfusão pode ter ocorrido devido à maior absorção de fluido propiciada pela arginina-vasopressina ou por uma diminuição do volume celular, que fora aumentado em consequência da conservação.

Aqui, novamente se pode notar a grande variabilidade nos valores de condutividade hidráulica encontrados no período basal.

TABELA 3. Valores individuais (n = 6) e médios (\pm EPM) da função de TCCs, obtidos de fragmentos renais de coelho conservados, a 4°C, durante uma hora, na solução de Euro-Collins (sem Mg), período basal e AVP (adição de arginina-vasopressina ao banho peritubular).

| Comprimento do túbulo (mm) | Fluxo de perfusão (nl/min) | | Cond. hidráulica (10^{-7} cm/seg.atm) | | ΔLp 10^{-7} cm/s.atm |
|----------------------------|----------------------------|--------------------|--|----------------------|-----------------------------------|
| | Basal | AVP | Basal | AVP | |
| 1,8 | 18,0 | 20,1 | 94,4 | 232,8 | 138,4 |
| 1,8 | 19,5 | 19,3 | 240,0 | 345,9 | 105,9 |
| 1,8 | 11,3 | 12,5 | 93,6 | 179,2 | 85,6 |
| 2,3 | 13,7 | 24,8 | -44,0 | 109,6 | 153,6 |
| 2,9 | 20,4 | 25,3 | 84,7 | 193,6 | 108,9 |
| 1,3 | 21,7 | 25,0 | 151,3 | 224,7 | 73,4 |
| 1,9 $\pm 0,2$ | 17,4 $\pm 1,7$ | 21,2* $\pm 2,0$ | 103,3 $\pm 38,0$ | 214,3* $\pm 31,8$ | 111,0 $\pm 12,5$ |

$\bar{X} \pm$ EPM

$\Delta Lp = Lp$ AVP - Lp Basal (= incremento da Lp)

* teste t pareado ($p < 0,05$): Basal x AVP

- Conservação em Solução da Universidade de Wisconsin

Na tabela 4, estão expressos os valores médios e os erros-padrão da condutividade hidráulica (Lp) de túbulos coletores corticais de, aproximadamente, $2,1 \pm 0,1$ mm, provenientes de fragmentos renais conservados em solução da Universidade de Wisconsin, a 4°C, por 1 hora.

No período basal, com um fluxo médio de perfusão de $18,7 \pm 1,1$ nl/min, foram obtidos valores médios de Lp de $48,9 \pm 23,2 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm. No período de estimulação com AVP, com um fluxo médio de perfusão de $20,6 \pm 0,8$ nl/min, houve um aumento ($p < 0,05$) da Lp para $164,8 \pm 27,2 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm. O incremento médio na condutividade hidráulica foi de $115,9 \pm 4,6 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm. O pequeno aumento no fluxo médio de perfusão, observado entre os dois períodos, não é estatisticamente significativo.

TABELA 4. Valores individuais (n = 5) e médios (\pm EPM) da função de túbulos coletores corticais provenientes de fragmentos renais conservados, a 4°C, durante uma hora, na solução da Universidade de Wisconsin (UW), nos períodos basal e AVP.

| Comprimento do túbulo (mm) | Fluxo de perfusão (nl/min) | | Cond. hidráulica (10^{-7} cm/seg.atm) | | ΔLp 10^{-7} cm/s.atm |
|----------------------------|----------------------------|-------------------|--|----------------------|-----------------------------------|
| | Basal | AVP | Basal | AVP | |
| 1,8 | 19,8 | 18,3 | -18,9 | 82,5 | 101,4 |
| 2,1 | 15,7 | 20,9 | 25,1 | 146,0 | 120,9 |
| 2,5 | 18,0 | 19,3 | 63,3 | 182,2 | 118,9 |
| 2,3 | 22,4 | 21,3 | 122,4 | 250,6 | 128,2 |
| 1,8 | 17,6 | 23,2 | 52,8 | 162,8 | 110,0 |
| 2,1 $\pm 0,1$ | 18,7 $\pm 1,1$ | 20,6 $\pm 0,8$ | 48,9 $\pm 23,2$ | 164,8* $\pm 27,2$ | 115,9 $\pm 4,6$ |

$\bar{X} \pm$ EPM

$\Delta Lp = Lp$ AVP - Lp Basal (= incremento da Lp)

* teste t pareado ($p < 0,05$): Basal x AVP

Cabe ressaltar que, nesse grupo, nota-se também uma grande variabilidade na Lp , no período basal; porém, os valores não se encontram tão elevados quanto nos grupos de conservação com a solução de Collins e Euro-Collins.

- Resumo da Conservação de Fragmentos Durante 1 Hora

A tabela 5 e figura 3 representam os valores médios de Lp do grupo controle (não conservado) e dos grupos conservados em diversas soluções (Collins, Euro-Collins e UW), a 4°C, durante uma hora. De acordo com essa tabela e figura, observa-se que, no período basal, TCCs provenientes de fragmentos conservados nas soluções de Collins e Euro-Collins apresentaram uma condutividade hidráulica (Lp) elevada ($p < 0,05$), em relação ao mesmo período do grupo controle. Esses dados poderiam sugerir tais soluções estariam preservando o ADH endógeno. Uma outra hipótese seria a de que essas soluções estariam,

de alguma maneira, alterando a permeabilidade da membrana, de forma a haver um aumento na reabsorção de água. Todavia, não foi detectado vazamento significativo de ^{14}C -Inulina nesses grupos de experimentos. Não houve diferença no valor médio da condutividade hidráulica do grupo conservado na solução de Wisconsin, em relação ao grupo controle, no período basal, assim como também não houve diferença entre esse grupo de conservação e os demais estudados.

TABELA 5 - Média (\pm EPM) da condutividade hidráulica de túbulos coletores corticais provenientes de fragmentos renais não conservados (grupo Controle) e conservados, a 4°C , durante uma hora nas soluções de Collins, Euro-Collins e UW

| Grupos | Comprimento do túbulo (mm) | Fluxo de perfusão (nl/min) | | Cond. hidráulica (10^{-7} cm/seg.atm) | | ΔLp 10^{-7} cm/s.atm |
|-----------------|----------------------------|----------------------------|--------------------|--|----------------------|--------------------------------------|
| | | Basal | AVP | Basal | AVP | |
| Contrl (n=5) | 1,5 $\pm 0,2$ | 16,6 $\pm 1,6$ | 19,4 $\pm 1,0$ | 18,6 $\pm 12,7$ | 183,3* $\pm 28,9$ | 164,8 $\pm 32,9$ |
| Co (n=5) | 1,8 $\pm 0,3$ | 15,2 $\pm 0,5$ | 15,3 $\pm 2,0$ | 82,3 $\pm 19,4$ | 208,4* $\pm 38,9$ | 126,1 $\pm 41,5$ |
| EC (n=6) | 1,9 $\pm 0,2$ | 17,4 $\pm 1,7$ | 21,2* $\pm 2,0$ | 103,3 $\pm 38,0$ | 214,3* $\pm 31,8$ | 111,0 $\pm 12,5$ |
| UW (n=5) | 2,1 $\pm 0,2$ | 18,7 $\pm 1,1$ | 20,6 $\pm 0,8$ | 48,9 $\pm 23,2$ | 164,8* $\pm 27,2$ | 115,9 $\pm 4,6$ |

$\bar{X} \pm$ EPM;

$\Delta\text{Lp} = \text{Lp AVP} - \text{Lp Basal}$ (= incremento da Lp)

* teste t pareado ($p < 0,05$): Basal x AVP

• teste t não pareado ($p < 0,05$): Controle x Conservados

Quando se adicionou o AVP ao banho, no lado peritubular, observou-se que as condutividades hidráulicas obtidas nos grupos de conservação não diferiram estatisticamente entre si, nem do grupo controle. Por outro lado, a adição de AVP no lado peritubular provocou, em todos os grupos, um aumento significativo na Lp, em relação ao período basal.

Esses dados sugerem que, embora a L_p esteja elevada em relação ao controle, nos grupos de conservação nas soluções de Collins e Euro-Collins, durante o período basal, há uma resposta efetiva à AVP, conforme se verifica pela elevação da L_p no período de estimulação. Por sua vez, isto pode sugerir que a alteração da permeabilidade da membrana nesses grupos não afeta a resposta ao hormônio. Assim, a reabsorção de água estaria ocorrendo também por outra via independente da vasopressina.

Quando se observa o ΔL_p , ou seja, o incremento da L_p em presença de AVP, nota-se que não há diferença nos valores encontrados nos grupos de conservação, em relação ao controle e nem entre os próprios grupos de conservação.

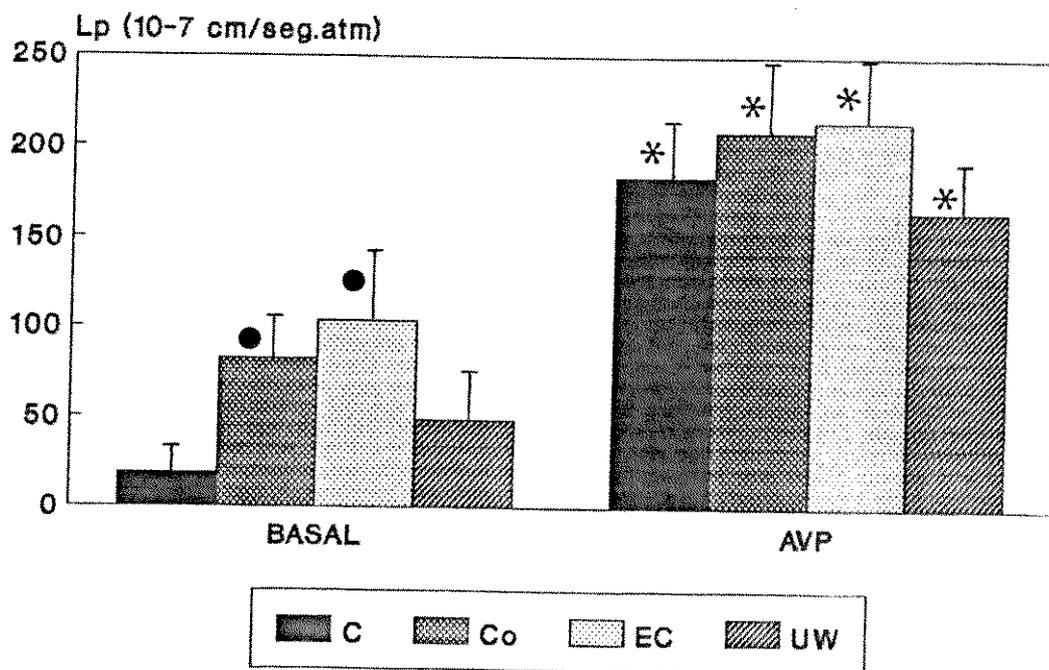


Figura 3 - Representação gráfica dos valores médios (\pm EPM) da condutividade hidráulica de TCCs não conservados (controle, C) e conservados durante uma hora nas soluções de Collins (Co), Euro-Collins (EC) e Universidade de Wisconsin (UW) à 4°C.

* teste t pareado ($p < 0,05$): Basal x AVP

● teste t não pareado ($p < 0,05$): Controle x Conservados

De maneira geral, esses resultados demonstram que as soluções conservadoras de Collins e Euro-Collins aumentam a permeabilidade osmótica à água, na ausência de estímulo hormonal em túbulos coletores corticais, quando estes são provenientes de fragmentos incubados nas referidas soluções, a 4°C, durante uma hora.

2 - Conservação Durante 24 Horas

Nesse protocolo, os fragmentos foram conservados nas soluções de Collins, Euro-Collins e da Universidade de Wisconsin - UW, a 4°C, durante 24 horas. Os túbulos foram, então, dissecados e perfundidos, sendo as coletas do período basal realizadas após 30 min de equilíbrio. Após o período basal, adicionaram-se 200 μ U/ml de AVP ao banho, seguindo-se a coleta de amostras.

- Conservação em Solução de Collins

Conforme se verifica na tabela 6, os túbulos coletores corticais de $1,4 \pm 0,1$ mm dissecados de fragmentos conservados na solução de Collins apresentaram, no período basal, uma condutividade hidráulica (L_p) média de $65,1 \pm 26,1 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm, observando-se uma grande variabilidade nos valores individuais, nesse período.

Quando se adicionaram 200 μ U/ml de arginina-vasopressina ao banho peritubular, não houve um aumento significativo na L_p , cujo valor foi de $63,7 \pm 14,7 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm.

Outro aspecto da tabela a ressaltar é que, ao contrário do que aconteceu após uma hora de conservação, os valores da L_p encontrados no período AVP, além de muito baixos, apresentaram também uma grande variabilidade de túbulo para túbulo, fazendo supor a

ocorrência de diferentes graus de lesão celular pós-conservação.

Não houve alteração significativa no fluxo de perfusão, que passou de $14,7 \pm 1,9$ nl/min, no período basal, para $15,4 \pm 1,4$ nl/min, no período de estimulação com AVP. Observa-se, também, que não houve um incremento na Lp com a adição de AVP. Ao contrário, um ΔLp de $-1,4 \pm 24,4 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm parece indicar que houve, sim, uma inibição da condutividade hidráulica.

TABELA 6. Valores individuais (n = 11) e médios (\pm EPM) da função de túbulos coletores corticais, obtidos de fragmentos renais conservados em solução de Collins durante 24 horas, a 4°C.

| Comprimento do túbulo (mm) | Fluxo de perfusão (nl/min) | | Cond. hidráulica (10^{-7} cm/seg.atm) | | ΔLp 10^{-7} cm/s.atm |
|----------------------------|----------------------------|-------------------|--|--------------------|-----------------------------------|
| | Basal | AVP | Basal | AVP | |
| 2,0 | 15,4 | 15,7 | 56,6 | 56,6 | 0 |
| 1,0 | 8,6 | 11,8 | -16,0 | 2,2 | 18,2 |
| 0,9 | 8,6 | 10,3 | 32,7 | 146,1 | 113,4 |
| 1,4 | 9,3 | 9,7 | 58,9 | 97,9 | 39,0 |
| 1,4 | 8,3 | 10,2 | -12,4 | 13,5 | 25,9 |
| 1,4 | 24,9 | 21,0 | 295,6 | 125,6 | -170,0 |
| 1,9 | 17,0 | 19,5 | 49,6 | 26,5 | -23,1 |
| 1,1 | 13,6 | 12,7 | 87,9 | 8,6 | -79,3 |
| 1,3 | 26,3 | 19,1 | 89,6 | 61,6 | -28,0 |
| 1,3 | 13,8 | 20,6 | 87,6 | 63,2 | -24,4 |
| 1,9 | 16,1 | 19,1 | -14,1 | 99,0 | 113,1 |
| 1,4 $\pm 0,1$ | 14,7 $\pm 1,9$ | 15,4 $\pm 1,4$ | 65,1 $\pm 26,1$ | 63,7 $\pm 14,7$ | -1,4 $\pm 24,4$ |

$\bar{X} \pm$ EPM

$\Delta Lp = Lp \text{ AVP} - Lp \text{ Basal}$ (= incremento da Lp)

- *Conservação em Solução de Euro-Collins*

A tabela 7 mostra os valores da condutividade hidráulica de TCCs de comprimento médio igual a $1,6 \pm 0,3$ mm, provenientes de

fragmentos conservados durante 24 horas na solução de Euro-Collins.

No período basal, quando não havia presença de hormônio, o valor médio da condutividade hidráulica foi de $-12,6 \pm 38,6 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm, sempre que os túbulos foram perfundidos com um fluxo médio de perfusão de $16,4 \pm 1,9$ nl/min. Após o estímulo com AVP, a condutividade hidráulica apresentou uma elevação não significativa, passando para $56,3 \pm 13,6 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm. Não houve, também, alteração significativa no fluxo médio de perfusão, que foi de $18,5 \pm 1,0$ nl/min neste período. O incremento na Lp foi de $68,9 \pm 41,6 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm.

TABELA 7. Valores individuais (n = 7) e médios (\pm EPM) da função de túbulos coletores corticais provenientes de fragmentos renais conservados em solução de Euro-Collins, a 4°C, por 24 horas, nos períodos basal e AVP.

| Comprimento do túbulo (mm) | Fluxo de perfusão (nl/min) | | Cond. hidráulica (10^{-7} cm/seg.atm) | | ΔLp 10^{-7} cm/s.atm |
|----------------------------|----------------------------|-------------------|--|--------------------|-----------------------------------|
| | Basal | AVP | Basal | AVP | |
| 1,5 | 24,0 | 21,2 | -20,0 | 38,5 | 58,5 |
| 1,6 | 17,8 | 17,9 | 102,7 | 18,1 | -84,6 |
| 1,3 | 21,5 | 22,3 | 33,9 | 38,8 | 4,9 |
| 0,8 | 13,2 | 15,2 | 52,4 | 128,6 | 76,2 |
| 2,1 | 15,4 | 16,8 | -24,9 | 69,8 | 94,7 |
| 1,1 | 11,7 | 17,2 | -219,4 | 59,1 | 278,5 |
| 3,0 | 11,2 | 19,4 | -12,9 | 41,1 | 54,0 |
| 1,6 $\pm 0,3$ | 16,4 $\pm 1,9$ | 18,5 $\pm 1,0$ | -12,6 $\pm 38,6$ | 56,3 $\pm 13,6$ | 68,9 $\pm 41,6$ |

$\bar{X} \pm$ EPM

$\Delta Lp = Lp \text{ AVP} - Lp \text{ Basal}$ (= incremento na Lp)

* teste t pareado ($p < 0,05$): Basal x AVP

Nota-se que esse grupo apresenta uma grande variabilidade da Lp no período basal, com a presença de valores altamente

negativos. No período AVP, também ocorreu muita variação dos valores, ao contrário do que aconteceu com a conservação durante uma hora, nessa mesma solução. Além disso, os valores aqui são muito mais baixos que os dos TCCs provenientes de fragmentos conservados por uma hora.

- *Conservação em Solução da Universidade de Wisconsin*

A tabela 8 apresenta os valores de Lp relativos aos túbulos provenientes de fragmentos conservados na solução da Universidade de Wisconsin, durante 24 horas.

TCCs de, aproximadamente, $1,9 \pm 0,2$ mm de comprimento apresentaram uma condutividade hidráulica média, no período basal, de $65,7 \pm 27,8 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm.

TABELA 8. Valores individuais (n = 8) e médios (\pm EPM) da função de túbulos coletores corticais, obtidos de fragmentos renais conservados, a 4°C, durante 24 horas, na solução da Universidade de Wisconsin (UW), nos períodos basal e AVP.

| Comprimento do túbulo (mm) | Fluxo de perfusão (nl/min) | | Cond. hidráulica (10^{-7} cm/seg.atm) | | ΔLp 10^{-7} cm/s.atm |
|----------------------------|----------------------------|-------------------|--|---------------------|-----------------------------------|
| | Basal | AVP | Basal | AVP | |
| 2,4 | 15,8 | 17,6 | 16,9 | 116,2 | 99,3 |
| 1,1 | 17,2 | 17,8 | 247,3 | 184,5 | -62,8 |
| 1,6 | 14,6 | 16,4 | 54,8 | 88,1 | 33,3 |
| 2,4 | 14,6 | 21,2 | -16,2 | 226,0 | 242,2 |
| 1,5 | 16,6 | 15,9 | 44,2 | 93,7 | 49,5 |
| 2,3 | 23,8 | 23,0 | 76,8 | 52,7 | -24,1 |
| 1,8 | 16,8 | 15,1 | 59,7 | 47,5 | -12,2 |
| 2,4 | 18,5 | 19,5 | 41,8 | 70,6 | 28,8 |
| 1,9 $\pm 0,2$ | 17,3 $\pm 1,0$ | 18,3 $\pm 1,0$ | 65,7 $\pm 27,8$ | 109,9 $\pm 22,6$ | 44,3 $\pm 33,3$ |

$\bar{X} \pm$ EPM

$\Delta Lp = Lp$ AVP - Lp Basal (= incremento na Lp)

* teste t pareado ($p < 0,05$): Basal x AVP

Aqui também houve uma grande variabilidade nos valores individuais; porém, os valores encontrados não diferem muito daqueles verificados no grupo conservado nessa solução por uma hora.

Quando se adicionou AVP ao banho, a condutividade hidráulica se elevou para $109,9 \pm 22,6 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm, não se registrando diferença estatística entre os valores dos períodos basal e AVP. Apesar disso, com o estímulo hormonal, houve um incremento de $44,3 \pm 33,3 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm na Lp.

Não houve alteração significativa no fluxo de perfusão, que foi de $17,3 \pm 1,0$ nl/min, no período basal e de $18,3 \pm 1,0$ nl/min, no período AVP.

- Resumo da Conservação Durante 24 Horas

A tabela 9 e figura 4 mostram os valores médios (\pm EPM) da condutividade hidráulica (Lp) do grupo controle e dos grupos de conservação durante 24 horas.

No período basal, não houve diferença entre os valores de Lp dos grupos de conservação e os do grupo controle. No período de estímulo com AVP, observa-se que não houve uma resposta efetiva ao hormônio em túbulos provenientes de fragmentos conservados em solução de Collins e Euro-Collins, cujos valores médios de condutividade hidráulica são menores ($p < 0,05$), em relação ao controle.

Os túbulos conservados em solução de Wisconsin não apresentaram diferença estatística na condutividade hidráulica após o estímulo com arginina-vasopressina em relação ao controle. Esses resultados sugerem que a solução UW é a que melhor preserva as funções do túbulo coletor cortical após 24 horas de conservação.

TABELA 9 - Média (\pm EPM) da condutividade hidráulica de túbulos coletores corticais obtidos de fragmentos renais não conservados (grupo Controle) e conservados à 10°C durante 24 horas nas soluções de Collins, Euro-Collins e UW (grupos 2a, 2b e 2c, respectivamente).

| Grupos | Comprimento do túbulo (mm) | Fluxo de perfusão (nl/min) | | Cond. hidráulica (10^{-7} cm/seg.atm) | | ΔLp 10 cm^{-7} /s.atm |
|-------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------|--|----------------------|------------------------------------|
| | | Basal | AVP | Basal | AVP | |
| Controle (n=7) | 1,5 $\pm 0,2$ | 16,6 $\pm 1,6$ | 19,4 $\pm 1,0$ | 18,6 $\pm 12,7$ | 183,3* $\pm 28,9$ | 164,8 $\pm 32,9$ |
| Collins (n=11) | 1,4 $\pm 0,1$ | 14,7 $\pm 1,9$ | 15,4● $\pm 1,4$ | 65,1 $\pm 26,1$ | 63,7● $\pm 14,7$ | -1,4● $\pm 24,4$ |
| Euro-Co (n=7) | 1,6 $\pm 0,3$ | 16,4 $\pm 1,9$ | 18,5 $\pm 1,0$ | -12,6 $\pm 38,6$ | 56,3● $\pm 13,6$ | 68,9 $\pm 41,6$ |
| UW (n=8) | 1,9 $\pm 0,2$ | 17,3 $\pm 1,0$ | 18,3 $\pm 1,0$ | 65,7 $\pm 27,8$ | 109,9▶ $\pm 22,6$ | 44,3● $\pm 33,3$ |

$\bar{X} \pm$ EPM

$\Delta Lp = Lp$ AVP - Lp Basal (= incremento na Lp)

* teste t pareado ($p < 0,05$): Basal x AVP

● teste t não pareado ($p < 0,05$): Controle x Conservados

▶ Análise de Variância ANOVA ($p < 0,05$): UW \neq Collins, Euro-Collins

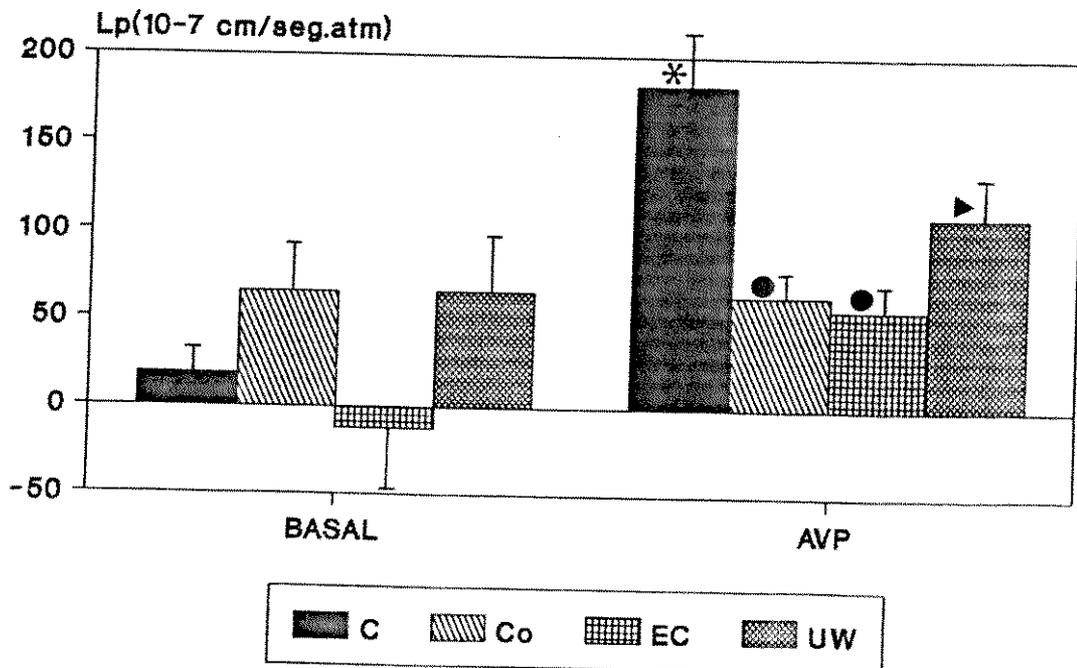


Figura 4 - Representação gráfica dos valores médios (\pm EPM) da Lp de TCCs não conservados, controle, (C) e conservados durante 24 horas nas soluções de Collins (Co), Euro-Collins (EC) e Universidade de Wisconsin (UW) à 4°C.

* teste t pareado ($p < 0,05$): Basal x AVP; ● teste t pareado ($p < 0,05$): Controle x Conservados; ▶ Análise de Variância (ANOVA) ($p < 0,05$): UW \neq Co e EC

Por outro lado, quando se observa o incremento na condutividade hidráulica (ΔL_p), pode-se notar que apenas o valor encontrado no grupo conservado em solução de Euro-Collins não é diferente, estatisticamente, do controle. Isto, porém, pode ter ocorrido em função do valor negativo de L_p encontrado no período basal.

- Comparação entre a Conservação Durante 1 e 24 Horas

A tabela 10 e a figura 5 resumizam os resultados encontrados na conservação de fragmentos. Nessa tabela e figura, estão expressos os valores médios da condutividade hidráulica encontrados em TCCs provenientes de fragmentos não conservados (controle) e conservados durante uma e 24 hs nas soluções de Collins, Euro-Collins e UW, a 4°C.

As soluções de Collins e Euro-Collins provocaram um aumento na condutividade hidráulica após uma hora de conservação, em relação ao controle e ao grupo conservado na solução de Wisconsin, mesmo na ausência de estímulo hormonal (período basal). Após 24 horas de conservação, este fato não ocorreu, uma vez que os valores encontrados no período basal, nas três soluções, não diferem do grupo controle. Também não se verificou diferença estatística entre os valores médios de L_p encontrados entre os grupos de conservação durante o período basal.

Os túbulos obtidos de fragmentos renais conservados em solução de Euro-Collins apresentaram um valor muito alto de L_p no período basal após uma hora de conservação, em relação ao controle, o qual difere ($p < 0,05$) do valor encontrado quando se conservou os fragmentos na mesma solução durante 24 horas.

TABELA 10 - Média (\pm EPM) da condutividade hidráulica de túbulos coletores corticais obtidos de fragmentos renais não conservados (controle) e conservados à 4°C durante 1 e 24 horas nas soluções de Collins, Euro-Collins e UW (sub-grupos 1a, 1b, 1c, 2a, 2b e 2c).

| Condutividade Hidráulica (Lp) | | | | | | |
|---------------------------------|---------------|------------------|----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| (x 10 ⁻⁷ cm/seg.atm) | | | | | | |
| GRUPOS | BASAL | | | AVP | | |
| | 0h | 1h | 24hs | 0h | 1h | 24hs |
| Controle | 18,6 ±12,7 | — | — | 183,3* ±28,9 | — | — |
| Collins | — | 93,5*† ±20,5 | 65,1 ±26,1 | — | 236,0*† ±35,3 | 63,7● ±14,7 |
| Euro-Coll | — | 103,3*† ±38,0 | -12,6 ±38,6 | — | 214,3*† ±31,8 | 56,3● ±13,6 |
| UW | — | 48,9 ±23,2 | 65,7 ±27,8 | — | 164,8* ±27, | 109,9▶ ±22,6 |

$\bar{X} \pm$ EPM

* teste *t* pareado ($p < 0,05$): Basal x AVP

● teste *t* não pareado ($p < 0,05$): Controle x Conservados

† teste *t* não pareado ($p < 0,05$): 1h x 24hs

▶ Análise de Variância ANOVA ($p < 0,05$): UW (24hs) ≠ Collins e Euro-Coll (24hs)

De modo geral, esses dados parecem indicar que um dos efeitos das soluções conservadoras utilizadas é a alteração na permeabilidade à água, mesmo sem a estimulação hormonal em túbulos coletores corticais.

Quando se estimula com AVP, há uma resposta ao hormônio após 1 hora de conservação. Porém, após 24 horas de conservação, há uma queda na resposta estimulatória do hormônio sobre a permeabilidade à água em função do tempo de conservação nas soluções de Collins e Euro-Collins (teste de correlação, $r=0,8$), sendo que, apenas os túbulos provenientes de fragmentos conservados na solução da Universidade de Wisconsin parecem manter a resposta ao estímulo

hormonal.

Esses resultados parecem indicar que a solução de Wisconsin seria a mais efetiva na conservação de túbulos coletores corticais, mesmo após 24 horas de incubação. Por outro lado, túbulos provenientes de fragmentos renais conservados em Euro-Collins são os que apresentam maior queda na função após 24 horas de conservação.

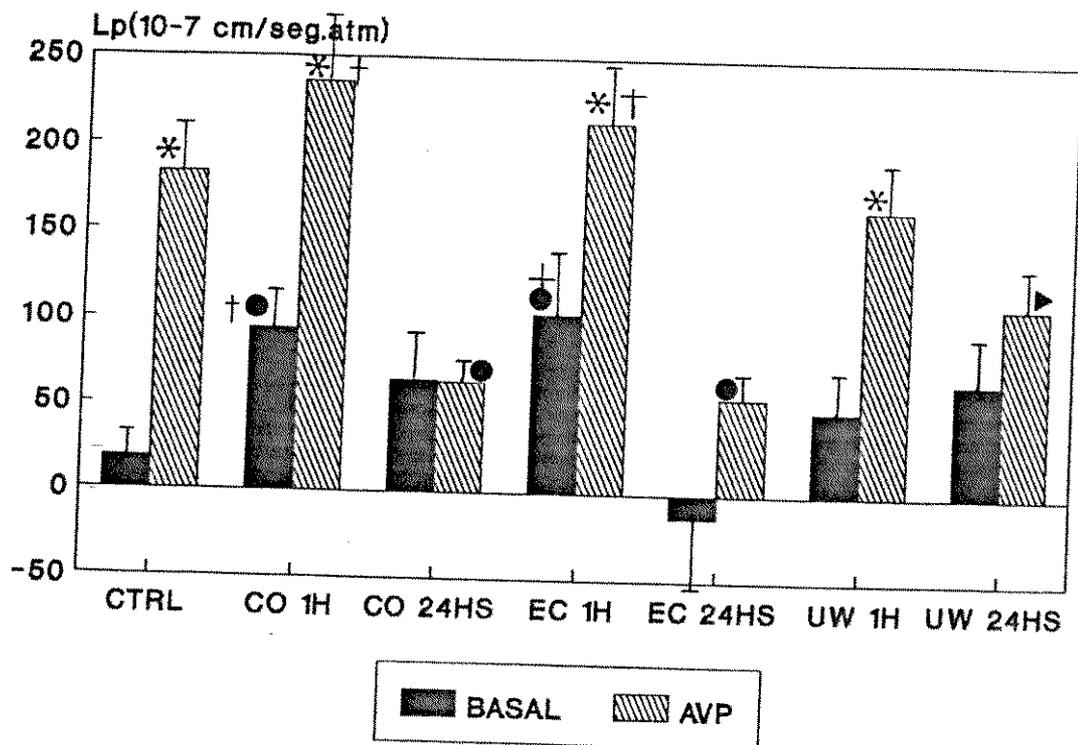


Figura 5 - Representação gráfica dos valores médios (\pm EPM) da condutividade hidráulica de TCCs não conservados, controle e conservados durante 1 e 24 horas nas soluções de Collins (Co), Euro-Collins (EC) e Universidade de Wisconsin (UW) a 4°C . * teste t pareado ($p < 0,05$): Basal x AVP; • teste t não pareado ($p < 0,05$): Ctrl x Conservados; † teste t não pareado ($p < 0,05$): 1 x 24 hs; ▶ análise de variância (ANOVA) ($p < 0,05$): UW \neq Co e EC (24 hs)

Aspectos morfológicos:

A figura 6 apresenta o aspecto morfológico de um túbulo coletor cortical do grupo controle no período basal. Pode-se notar que o lúmen é bem aberto, as células se encontram bem planas, sendo que se pode distinguir somente a membrana basal. Após o estímulo com AVP (figura 7), as células apresentam-se com volume celular aumentado e ficam bem delineadas. Conseqüentemente, há uma diminuição do lúmen tubular, evidenciando a resposta esperada ao estímulo.

Após a conservação do fragmento durante uma hora, os túbulos apresentam-se com o volume celular bastante aumentado, mesmo na ausência da AVP, como se pode observar na figura 8. Decorrido um período de equilíbrio de 30 minutos, há um retorno à morfologia normal nestas circunstâncias, na qual as células voltam a ficar planas e o lúmen tubular bem aberto. Quando se administra AVP, as células voltam a aumentar de volume (figura 9).

Após 24 horas de conservação nas soluções de Collins e Euro-Collins, no período basal, o aspecto morfológico dos TCCs se assemelha muito àquele do controle; porém, quando se administra AVP, não ocorre o esperado aumento do volume celular, nem as células se tornam bem delineadas (figura 10). Apenas os TCCs conservados nas solução de Wisconsin demonstram resposta ao hormônio.

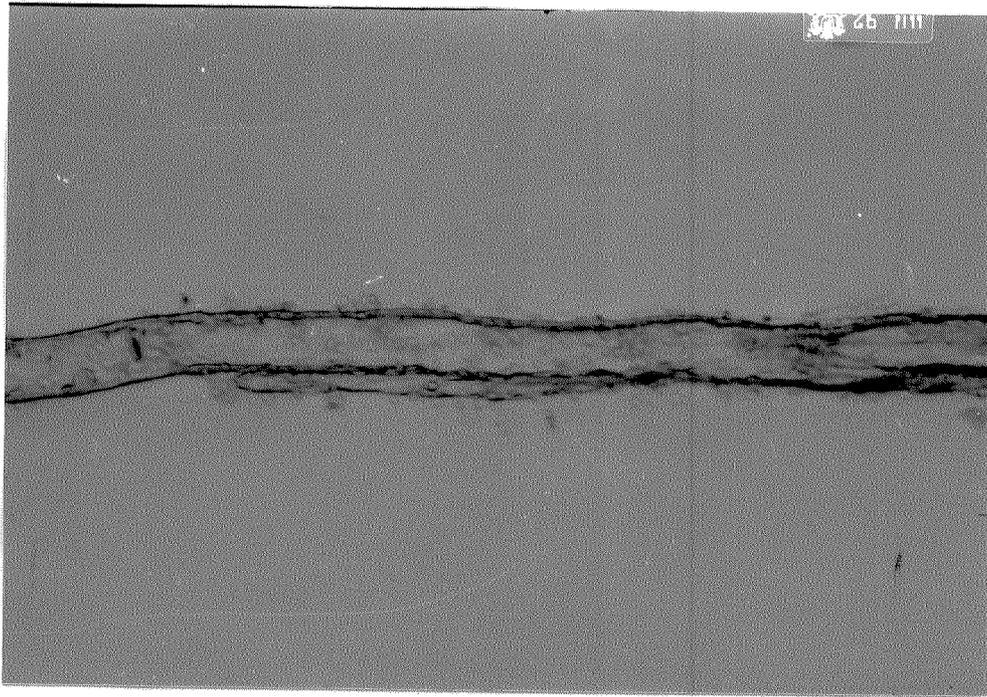


Figura 6: Aspecto morfológico do túbulo coletor cortical do grupo controle, período basal. Aumento de 100x

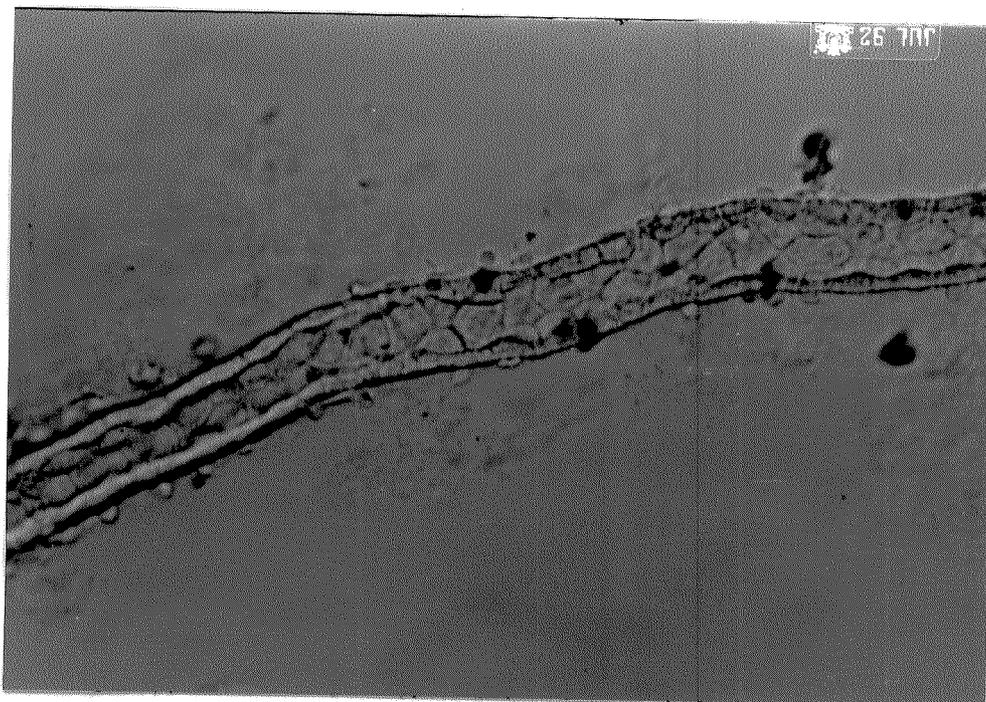


Figura 7: Aspecto morfológico de um túbulo coletor cortical do grupo controle, após estímulo com AVP. Aumento de 250x.

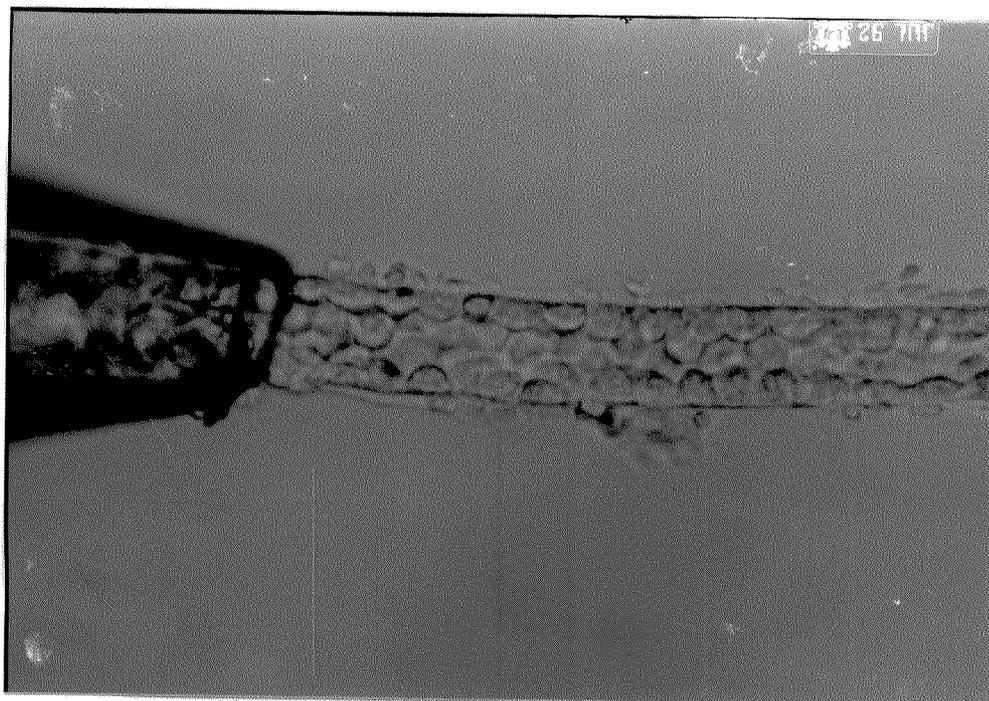


Figura 8: Aspecto morfológico de um túbulo coletor cortical proveniente de um fragmento renal conservado (solução de Collins, de Euro-Collins ou da Universidade de Wisconsin), a 4°C, durante uma hora, período basal. Aumento de 250x.

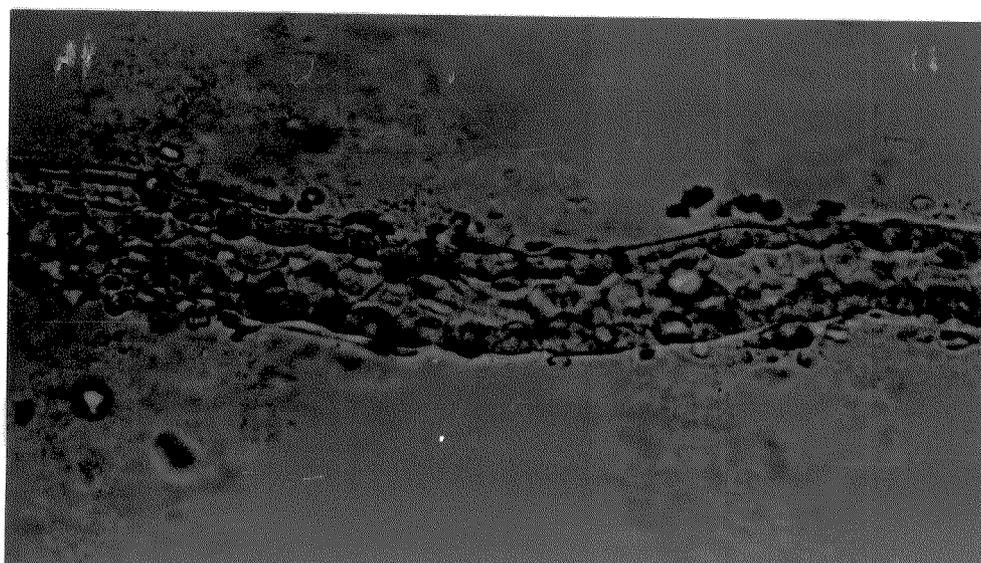


Figura 9: Aspecto morfológico de um túbulo coletor cortical proveniente de fragmento renal conservado (solução de Collins, de Euro-Collins ou da Universidade de Wisconsin), a 4°C, durante uma hora, após estimulação com AVP. Aumento de 250x.

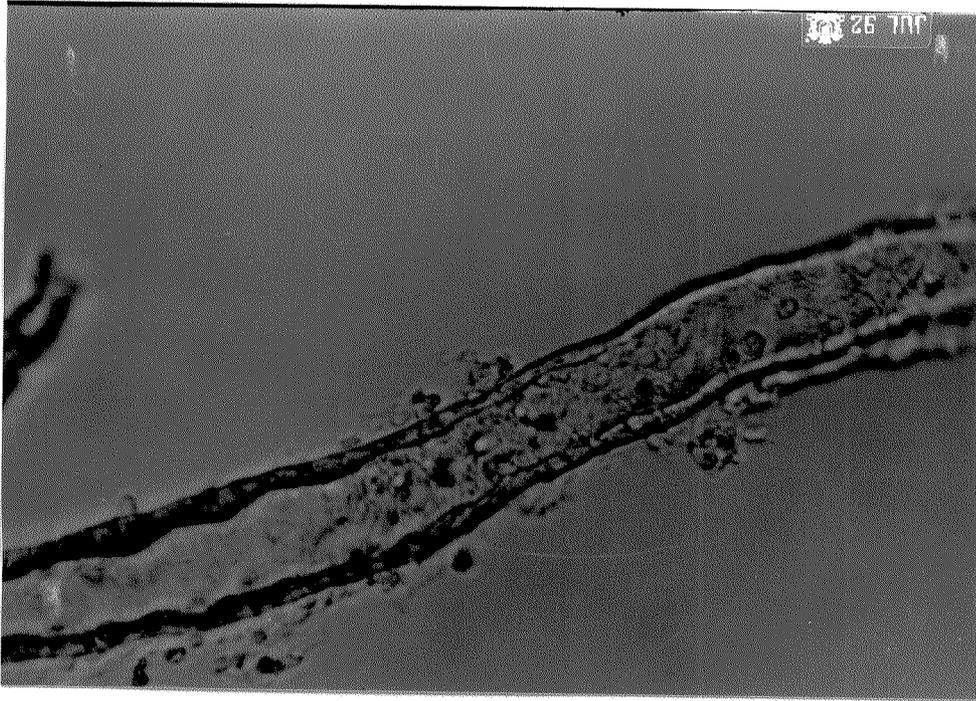


Figura 10: Aspecto morfológico de um túbulo coletor cortical proveniente de fragmento renal conservado (solução de Collins ou de Euro-Collins), a 4°C, durante 24 horas, na ausência e presença de estímulo hormonal (períodos basal e AVP). Aumento de 250x.

III - Estudo Funcional de Túbulos Coletores Corticais Isolados, Conservados em Câmaras Especiais

Após observar os resultados obtidos da conservação de fragmentos durante 24 horas, verificou-se que os túbulos provenientes de fragmentos conservados em solução de Euro-Collins eram os que apresentavam a maior queda na função, quando estimulados com arginina-vasopressina. Por outro lado, túbulos provenientes de fragmentos conservados na solução da Universidade de Wisconsin eram os que apresentavam a melhor função, quando estimulados com AVP,

depois de 24 horas de preservação. Com base nisto, decidiu-se verificar como se comportariam esses túbulos, quando em contacto direto com tais soluções. Assim, utilizaram-se câmaras especiais de conservação contendo as soluções conservadoras, a 4°C. TCCs, após serem dissecados de fragmentos renais frescos, não conservados, foram transferidos para essas câmaras, onde foram incubados por vários períodos de tempo.

- Conservação Direta em Solução de Euro-Collins

Túbulos coletores conservados durante uma hora (n = 5) em solução de Euro-Collins (tabela 11), após terem sido perfundidos com um fluxo de perfusão de $19,1 \pm 1,0$ nl/min, apresentaram, no período basal, uma condutividade hidráulica média de $54,0 \pm 40,0 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm. Quando se adicionaram 200 μ U/ml de AVP ao banho peritubular, a condutividade hidráulica aumentou para $178,0 \pm 62,3 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm, valor esse não estatisticamente diferente daquele do período basal. Isto ocorreu devido à grande variabilidade de valores individuais encontrada em ambos os períodos. Parece que o contato direto com a solução conservadora de Euro-Collins, durante uma hora, altera profundamente a estrutura celular. Por outro lado, cada túbulo parece responder de um modo diferente à conservação. Apesar disto, pode-se observar que, em média, houve um incremento na Lp de $125,0 \pm 70,8 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm. Houve também um aumento (p < 0,05) no fluxo de perfusão, no período de estimulação hormonal, para $23,9 \pm 1,2$ nl/min.

Quando túbulos coletores corticais foram incubados nas câmaras especiais com a solução de Euro-Collins, durante 3 horas (n = 4) (tabela 11), observou-se um fato novo: durante o período basal, os túbulos já apresentavam uma condutividade hidráulica muito elevada,

de $157,8 \pm 19,6 \times 10^{-7} \text{ cm/seg.atm}$. Esse valor também é significativamente ($p < 0,05$) mais alto, quando comparado com a L_p média do grupo conservado durante uma hora. Nesse grupo, pode-se

TABELA 11. Valores individuais e médios (\pm EPM) de túbulo coletores corticais, conservados diretamente em solução de Euro-Collins, a 4°C , durante uma, 3 e 24 horas

| Tempo de Conservação | Fluxo de perfusão (nl/min) | | Cond. hidráulica ($10^{-7} \text{ cm/seg.atm}$) | | ΔL_p 10^{-7} cm/s.atm |
|-----------------------------|----------------------------|--------------------|---|---------------------|--|
| | Basal | AVP | Basal | AVP | |
| 1 H O R A | 18,4 | 22,7 | 21,7 | 133,3 | 111,6 |
| | 15,9 | 21,7 | 178,1 | 48,4 | -129,7 |
| | 21,6 | 28,2 | -61,1 | 61,3 | 122,4 |
| | 19,1 | 22,1 | 26,8 | 285,8 | 259,0 |
| | 20,3 | 24,6 | 104,5 | 361,2 | 256,7 |
| $\bar{X} \pm \text{EPM}$ | 19,1 $\pm 1,0$ | 23,9* $\pm 1,2$ | 54,0 $\pm 40,0$ | 178,0 $\pm 62,3$ | 125,0 $\pm 70,8$ |
| 3 H O R A S | 23,4 | 21,0 | 125,5 | 175,8 | 50,3 |
| | 32,4 | 29,0 | 140,3 | 176,2 | 35,9 |
| | 21,7 | 21,6 | 151,1 | 121,6 | -29,5 |
| | 19,6 | 23,1 | 214,3 | 191,1 | -23,2 |
| $\bar{X} \pm \text{EPM}$ | 24,3 $\pm 2,8$ | 23,7 $\pm 1,8$ | 157,8 $\pm 19,6$ | 166,2 $\pm 15,3$ | 8,4 $\pm 20,3$ |
| 24 H O R A S | 18,3 | 18,9 | 13,1 | 104,3 | 91,2 |
| | 10,4 | 17,8 | -3,7 | 70,2 | 73,9 |
| | 20,0 | 18,0 | 207,3 | 125,5 | -81,8 |
| | 27,5 | 34,7 | 150,2 | 132,2 | -18,0 |
| | 29,0 | 33,9 | 183,1 | 136,9 | -46,2 |
| $\bar{X} \pm \text{EPM}$ | 21,0 $\pm 3,4$ | 24,7 $\pm 3,9$ | 110,0 $\pm 44,0$ | 113,8 $\pm 12,2$ | 3,8 $\pm 33,8$ |

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

* teste t pareado ($p < 0,05$): Basal x AVP

► Análise de Variância ANOVA ($p < 0,05$): 1h \neq 3 e 24 hs

$\Delta L_p = L_p \text{ AVP} - L_p \text{ Basal}$ (= incremento na L_p)

observar que os valores individuais são mais uniformes, em relação ao mesmo período do grupo anterior. A adição de AVP não alterou, significativamente, os valores da condutividade hidráulica, cujo valor médio foi de $166,2 \pm 15,3 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm. O incremento da L_p , portanto, foi de $8,4 \pm 20,3 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm, incremento esse considerado pequeno, porque o basal já se apresentava elevado. Assim, os túbulos parecem não responder à estimulação com AVP. Se compararmos esses túbulos com aqueles conservados durante uma hora, verificaremos que há uma queda no incremento da L_p , embora a mesma não seja diferente, do ponto de vista estatístico.

Não houve alteração significativa no fluxo de perfusão entre os períodos basal e AVP, embora o fluxo no período basal, que foi de $24,3 \pm 2,8$ nl/min, tenha sido superior ($p < 0,05$) ao fluxo de perfusão no mesmo período dos túbulos conservados durante uma hora. Isto se explica pela elevada condutividade hidráulica apresentada no período basal.

Após 24 horas de conservação direta na solução de Euro-Collins ($n = 5$), a condutividade hidráulica média no período basal continuou elevada, apesar dos valores individuais apresentarem uma certa variabilidade. O valor médio da L_p encontrada nesse período foi de $110,0 \pm 44,0 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm. Esse valor não é estatisticamente diferente daquele encontrado nos túbulos conservados durante 3 horas, mas difere significativamente ($p < 0,05$) daquele encontrado em túbulos conservados durante uma hora. Quando se adicionou AVP, observou-se que também não houve uma resposta efetiva ao hormônio. A condutividade hidráulica média encontrada após estimulação com AVP foi de $113,8 \pm 12,2 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm, sendo que esse valor não difere estatisticamente daquele do período basal. O

incremento, nesse grupo, foi de $3,8 \pm 33,8 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm, o qual não difere dos grupos anteriores por causa da grande variabilidade de resposta. Porém, esses resultados parecem indicar uma perda de função, após 24 horas de conservação direta.

Não houve diferença entre os fluxos de perfusão entre os períodos basal e AVP, embora o fluxo médio no período basal seja diferente ($p < 0,05$) do fluxo médio encontrado no período basal de túbulos coletores conservados durante uma hora.

- Conservação Direta em Solução da Universidade de Wisconsin

Os resultados da conservação direta de túbulos coletores corticais em câmaras especiais contendo solução da Universidade de Wisconsin estão expressos na tabela 12. TCCs conservados diretamente na solução de UW durante uma hora ($n = 6$) apresentaram, no período basal, uma condutividade hidráulica de $109,7 \pm 45,0 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm. A adição de AVP ao banho peritubular não alterou significativamente esse valor. O valor médio encontrado no período de estimulação hormonal foi de $165,8 \pm 38,0 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm. O incremento médio na L_p , portanto, foi de $46,9 \pm 60,7 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm. Observou-se que, no período basal, apesar do valor médio ter sido alto, houve uma certa variabilidade nos valores individuais. Isto poderia indicar que cada túbulo responde de um modo diferente à conservação. Esses resultados indicam que a população de néfrons de um rim não é uniforme. Nesse grupo, não houve alteração significativa no fluxo de perfusão, que passou de $20,3 \pm 2,7$ nl/min, no período basal, para $24,5 \pm 1,4$ nl/min, no período AVP. Os túbulos coletores conservados diretamente na solução de UW durante 3 horas apresentaram uma resposta à condutividade hidráulica que, estatisticamente, não

TABELA 12. Valores individuais e médios (\pm EPM) da função de túbulos coletores corticais incubados durante uma, 3 e 24 horas em câmaras especiais de conservação, contendo solução da Universidade de Wisconsin, a 4°C

| Tempo de Conservação | Fluxo de perfusão (nl/min) | | Cond. hidráulica (10^{-7} cm/seg.atm) | | ΔLp 10^{-7} cm/s.atm |
|-----------------------------|----------------------------|--------------------|--|----------------------|-----------------------------------|
| | Basal | AVP | Basal | AVP | |
| 1 H O R A | 9,6 | 21,5 | 243,8 | 158,6 | -85,2 |
| | 26,8 | 23,1 | 86,0 | 63,2 | -22,8 |
| | 27,6 | 26,8 | 241,1 | 166,6 | -74,5 |
| | 19,8 | 29,4 | 38,7 | 324,8 | 286,1 |
| | 19,0 | 20,5 | 76,0 | 85,5 | 9,5 |
| | 19,1 | 25,7 | -27,7 | 195,9 | 168,2 |
| $\bar{X} \pm$ EPM | 20,3 $\pm 2,7$ | 24,5 $\pm 1,4$ | 109,7 $\pm 45,0$ | 165,8 $\pm 38,0$ | 46,9 $\pm 60,7$ |
| 3 H O R A S | 17,6 | 22,3 | 4,2 | 110,4 | 106,2 |
| | 17,7 | 25,3 | 246,6 | 259,2 | 12,6 |
| | 20,1 | 22,6 | 292,4 | 172,0 | -120,4 |
| | 28,4 | 29,7 | 157,6 | 254,0 | 96,4 |
| | 18,1 | 19,6 | 118,0 | 87,4 | -30,6 |
| | 20,6 | 24,2 | 100,1 | 176,5 | 76,4 |
| $\bar{X} \pm$ EPM | 20,4 $\pm 1,7$ | 24,0* $\pm 1,4$ | 153,2 $\pm 42,6$ | 176,6 $\pm 29,0$ | 23,4 $\pm 35,9$ |
| 24 H O R A S | 17,2 | 25,4 | 117,9 | 89,1 | -28,8 |
| | 21,6 | 18,8 | -6,7 | 22,8 | 29,5 |
| | 15,5 | 24,2 | 36,2 | 87,9 | 51,7 |
| | 20,9 | 23,4 | 77,7 | 149,0 | 71,3 |
| | 16,3 | 21,5 | 170,4 | 182,9 | 12,5 |
| | 22,4 | 33,9 | 36,9 | 205,9 | 169,0 |
| | 24,0 | 36,0 | 52,9 | 129,5 | 76,6 |
| $\bar{X} \pm$ EPM | 19,7 $\pm 1,3$ | 26,2* $\pm 2,4$ | 69,3† $\pm 22,3$ | 123,9* $\pm 23,7$ | 54,5 $\pm 23,5$ |

$\bar{X} \pm$ EPM

* teste t pareado ($p < 0,05$): Basal x AVP

† Análise de variância (ANOVA) ($p < 0,05$): 24hs \neq 3hs

$\Delta Lp = Lp$ AVP - Lp Basal (= incremento na Lp)

diferiu daquela observada no grupo de túbulos conservados durante uma hora. Assim, a L_p média no período basal foi de $153,2 \pm 42,6 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm e, no período de estimulação com AVP, de $176,6 \pm 29,0 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm, valores esses que também não diferiram entre si. O incremento obtido para esse grupo foi de $23,4 \pm 35,9 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm e também não é diferente do grupo anterior. O fluxo de perfusão, que no período basal foi de $20,4 \pm 1,7$ nl/min, aumentou ($p < 0,05$) para $24,0 \pm 1,4$ nl/min no período de estimulação hormonal. Esses valores, no entanto, não são diferentes daqueles encontrados, nos períodos basal e AVP, no grupo conservado diretamente durante uma hora.

Na tabela 12, pode-se também observar que os valores individuais de condutividade hidráulica, no período basal, apresentam-se mais uniformes, sem tanta variabilidade.

Após a incubação direta em solução de Wisconsin durante 24 horas, TCCs perfundidos com um fluxo de perfusão de $19,7 \pm 1,3$ nl/min apresentaram uma condutividade hidráulica média, no período basal, de $69,3 \pm 22,3 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm. Quando esses túbulos foram estimulados com AVP, houve um aumento ($p < 0,05$) no fluxo de perfusão para $26,2 \pm 2,4$ nl/min, acompanhado de uma elevação ($p < 0,05$) na L_p para $123,9 \pm 23,7 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm. O valor médio da L_p encontrada, no período basal, nesse grupo, diferiu significativamente daquele encontrado no grupo conservado durante 3 horas, mas não daquele conservado durante uma hora. Além disso, o incremento (ΔL_p), que foi de $54,5 \pm 23,5 \times 10^{-7}$ cm/seg.atm, também não diferiu dos grupos anteriores. A elevação encontrada no fluxo de perfusão pode ser explicada ou pelo aumento na condutividade hidráulica, o que levaria a um aumento na reabsorção de fluido tubular e por isso demandaria um fluxo maior, para manter

constante o tempo de coleta, ou pela diminuição do volume celular e abertura do lúmen tubular. Além disso, o fluxo elevado indica que o lúmen tubular deve estar desobstruído sem debris celulares.

A tabela 13 e figura 11 representam o resumo da incubação de túbulos isolados em câmaras especiais de conservação, contendo solução de Euro-Collins ou solução da Universidade de Wisconsin, a 4°C, durante uma, 3 e 24 horas.

Quando se comparam os valores de condutividade hidráulica obtidos dos túbulos conservados com aqueles não conservados (controle), observa-se que todos os grupos, exceto aquele conservado em solução de Euro-Collins durante uma hora, apresentaram valores médios de Lp, no período basal, significativamente ($p < 0,05$) elevados, em relação ao mesmo período do grupo controle.

TABELA 13. Função de túbulos coletores corticais não conservados (grupo controle) e conservados durante uma, 3 e 24 horas em câmaras especiais de conservação, contendo solução de Euro-Collins e de Wisconsin, a 4°C, períodos basal e AVP

| Condutividade Hidráulica (Lp) | | | | | | | |
|--|------------------------------|----------------------|---------------------|--------------------------------------|------------------------------|----------------------|---------------------|
| $(\times 10^{-7} \text{ cm/seg. atm})$ | | | | | | | |
| GRUPOS | BASAL | AVP | ΔLp | GRUPOS | BASAL | AVP | ΔLp |
| Control | 18,6 $\pm 12,7$ | 183,3* $\pm 28,9$ | 164,8 $\pm 32,9$ | Control | 18,6 $\pm 12,7$ | 183,3* $\pm 28,9$ | 164,8 $\pm 32,9$ |
| E U R O - C O L | 1h 54,0▶ $\pm 40,0$ | 178,0 $\pm 62,3$ | 125,0 $\pm 70,8$ | U N I V W I S C | 1h 109,7● $\pm 45,0$ | 165,8 $\pm 38,0$ | 46,9● $\pm 60,7$ |
| | 3hs 157,8● $\pm 19,6$ | 166,2 $\pm 15,3$ | 8,4● $\pm 20,3$ | | 3hs 153,2● $\pm 42,6$ | 176,6 $\pm 29,0$ | 23,4● $\pm 35,9$ |
| | 24hs 110,0● $\pm 44,0$ | 113,8● $\pm 12,2$ | 3,8● $\pm 33,8$ | | 24hs 69,3●† $\pm 22,3$ | 123,9* $\pm 23,7$ | 54,5● $\pm 23,5$ |

$\bar{X} \pm EPM$

* teste t pareado ($p < 0,05$): Basal x AVP

● teste t não pareado ($p < 0,05$): Controle x Conservação

† teste t não pareado ($p < 0,05$): 3 \neq 24 hs (UW)

▶ Análise de Variância ANOVA ($p < 0,05$): 1h \neq 3 e 24 hs (Euro-Coll)

$\Delta Lp = Lp \text{ AVP} - Lp \text{ Basal}$ (= incremento na Lp)

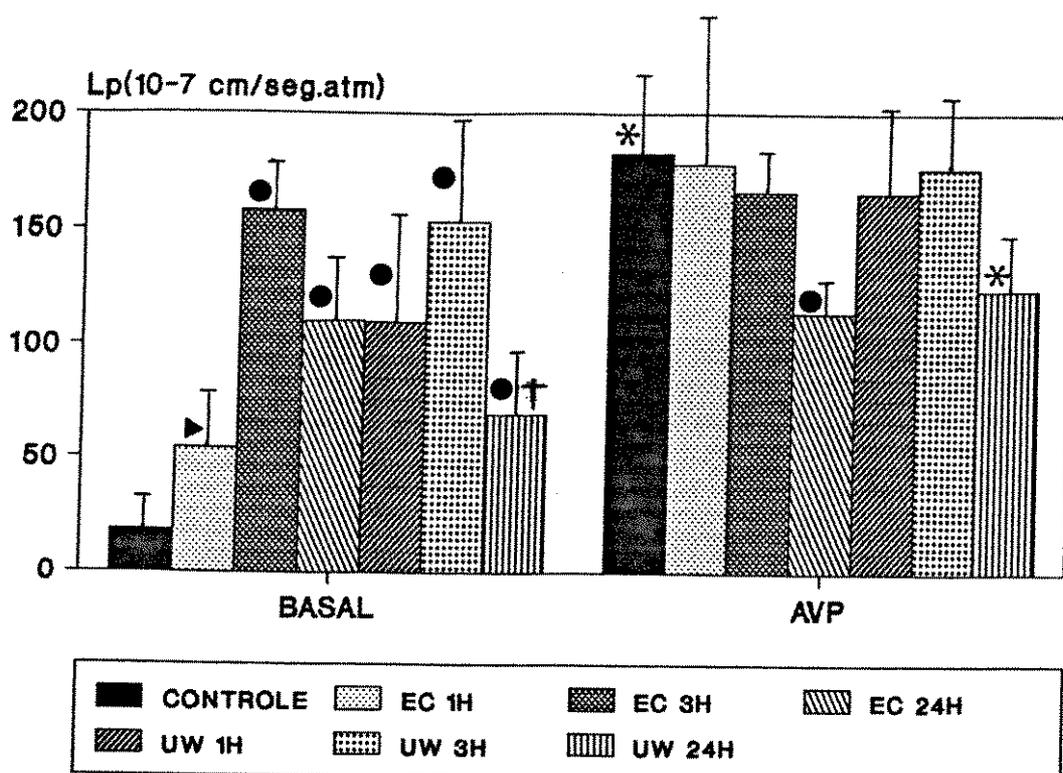


Figura 11 - Representação gráfica dos valores médios (\pm EPM) da condutividade hidráulica de TCCs não conservados (controle) e conservados diretamente durante uma, 3 e 24 horas nas soluções de Collins, de Euro-Collins e da Universidade de Wisconsin, a 4°C. * teste t pareado ($p < 0,05$): Basal x AVP; ● teste t não pareado ($p < 0,05$): Controle x Conservados; † teste t não pareado ($p < 0,05$): 3 \neq 24 horas (UW); ► análise de variância (ANOVA) ($p < 0,05$): 1 \neq 3 e 24 horas (EC)

Por outro lado, no período de estimulação com arginina-vasopressina, nenhum dos valores encontrados difere estatisticamente daquele encontrado no grupo controle. Se fôssemos analisar somente esse período de estimulação, poderíamos dizer que em todos os grupos houve uma ótima função tubular e que, portanto, ambas as soluções conservaram bem esses segmentos do néfron.

Porém, quando se observa o incremento na L_p após estimulação hormonal, verifica-se que, exceto os túbulos conservados

em solução de Euro-Collins durante uma hora, todos os outros apresentaram uma queda ($p < 0,05$) no incremento da Lp, em relação ao controle. Assim, quando comparado ao controle, esses dados parecem indicar que somente túbulos isolados conservados em solução de Euro-Collins durante uma hora mantêm boa função celular. No entanto, quando se compararam as duas soluções, não se obtiveram diferenças estatísticas entre elas. Esses resultados nos mostram que há uma grande variabilidade individual entre os túbulos de um mesmo rim e que cada túbulo reage de maneira diferente à conservação nessas soluções.

Para se entender um pouco mais o que se passa com essas células no processo de conservação, levando-se em conta a elevada condutividade hidráulica no período basal, observada após 3 horas de conservação direta na solução de Euro-Collins, decidiu-se a estudar como se encontrava a permeabilidade difusional à água, ou seja, o fluxo de água nesse epitélio, sem a força de um gradiente osmótico. Os resultados estão representados na tabela 14 e figura 12.

A permeabilidade difusional média em túbulos coletores corticais não conservados (grupo controle), no período basal, quando os túbulos foram perfundidos a um fluxo médio de perfusão de $21,9 \pm 1,9$ nl/min, foi de $93,2 \pm 17,2 \times 10^{-5}$ cm/s. Quando se adicionaram 200 μ U/ml de arginina-vasopressina ao banho peritubular, a permeabilidade difusional elevou-se de forma significativa ($p < 0,05$) para $209,1 \pm 44,4 \times 10^{-5}$ cm/s. O fluxo de perfusão, nesse período, não se alterou, passando para $25,0 \pm 1,5 \times 10^{-5}$ cm/s. Esses dados estão de acordo com os dados da literatura (SCHAFER & ANDREOLI, 1972; ROCHA & KOKKO, 1974; HEBERT & ANDREOLI, 1980; HALL & GRANTHAM, 1980).

TABELA 14. Permeabilidade difusional (P_{dv}) de túbulos coletores corticais não conservados (grupo controle) e de túbulos coletores incubados durante 3 horas em câmaras especiais de conservação contendo, solução de Euro-Collins, a 4°C

| Grupos | Fluxo de perfusão (nl/min) | | Permeab. Difusional ($P_{dv} - 10^{-5}$ cm/s) | | A_2 (cm ²) |
|--|----------------------------|-------------------|--|----------------------|--------------------------|
| | Basal | AVP | Basal | AVP | |
| CONTROLE | 20,9 | 27,9 | 68,3 | 298,9 | 5,9 |
| | 27,4 | 27,1 | 61,3 | 89,9 | 8,8 |
| | 19,1 | 23,5 | 109,6 | 246,2 | 9,8 |
| | 20,1 | 21,6 | 133,8 | 201,5 | 9,8 |
| $\bar{X} \pm EPM$ | 21,9 $\pm 1,9$ | 25,0 $\pm 1,5$ | 93,2 $\pm 17,2$ | 209,1* $\pm 44,4$ | 8,6 $\pm 0,9$ |
| CONSERVAÇÃO 3 HS EURO-COLL | 22,5 | 20,8 | 87,7 | 124,1 | 6,9 |
| | 20,2 | 22,8 | 164,5 | 190,7 | 8,8 |
| | 23,4 | 24,5 | 128,8 | 91,3 | 6,9 |
| | 25,0 | 25,7 | 221,4 | 142,4 | 8,8 |
| | 22,3 | 22,7 | 158,8 | 158,0 | 12,8 |
| | 22,3 | 25,4 | 132,3 | 174,8 | 11,8 |
| $\bar{X} \pm EPM$ | 22,6 $\pm 0,6$ | 23,7 $\pm 0,8$ | 148,9● $\pm 18,3$ | 146,9 $\pm 14,7$ | 9,3 $\pm 1,0$ |

$\bar{X} \pm EPM$

* teste t pareado ($p < 0,05$): Basal x AVP

● teste t não pareado ($p < 0,05$): Controle x Conservados

Túbulos coletores corticais isolados e incubados diretamente durante 3 horas, em câmaras especiais, contendo solução de Euro-Collins, a 4°C e perfundidos com um fluxo médio de $22,6 \pm 0,6$ nl/min, no período basal, apresentaram uma permeabilidade difusional média de $148,9 \pm 18,2 \times 10^{-5}$ cm/s. Após a estimulação com AVP, observou-se que a permeabilidade difusional não se alterou significativamente. O valor médio encontrado, no período AVP, foi de $146,9 \pm 14,7 \times 10^{-5}$ cm/s. Não houve também alteração no fluxo de perfusão, cujo valor médio, nesse período, foi de $23,7 \pm 0,8$ nl/min.

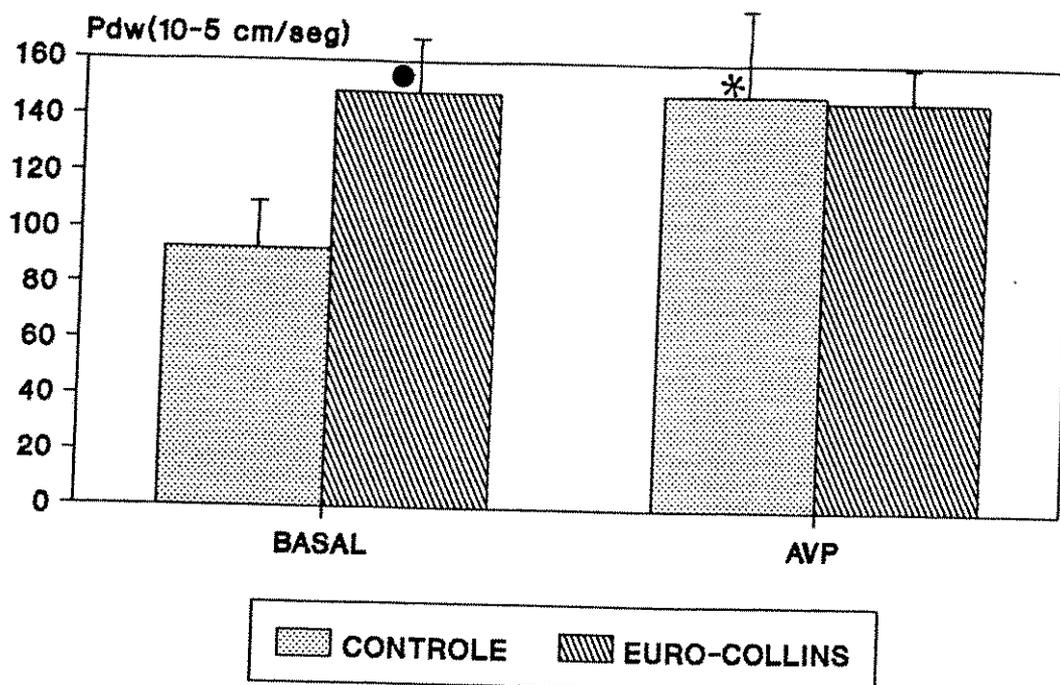


Figura 12 - Representação gráfica dos valores médios (\pm EPM) da permeabilidade difusional de TCCs não conservados (controle) e conservados durante 3 horas na solução de Euro-Collins, a 4°C. * teste t pareado ($p < 0,05$): Basal x AVP; ● teste t não pareado ($p < 0,05$): Controle x Conservados

Pode-se notar na tabela 14 que o valor médio de P_{dv} encontrado, no período basal, em túbulos conservados em solução de Euro-Collins durante 3 horas foi mais elevado ($p < 0,05$) do que o valor encontrado no grupo controle, no mesmo período. Quando se adicionou AVP, o valor da permeabilidade difusional à água, no grupo de conservação, permaneceu igual à P_{dv} do grupo controle, no período de estimulação hormonal. Porém, se considerarmos que, no grupo conservado, a P_{dv} basal já se encontrava elevada, verificamos que, na verdade, a AVP não estava agindo nesses túbulos. Tais achados nos confirmam aquilo que foi visto quanto à condutividade hidráulica nos

grupos conservados nessa solução, durante 3 horas. Assim, os dados podem indicar que a solução conservadora de Euro-Collins, quando em contato direto com o epitélio tubular, altera profundamente a permeabilidade desses túbulos à água, mesmo sem uma estimulação hormonal. Resta-nos, agora, saber em que nível a solução está agindo e se esse efeito é reversível pela administração do AMPc, que é o segundo mensageiro intracelular da AVP.

DISCUSSÃO

De uma forma geral, a literatura mostra que a conservação morfo-funcional adequada do tecido renal é um pré-requisito essencial para o sucesso do transplante desse órgão. Embora existam vários estudos demonstrando grande sucesso no reimplante de rins de cadáver, ainda se conhece muito pouco a respeito do efeito da conservação sobre as estruturas teciduais renais. A maioria dos estudos são feitos no rim inteiro, avaliando-se a sua função global. A técnica da microperfusão de túbulo isolado *in vitro* constitui-se num instrumento de bastante utilidade, uma vez que nos permite avaliar o efeito da conservação diretamente sobre o epitélio tubular sem a interferência de fatores extra-renais, além de nos informar a respeito de lesões de menores proporções, as quais não poderiam ser detectadas em estudos globais.

O armazenamento a frio após lavagem do órgão com soluções conservadoras tem sido o método escolhido pela maioria dos centros de transplante para a conservação de órgãos, por ser simples, relativamente barato e permitir o intercâmbio dos referidos órgãos. A qualidade da conservação depende de muitos fatores, dentre eles o tempo de conservação. O simples armazenamento a frio tem um limite de tempo específico, além do qual o órgão perde sua viabilidade

funcional. Dessa maneira, quanto maior o tempo de conservação, maior a incidência de retardo funcional e a ocorrência de necrose tubular aguda. Há ainda necessidade de se melhorar as técnicas de conservação, para diminuir os índices de lesão celular.

O metabolismo normal é um balanço entre as reações de biossíntese e degradação. Na ausência de oxigênio e de um suprimento contínuo de nutrientes, as reações de biossíntese estão suprimidas, devido à falta de energia; entretanto, muitas reações de degradação não requerem um contínuo suprimento de energia e podem continuar ocorrendo mesmo na hipotermia. O fato de órgãos armazenados por períodos de tempo relativamente mais curtos readquirirem a função metabólica normal mais rapidamente sugere que as reações de degradação estão ocorrendo dentro do limite da viabilidade funcional.

Neste trabalho, foi avaliado e comparado o efeito de diversas soluções conservadoras utilizadas na clínica para o armazenamento de rins para transplante, bem como o efeito do tempo de conservação nessas soluções sobre a resposta hidrosmótica de túbulos coletores corticais de coelho.

O túbulo coletor exerce um papel decisivo no controle fino da excreção de água e eletrólitos. Esse segmento é responsivo à vasopressina (hormônio antidiurético - HAD), a qual exerce seu efeito via receptor V_2 acoplado à membrana basolateral, estimulando a adenil-ciclase e aumentando a concentração de intracelular de AMP cíclico. Na ausência de hormônio antidiurético, a membrana apical é muito impermeável à água. Em resposta a um aumento na concentração intracelular de AMPc, estimulado pela vasopressina, há um aumento na permeabilidade da membrana apical à água, provavelmente pela inserção ou ativação, nessa membranas, de canais de água (SCHAFFER & ANDREOLI, 1972; ROY & AUSIELLO, 1981; MOREL e col, 1987; HANDLER e col, 1988).

A resposta ao HAD ocorre e é revertida dentro de minutos quando o hormônio é, respectivamente, adicionado ou retirado, sendo a meia-vida desse hormônio no organismo também de alguns minutos (HANDLER, 1988).

Essas qualidades do túbulo coletor e a resposta ao HAD podem, portanto, constituir elementos importantes na avaliação funcional durante o processo de correlação desses segmentos do néfron. Na discussão dos dados, vamos avaliá-los da seguinte forma:

- Conservação de fragmentos:

Os dados obtidos na conservação de fragmentos mostram que há uma grande variabilidade nos valores individuais de condutividade hidráulica de túbulos coletores corticais no período basal. Esses dados poderiam ser explicados de duas maneiras. A primeira delas é que os túbulos estariam reagindo de maneiras diferentes à conservação, indicando que deve haver uma heterogeneidade na população de néfrons do rim. Esses resultados estão de acordo com aqueles encontrados por NORLENS e col (1978) onde, através de estudos de micropunção em rins de ratos conservados, encontraram-se três populações de néfrons, que diferiam entre si em relação à pressão intratubular. Alguns grupos apresentavam pressão normal, outros não apresentavam pressão e estavam colabados, e outros, ainda, apresentavam uma pressão muito elevada, provavelmente por causa de alguma obstrução luminal. Da mesma maneira, FALKENSTEIN (1982) trabalhando com microperfusão de túbulos contornados proximais de coelho encontrou duas populações de néfrons, quando perfundiu com solução de Collins a 10°C: uma que recuperou a função tubular após a

conservação e outra que não a recuperou, após a conservação.

Uma outra hipótese para a variabilidade na resposta hidrosmótica encontrada seria o fato de que as soluções conservadoras estariam entrando em contato realmente com apenas alguns túbulos e, assim, estariam conservando melhor esses túbulos, ao passo que os outros já estariam em processo de lesão e morte celular.

Os túbulos provenientes de fragmentos conservados durante uma hora nas três soluções apresentaram, no período basal, uma morfologia muito semelhante entre si, onde as células se encontram com o seu volume bastante elevado (figura 8). Porém, somente túbulos coletores obtidos de fragmentos conservados em Collins e Euro-Collins mostraram uma alteração na função tubular nesse período em relação ao controle, sem conservação, com um aumento na permeabilidade osmótica à água. Isso poderia indicar que as soluções de Collins e Euro-Collins estariam conservando o hormônio antidiurético endógeno dos túbulos durante uma hora de conservação. Essa hipótese, no entanto, é discutível, uma vez que esses experimentos foram realizados após um período de equilíbrio, a 37°C para depleção do HAD endógeno.

LAKEY e col (1991) observaram que ilhotas de Langerhans isoladas de pâncreas conservados durante 24 horas na solução de Wisconsin apresentavam um nível basal de secreção de insulina elevado em relação ao controle. Esses autores também notaram que havia um atraso na resposta das ilhotas em retornar aos níveis basais seguindo a estimulação com glicose e sugeriram que a conservação levava a uma deterioração na habilidade das ilhotas em reconhecer precisamente as variações nos níveis de glicose e "desligar" a

secreção de insulina. Da mesma forma, a conservação de túbulos coletores corticais poderia estar alterando o reconhecimento à vasopressina modificando a sua resposta hidrosmótica.

Poder-se-ia pensar, por outro lado, que as soluções de Collins e Euro-Collins estariam causando algum tipo de lesão celular que alteraria a estrutura da membrana e, conseqüentemente, sua permeabilidade à água mesmo na ausência de AVP exógeno.

Entretanto, o aumento na condutividade hidráulica observado no período basal não impediu uma resposta efetiva à AVP, como pode ser visto pelo incremento na condutividade hidráulica em resposta ao hormônio após uma hora de conservação.

O primeiro passo na iniciação da resposta hidrosmótica da vasopressina é sua ligação com o receptor na membrana basolateral (ROY & AUSIELLO, 1981). Isso significa que qualquer alteração na estrutura dessa membrana poderia comprometer os receptores que, por sua vez, se tornariam incapacitados de fazer a ligação com o hormônio e, portanto, não poderiam desencadear a cascata de eventos decorrentes dessa ligação, que culminaria na inserção ou ativação de canais de água na membrana apical. No entanto, se considerarmos que uma hora é um tempo relativamente curto de conservação e que, durante o processo de dissecação tubular são escolhidos os túbulos mais viáveis, poder-se-ia pensar que, se houve algum tipo de lesão na membrana, esta não foi suficientemente grande para impedir que a vasopressina exercesse seu efeito. De acordo com os resultados nota-se que os valores médios de condutividade hidráulica encontrados nos grupos de fragmentos conservados em solução de Collins e Euro-Collins, após o estímulo com AVP, são discretamente, mas não significativamente, mais elevados em relação ao grupo controle. Esse fato sugere que essa discreta elevação na resposta hidrosmótica, em

relação ao controle seria o produto de um efeito sinérgico entre a ação da vasopressina e os canais de água "abertos" por pequenas lesões de membrana.

Após 24 horas de conservação nas soluções de Collins e Euro-Collins, no período basal, as células não apresentaram nem aumento de volume e nem de condutividade hidráulica. Entretanto, a estimulação com AVP também não provoca nenhuma alteração, nem na morfologia, nem na função, sugerindo que esses túbulos perderam a capacidade funcional. Assim, de maneira geral, túbulos coletores corticais provenientes de fragmentos renais conservados nas soluções de Collins e Euro-Collins, apesar de alterarem a permeabilidade da membrana na ausência de AVP exógeno, respondem ao estímulo com AVP após uma hora de conservação, mas após 24 horas perdem a viabilidade funcional, sendo que a solução de Euro-Collins parece ser a que produz uma resposta ligeiramente (embora não significativa) menor ao estímulo com AVP após 24 horas, indicando ser essa solução conservadora menos efetiva.

Os túbulos coletores provenientes de fragmentos conservados na solução da Universidade de Wisconsin durante uma e 24 horas não provocaram alterações significativas na condutividade hidráulica no período basal, além de responderem ao estímulo hormonal do mesmo modo que o controle. Dessa forma, embora os túbulos apresentassem, morfologicamente, um aumento de volume celular, essa solução foi a que apresentou melhores resultados de conservação mesmo após 24 horas.

A permeabilidade à água em resposta à vasopressina e a sua reversão quando o hormônio é retirado requer um sistema de citoesqueleto intacto (HANDLER, 1988). A estimulação com AVP relaxa o citoesqueleto apical de maneira que, quando a água entra na célula

através da membrana apical durante o fluxo de água transcelular apical-basolateral, a porção apical da célula incha mais e está mais diluída do que o pólo basal. Isto faz com que algumas organelas (tais como as mitocôndrias) localizadas na porção basal da célula, fiquem mais ou menos protegidas da hipotonicidade. Quando, porém, há aumento de volume celular, principalmente na pólo basal, como resultado da entrada de água através da membrana basolateral, as mitocôndrias sofrem deformações, que podem alterar suas funções (DiBONA, 1983). Como podemos observar na figura 8, os túbulos obtidos de fragmentos conservados durante uma hora apresentaram um aumento de volume celular, principalmente no pólo basal. Isto poderia trazer grandes prejuízos para as mitocôndrias e, assim, comprometer o posterior funcionamento da célula. Apesar do "inchaço" celular, os túbulos dissecados dos fragmentos conservados por uma hora nas soluções de Collins, Euro-Collins e Universidade de Wisconsin apresentaram uma resposta hidrosmótica à vasopressina normal, semelhante ao controle. Isto sugere que o tempo de conservação de uma hora é muito curto para comprometer a viabilidade funcional. Um tempo de conservação de 24 horas seria, então, suficiente para que as células já tivessem passado da fase inicial de alteração de volume celular e tivessem perdido sua capacidade funcional. De fato, os resultados mostraram que os túbulos provenientes de fragmentos conservados em solução de Collins e Euro-Collins não respondem ao estímulo com AVP após 24 horas de conservação.

Parece, então, que a primeira fase a ocorrer durante a conservação é o aumento de volume celular, sendo que somente os fragmentos conservados em solução de Wisconsin, apesar de ocasionar aumento do volume da célula após uma hora de conservação, conseguem manter a função tubular. O aumento do volume celular é uma das

principais vias que levam à morte celular, uma vez que causa a ruptura da arquitetura da célula. Além disso, essa alteração de volume provoca lesões de membrana, que podem inibir as reações de algumas enzimas vitais ligadas às membranas e também podem alterar a permeabilidade das mesmas (DOWNES e col, 1973; PEGG, 1977; JAMART & LAMBOTTE, 1982). JAMART e LAMBOTTE (1983) investigaram a eficiência da solução de Euro-Collins em prevenir o "inchaço" celular. Esses autores armazenaram rins inteiros nessa solução e demonstraram que ocorre um marcado aumento do volume celular entre 48 e 72 horas de conservação. Além disso, o volume da célula foi reduzido quando se substituiu glicose por sacarose. Eles deduziram, então, que o aumento de volume celular que ocorre entre 48 e 72 horas de conservação seria devido à penetração de glicose na célula e que a sacarose seria, desse modo, um agente osmótico mais efetivo, por não penetrar na célula. Os autores sugeriram também que a conservação na solução de Euro-Collins acarretaria, após 48 horas, uma deterioração na membrana, a qual se processaria em dois passos: inicialmente, ocorreria uma lesão que permitiria a entrada de glicose na célula. No segundo passo, a permeabilidade da membrana estaria tão aumentada que a célula não poderia mais reter certos componentes. Isto vem confirmar os resultados do presente trabalho sobre o aumento do volume celular e posterior perda funcional dos TCCs. No caso deste trabalho, pode-se sugerir que os efeitos nocivos são sentidos em tempos menores de conservação, porque a solução entrou em contato direto com o epitélio tubular mais rapidamente, uma vez que foram conservados fragmentos renais e não o órgão inteiro.

A solução de Wisconsin apresenta lactobionato no lugar de glicose em sua composição. E isso pode ser um dos fatores que expliquem os achados de valores menores na condutividade hidráulica

na ausência de estímulo hormonal. Além disso, essa solução possui várias outras substâncias osmoticamente ativas, como o lactobionato, que auxiliam no controle do aumento do volume celular.

Além do mais, a solução de Wisconsim possui substâncias, tais como a adenosina, capazes de fornecer substrato energético para as células.

Embora, nas condições experimentais deste trabalho, o rim não tenha passado por um período de isquemia quente maior que 5 minutos, durante a conservação os fragmentos permaneceram em isquemia fria. A hipóxia decorrente dessa isquemia aumenta a concentração intracelular de cálcio (BRY et. al., 1984; SNOWDOWNE et. al., 1985). Existem trabalhos que demonstram que o aumento no cálcio intracelular provoca uma diminuição na condutividade hidráulica, em resposta ao estímulo com AVP (AUSIELLO & HALL, 1981; ANDO et. al., 1988; JONES et. al., 1988; ISHIKAWA & SATTO, 1990). Esse seria também um fator que poderia estar causando uma inibição na resposta à vaoprecina, principalmente após 24 horas de conservação.

Um outro aspecto que deve ser considerado é o fato de que a própria hipotermia causa uma inibição na condutividade hidráulica, em resposta ao estímulo com AVP. HALL e GRANTHAM (1980) demonstraram que o aquecimento a 37°C de túbulos coletores corticais de coelho na ausência de vaopressina, seguido pelo resfriamento a 25°C com estímulo hormonal levavam a uma inibição na condutividade hidráulica, sendo que a adição de AMP cíclico não reverteu esse efeito.

Estudos anteriores com túbulos contornados proximais e pars-rectas provenientes de fragmentos conservados em solução de Collins mostraram que esses segmentos do néfron eram mais resistentes à conservação, mantendo sua viabilidade funcional por, aproximadamente, 72 horas (pars-recta) e 96 horas (túbulos proximais)

(FALKENSTEIN, 1984). Neste estudo, porém, observou-se que, após 24 horas de conservação, havia uma queda na função de TCCs, sugerindo-se, portanto, comportamentos diferentes das estruturas celulares de cada segmento do néfron.

Dessa forma, todos esses fatores devem ser considerados nos estudos de conservação, além do próprio efeito das soluções sobre os túbulos.

- Conservação direta em câmaras especiais

Quando se conserva fragmentos renais, não se pode ter a certeza de que todos os túbulos entraram em contato com a solução conservadora ou se entraram imediatamente em contato com a solução. Assim, durante a dissecação, aqueles túbulos inviáveis são descartados, fazendo-se a seleção dos mais viáveis. Na conservação direta, esse fator de seleção é eliminado. Os túbulos são colocados em contato direto com a solução conservadora. Nesse caso, a solução pode, inclusive, penetrar a luz tubular e afetar a integridade do túbulo. FIGUEIREDO e col (1986) trabalhando com túbulos proximais, verificaram que a solução de Collins, quando em contato direto com o lado luminal desses túbulos, acarretava uma diminuição da função com lesão tubular. Da mesma forma, os resultados desse trabalho mostraram que o contato direto da solução conservadora com o epitélio de túbulos coletores corticais modifica a permeabilidade da membrana.

Após a conservação direta de TCCs na solução de Euro-Collins, a função tubular é mantida apenas por uma hora de conservação, sendo que, após 3 e 24 horas, há um aumento na condutividade hidráulica no período basal, o que resulta em uma queda

no ΔL_p , isto é, há uma queda na estimulação efetiva da condutividade hidráulica pelo AVP, porque o valor de L_p do período basal está aumentado. Em 1987, RIBEIRO e col., trabalhando com túbulo coletor medular, não encontraram alteração na responsividade à vasopressina após 30 minutos de conservação direta na solução de Euro-Collins. Da mesma forma, FALKENSTEIN (1990) observou que túbulos coletores corticais conservados diretamente na solução de Euro-Collins mantinham sua viabilidade funcional após 30 minutos de conservação.

Em condições experimentais semelhantes às deste trabalho, SILVA (1991) não encontrou alteração na absorção de fluido de Pars recta, após uma e duas horas de conservação; mas, após 24 horas, havia queda na absorção de fluido, com alterações morfológicas tais como edema e descamação do tecido epitelial.

A solução de Wisconsin provoca um aumento na condutividade hidráulica no período basal após uma e três horas de conservação. Após 24 horas, a condutividade hidráulica diminui em relação às 3 horas, porém continua elevada em relação ao controle. Os valores de condutividade hidráulica encontrados após uma, 3 e 24 horas de conservação nesse grupo no período de estimulação com vasopressina, estão todos dentro dos valores funcionais normais, porém a estimulação efetiva causada pela vasopressina é menor que o controle. Isto ocorre porque o valor basal se encontra elevado.

De maneira geral, os resultados sugerem que a solução da Universidade de Wisconsin conserva melhor túbulos isolados por até 24 horas, nessa preparação.

A conservação direta em câmaras especiais ocasiona uma queda maior na função tubular, após 24 horas, do que a conservação de fragmentos. Isto indica que as soluções conservadoras possuem um efeito prejudicial maior quando em contato direto com o epitélio

tubular do que quando em contato com o fragmento, onde temos interstício e epitélio tubular. Essa queda na função do túbulo coletor pode, talvez, ocorrer durante a conservação global do órgão e, por isso, em alguns casos, no pós-transplante renal, se observa uma poliúria que requer tratamento e observação clínica do paciente.

Como se pode observar pelos dados obtidos, após 3 horas de conservação, os túbulos conservados diretamente nas soluções de Euro-Collins e de Wisconsin apresentaram um valor máximo de condutividade hidráulica no período basal, além de mostrarem o aspecto morfológico de aumento de volume celular, principalmente no pólo basal. Levando-se em conta esse fato, decidiu-se a estudar a permeabilidade difusional à água, isto é, o fluxo de água sem a presença de um gradiente osmótico em túbulos coletores corticais isolados e conservados diretamente na solução de Euro-Collins durante 3 horas. Os resultados encontrados mostraram que há um aumento na condutividade hidráulica, mesmo na ausência de vasopressina exógena, o que vem confirmar a hipótese de que essa solução realmente leva a uma alteração na permeabilidade da membrana celular, ou seja, a água está atravessando a membrana por outras vias que não os canais de água dependentes de receptores de hormônio antidiurético. Talvez uma lesão esteja "abrindo" buracos na membrana, por onde a água possa passar.

FALKENSTEIN (1990) também observou uma elevação na condutividade hidráulica no período basal em túbulos coletores corticais conservados diretamente em solução de Collins e Euro-Collins, a 10°C, durante 30 minutos. Esses dados juntamente com os deste trabalho, sugerem que, em poucos minutos de conservação, já começa a ocorrer uma alteração da permeabilidade da membrana sem o estímulo com AVP, em TCCs conservados diretamente em solução de

Euro-Collins.

Túbulos coletores corticais conservados diretamente na solução de Wisconsin, apesar de apresentarem um aumento na permeabilidade osmótica na ausência de estímulo hormonal, mantêm uma melhor e mais constante resposta efetiva à AVP (ΔLp).

Finalmente, estes dados interpretados através dos parâmetros medidos, mostram comportamentos diferentes das soluções sobre a função celular tubular em diversas manobras utilizadas no modelo. No entanto, os mecanismos intrínsecos bioquímicos e estruturais pelos quais está ocorrendo o fenômeno ainda necessitam de estudos mais complexos, objetivando as várias passagens que alteraram os parâmetros deste trabalho.

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Neste trabalho foi testado o efeito da conservação de fragmentos renais nas soluções de Collins, Euro-Collins e Universidade de Wisconsin, a 4°C, durante uma e 24 horas e o efeito da conservação tubular direta nas soluções de Euro-Collins e Universidade de Wisconsin, a 4°C, sobre a função de túbulos coletores corticais (TCCs) de coelho.

A função tubular foi medida através da condutividade hidráulica (Lp) de TCCs perfundidos com a técnica da microperfusão de túbulo isolado *in vitro*.

Também foi avaliada a permeabilidade difusional à água (Pd) de TCCs conservados diretamente na solução de Euro-Collins, a 4°C, durante 3 horas.

Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que:

- há uma heterogeneidade na conservação da população de néfrons do rim, sendo que os túbulos reagem de maneiras diferentes à conservação do fragmento renal;

- essa heterogeneidade pode ser devido à própria diferença entre a população de néfrons ou pode ocorrer por causa do maior ou menor contato com a solução conservadora;

- a conservação dos fragmentos nas soluções de Collins,

Euro-Collins e de Wisconsin, a 4°C, durante uma hora leva a um aumento na permeabilidade osmótica à água, na ausência de vasopressina exógena. Apesar disso, quando há o estímulo com vasopressina, os túbulos respondem efetivamente;

- após 24 horas, somente mantém resposta efetiva à vasopressina os túbulos provenientes de fragmentos conservados na solução de Wisconsin. Os túbulos provenientes de fragmentos conservados nas soluções de Collins e Euro-Collins perdem as características de permeabilidade à água;

- o aumento da permeabilidade, na ausência de estímulo hormonal, após uma hora de conservação pode ser decorrente de lesão celular causada por aumento do volume, o que, após 24 horas, ocasiona perda de viabilidade funcional;

- túbulos coletores corticais isolados conservados diretamente na solução de Euro-Collins mantém boa função celular apenas por uma hora de conservação; à medida que aumenta o tempo de conservação (3 e 24 horas), há uma queda na função tubular;

- túbulos coletores corticais isolados conservados diretamente na solução de Wisconsin mantém uma melhor função tubular do que os conservados em Euro-Collins; a função tubular é baixa em relação ao controle, porém é mais uniforme;

- a conservação direta durante uma, 3 e 24 horas em ambas as soluções de Euro-Collins e de Wisconsin levam a um aumento na permeabilidade osmótica, na ausência de estímulo hormonal; porém, os valores mais altos de condutividade hidráulica são encontrados após três horas de conservação direta;

- a permeabilidade difusional à água em TCCs isolados conservados diretamente na solução de Euro-Collins durante 3 horas se encontra muito elevada na ausência de vasopressina, indicando que a

solução provoca alteração na permeabilidade da membrana tubular, talvez com lesão celular;

- a conservação produz um efeito prejudicial maior quando em contato direto com o epitélio tubular do que quando em contato com o fragmento, onde temos interstício mais epitélio tubular;

- quanto maior o tempo de conservação, pior será a resposta tubular à estimulação da permeabilidade hídrica pela AVP, tanto em túbulos conservados diretamente, quanto em túbulos provenientes de fragmentos conservados nas soluções de Collins e Euro-Collins;

- a solução da Universidade de Wisconsin conserva melhor a função, tanto em túbulos isolados quanto naqueles provenientes de fragmentos conservados por até 24 horas, nesta preparação.

SUMMARY

This work was designed to study the effect of several cold preservation solutions on the hydraulic conductivity (L_p) of cortical collecting tubules (CCTs), using the microperfusion technique of isolated tubules *in vitro*. In the first protocol, rabbit renal slices were preserved in Collins, Euro-Collins and University of Wisconsin (UW) solutions at 4°C, during 1 or 24 hours. The results showed that after 1 hour of cold preservation with these solutions there was no statistical difference in CCTs function compared with the control group. After 24 hours, CCTs obtained from slices preserved in UW solution showed the best function when compared with Collins and Euro-Collins solutions. In the other protocol, it was possible to verify the direct effect of these solutions upon the L_p of the CCT tubular epithelial layer. Therefore, CCTs were isolated from fresh, not preserved slices, and then incubated during 1, 3 and 24 hours in special preservation chambers, which contained Euro-Collins or UW solution at 4°C. There was no difference in CCTs function after 1 hour preservation in these solutions. After 3 hours of preservation there was an increase in the basal L_p from CCTs preserved in both solutions, but only CCTs preserved in UW demonstrated effective

function following AVP stimulation. After 24 hours only CCTs preserved in UW showed normal function. By other hand, CCTs preserved in Euro-Collins solution presented an elevated L_p in the basal period, and being responsiveless to AVP. This seems indicate that Euro-Collins solution may change the water permeability of the cellular membrane of the renal epithelium. These data was confirmed by the study of water diffusional permeability (P_{dw}) of isolated CCTs preserved in chambers with Euro-Collins solution at 4°C during 3 hours. The data of P_{dw} showed an increase in the basal P_{dw} and absence of response to AVP, when compared with the control group.

This results led us to conclude that UW solution is more effective than Collins and Euro-Collins solutions in the maintenance of CCTs function, when they are obtained from preserved renal slices. The direct contact of the tubular epithelium layer with Euro-Collins and UW solution resulted in an alteration of the water permeability properties of cellular membrane which was more relevant with Euro-Collins solution.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACQUATELLA, H.; PEREZ-GONZALEZ, 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. ANDO, Y.; BREYER, M.D.; JACOBSON, H.R. - *Dose-dependent heterogenous action of vasopressin in rabbit cortical collecting ducts.* AM J PHYSIOL, 256: F556- F562, 1989.
4. ANDO, Y.; JACOBSON, H.R.; BREYER, M.D. - *Phorbol ester and A23187 have additive but mechanistically separate effects on vasopressin action in rabbit collecting tubule.* J CLIN INVEST, 81: 1578-1584, 1988.
5. AUSIELLO, D.A. & HALL, D. - *Regulation of vasopressin sensitivity adenylate cyclase by calmodulin.* J BIOL CHEM,

256(19): 9796-9798, 1981.

6. BELZER, F.O.; ASHBY, B.S.; DUNPHY, J.E. - *24-Hour and 72-hour preservation of canine kidneys.* LANCET, 9: 536-539, 1967
7. BELZER, F.O.; SOUTHARD, J.H. - *The future of kidney preservation.* TRANSPLANTATION, 30(3): 161-164, 1980.
8. BELZER, F.O.; GLASS, N.R.; SOLLINGER, H.W.; SOUTHARD, J.H. *A new perfusate for kidney preservation.* TRANSPLANTATION, 33(3): 322-323, 1982.
9. BELZER, F.O.; SOLLINGER, H.W.; GLASS, N.R.; MILLER, D.T.; HOFFMANN, P.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. - *Organ preservation and transplantation.* TRANSPLANTATION APPROACHES TO GRAFT REJECTION, pages 291-303, Alan R. Liss Inc, 1986.
11. BELZER, F.O.; SOUTHARD, J.H. - *Principles of solid organ preservation by cold storage.* TRANSPLANTATION, 45(4): 673-676, 1988.
12. 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.

13. BESARAB, A.; MARTIN, G.B.; MEAD, T.; JARREL, B.; WESSON, L. - *Effect of plasma proteins and buffer in flushing solution on rat kidney preservation by cold storage.* TRANSPLANTATION, 37(3): 239-245, 1984.
14. BREYER, M.D. - *Regulation of water and salt transport in collectin duct through calcium-dependent signaling mechanisms.* AM J PHYSIOL, 260(29): F1-F11, 1991.
15. BRY, W.I.; 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.
16. BURG, M.B.; ORLOFF, J. - *Active cation transport by kidney tubules at 0°C.* AM J PHYSIOL, 207(5): 983-988, 1964.
17. BURG, M.B.; GRANTHAM, J.; ABRAMOW, M.; ORLOFF, J. - *Preparation and study of fragments of single rabbit nephrons.* AM J PHYSIOL, 210(6): 1293-1298, 1966.
18. CAMPBELL, H.T.; BELLO-REUSS, E.; KLAHR, S. - *Hydraulic water permeability and tranepithelial voltage in the isolated perfused rabbit cortical collecting tubule following acute unilateral ureteral obstruction.* J CLIN INVEST, 75: 219-225, 1985.
19. CLARK, E.A. ; MICKEY, M.R.; OPELZ, G.; TERASAKI, P.I. - *Evaluation of Belzer and Collins kidney preservation methods.* LANCET, 17: 361-363, 1973

20. COFER, J.B.; KLINTMALM, G.B.; HOWARD, T.K.; MORRIS, C.V.; HSBERG, B.S.; GOLDSTEIN, R.M.; GONWA, T.A. - *A comparisson of UW with Euro-Collins preservation solution in liver transplantation.* TRANSPLANTATION, 49(6): 1088-1093, 1990.
21. COFFEY, A.K. & ANDREWS, P.M. - *ultrastructure of kidney preservation: varying the amount of an effective osmotic agent in isotonic and hypertonic preservation solutions.* TRANSPLANTATION, 35(2): 136-143, 1983.
22. COGAN, E. & ABRAMOW, M. - *Inhibition by lithium of the hydroosmotic action vasopressin in the isolated perfused cortical collecting tubule of the rabbit.* J CLIN INVEST, 77: 1507-1514, 1986.
23. 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.
24. COLLINS, G.M. & HALASZ, N.A. - *Composition of intracellular flush solutions for hypothermic kidney storage.* LANCET, 25: 220-224, 1975.
25. COLLINS, G.M.; BARRY, J.M.; MAXWELL, J.G.; SAMPSON, D.; WERF, B.A.V. - *The value of magnesium in flush solutions for human cadaveric kidney preservation.* J UROL, 131: 220-222, 1984.
26. COLLINS, G.M.; PETERSON, T.; WICOMB, W.N.; HALASZ, N.A. - *Experimental observation on the mode of action of*

- "intracellular" flush solution. J SURGICAL RES, 36(1): 1-8, 1984b.
27. DAHLAGER, J.I. & BILDE, T. - *The integrity of tubular cell function after preservation in Collins' or Sacks' solution.* TRANSPLANTATION, 21(5): 365-369, 1976.
28. DiBONA, D.R. - *Cytoplasmic involvement in ADH-mediated osmosis across toad urinary bladder.* AM J PHYSIOL, 245(14): C297-C307, 1983.
29. DILLIGHAM, M.A.; DIXON, B.S.; ANDERSON, R.J. - *Calcium modulates vasopressin effect in rabbit cortical collecting tubule.* AM J PHYSIOL, 252: F115-F121, 1987.
30. DIXON, B.S.; DILLINGHAM, M.A.; ANDERSON, R.J. - *Flow dependence of vasopressin-stimulated hydraulic conductivity in rabbit collecting tubule.* J LAB CLIN MED, 110(4): 454-459, 1987.
31. DOWNES, G.; HOFFMAN, R.; HUANG, J.; BELZER, F.O. - *Mechanism of action of washout solution for kidney preservation.* TRANSPLANTATION, 16(1): 46-53, 1973
32. DREIKORN, K.; HORSCH, R.; ROHL, L. - 48- to 96-hour preservation of canine kidneys by using the Euro-Collins solution. EURO UROL, 6: 221-224, 1980.
33. FALKENSTEIN, D.; CONTI, G.T.; AJZEN, H.; DRAIBE, S.A.; FIGUEIREDO, J.F. - *Properties of the isolated rabbit*

proximal convoluted tubule and pars recta after long-term storage in a modified Collins solution. BRAZ J MED BIOL RES, 15: 361-365, 1982.

34. FALKENSTEIN, D. - *Estudos da ação da solução preservadora de Collins em túbulos contornados proximais de coelhos isolados e perfundidos in vitro. Tese de mestrado na área de Biologia Molecular apresentada na Escola Paulista de Medicina, 1984.*
35. FALKENSTEIN, D. - *Efeitos de soluções conservadoras renais utilizadas no transplante clínico e experimental sobre a condutividade hidráulica de túbulos coletores corticais de coelho isolados e perfundidos "in vitro". Tese de doutorado na área de Biologia Molecular apresentada à Escola Paulista de Medicina, 1990.*
36. FERNANDO, A.R.; GRIFFITHS, J.R.; O'DONOGHUE, E.P.N.; WARD, J.P.; ARMSTRONG, D.M.G.; HENDRY, W.F.; PERRETT, D.; WICKHAM, J.G.A. - *Enhanced preservation on the ischaemic kidney with inosine. LANCET, 13: 555-557, 1976.*
37. FERNANDO, A.R.; ARMSTRONG, D.M.G.; GRIFFITHS, J.R.; HENDRY, W.F.; O'DONOGHUE, E.P.N.; WARD, J.P.; WATKINSON, L.E.; WICKHAM, J.E.A. - *Protective effect of inosine on the canine kidney during ischaemia. TRANSPLANTATION, 23(6): 504-505, 1977.*
38. FIGUEIREDO, J.F.; FALKENSTEIN, D.; DRAIBE, S.A.; SIGULEM, D.;

- RAMOS, O.L. - *The effect of Collins solution on the function and strctre of isolated proximal convoluted tubules from rabbit kidneys.* TRANSPLANTATION, 42(1): 80-83, 1986.
39. FREEMAN, B.A. & CRAPO, J.D. - *Biology of disease: free radical and tissue injury.* LAB INVEST, 47(5): 412-426, 1982.
40. FRINDT, G.; WINDHAGER, E.E.; TAYLOR, A. - *Hidroosmotic response of collecting tubules to ADH or cAMP at reduced peritubular sodium.* AM J PHYSIOL, 243: F503-F513, 1982.
41. FROMTER, E. - *Mechanism and regulation of ion transport in the renal collecting duct.* COMP BIOCHEM PHYSIOL, 90(4): 701-707, 1988.
42. GRANTHAM, J.J. & BURG, M.B. - *Effect of vasopressin and cyclic AMP on permeability of isolated collecting tubules.* AM J PHYSIOL, 211(1): 255-259, 1966.
43. GREEN, C.J.; HEALING, G.; LUNEC, J.; FULLER, B.J.; SIMPKIN, S. - *Evidence of free-radical induced damage in rabbit kidneys after simple hypothermic preservation and transplantation.* TRANSPLANTATION, 42(2): 161-165, 1986.
44. HALASZ, N.A. & COLLINS, G.M. - *Forty-eighth-hour kidney preservation.* ARCH SURG, 111: 175-177, 1976.
45. HALL, D.A. & GRANTHAM, J.J. - *Temperature effect on ADH response of isolated perfused rabbit collecting tubules.* AM

J PHYSIOL, 239: F595-F601, 1980.

46. HANDLER, J.S. - *Antidiuretic hormone moves membranes.* AM J PHYSIOL, 255: F375-F382, 1988.
47. HANLEY, M. - *Isolated nephrons segments in a rabbit model of ischemic acute renal failure.* AM J PHYSIOL, 239: F17-F23, 1980.
48. HEBERT, S.C. & ANDREOLI, T.E. - *Interactions of temperature and ADH on transport process in cortical collecting tubules.* AM J PHYSIOL, 238(7): F470-480, 1980.
49. HEFTY, T.; FRASER, S.; NELSON, K.; BARRY, J.; BENNET, W. - *Efficacy of UW vs Euro-Collins solution impaired cadaveric kidneys: a prospective study.* TRANSPLANTATION PROC, 23(5): 2370-2371, 1991
50. HELMAN, S.I.; GRANTHAM, J.J.; BURG, M.B. - *Effect of vasopressin on electrical resistance of renal cortical collecting tubules.* AM J PHYSIOL, 220: 1825-1832, 1971.
51. HELOU, C.M.B. - *Efeito da isquemia e métodos de preservação renal sobre a atividade Na-K-ATPase, fosfatase alcalina e da incorporação de para-aminohipurato "in vitro". Tese de doutorado na área de Nefrologia apresentada na Faculdade de Medicina da USP, 1988.*
52. HENDERSON, L.W.; NOLPH, K.D.; PUSCHETT, J.B.; GOLDBERG, M. -

Proximal tubular malfunction as a mechanism for diuresis after renal homotransplantation. NEW ENGL J MED, 279(9): 467-473, 1968.

53. HOFFMAN, R.M.; SOUTHARD, J.H.; LUTZ, M.; MACKETY, A.; BELZER, F.O. - *Synthetic perfusate for kidney preservation. ARCH SURG, 118: 919-921, 1983.*
54. HORSTER, M.F. & ZINK, H. - *Functional differentiation of the medullary collecting tubule: influence of vasopressin. KIDNEY INT, 22: 360-365, 1982.*
55. ISHIKAWA, S. & SAITO, T. - *Optimal concentration of cellular free calcium for AVP-induced cAMP in collecting tubules. KIDNEY INT, 37: 1060-1066, 1990.*
56. JABLONSKI, P.; HOWDE, B.; MARSHALL, V.; SCOTT, D. - *Evaluation of citrate flushing solution using the isolated rat kidneys. TRANSPLANTATION, 30(4): 239-243, 1980.*
57. JAMART, J. & LAMBOTTE, L. - *Differential effect of swelling and anoxia on kidney function and its consequences on the mechanism of action of intracellular organ preservation solution. TRANSPLANTATION, 34(4): 176-182, 1982.*
58. JAMART, J. & LAMBOTTE, L. - *Efficiency and limitation of Euro-Collins solution in kidney preservation. J SUR RES, 34(3): 195-205, 1983.*

59. JONES, S.M.; FRINDT, G.; WINDHAGER, E.E. - *Effect of peritubular [calcium] or ionomycin on hydroosmotic response of CCTs to ADH or cyclic AMP.* AM J PHYSIOL, 254(2 PART 2): F240-F253, 1988.
60. JOHNSON, R.W.G. - *The effect of ischaemic injury on kidney preserved for 24 hours before transplantation.* BRIT J SURG, 59(10): 765-770, 1972.
61. KOKKO, J.P. - *The role of the collecting duct in urinary concentration.* KIDNEY INT, 31: 606-610, 1987.
62. LAKEY, J.R.T.; WANG, L.C.H.; RAJOTTE, R.V. - *Optimal temperature in short-term hypothermic preservation of rat pancreas.* TRANSPLANTATION, 51: 977-981, 1991.
63. LODGE, J.P.; PERRY, S.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.
64. MADSEN, K.M. & TISHER, C.C. - *Structural-functional relationships along the distal nephron.* AM J PHYSIOL, 250(19): F1-F15, 1986.
65. MARSHALL, V.C. - *Renal preservation prior to transplantation.* TRANSPLANTATION, 30(3): 165-166, 1980.
66. MARSHALL, V.C.; JABLONSKI, P.; BIGZAS, M.; HOWDEN, B.O.; WALLS,

- K. - *Kidney preservation with UW solution: the nature of the impermeant.* TRANSPLANTATION PROC, 22(5): 2131-2132, 1990
67. 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, 1991.
68. MARTIN, D.R.; SCOTT, D.F.; DOWNES, G.L.; BELZER, F.O. - *Primary cause of unsuccessful liver and heart preservation. Cold sensivity of the ATPase system.* ANN SURG, 175(1): 111-117, 1972.
69. McCOY, R.N.; HILL, K.E.; AYON, M.; STEIN, J.H.; BURK, R.F. - *Oxidant stress following renal ischemia: changes in the glutathione redox ratio.* KIDNEY INT, 33: 812-817, 1988.
70. 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.
71. MOREL, F. & DOUCET, A. - *Hormonal control of kidney functions at the all level.* PHYSIOL REV, 66(2): 377-468, 1986
72. MOREL, F.; IMBERT-TEBOUL, M.; CHABARDES, D. - *Receptors to vasopressin and other hormones in the mammalian kidney.* KIDNEY INT, 31: 512-520, 1987.

73. MORGAN, D.B. - *Assessment of renal tubular function and damage and their clinical significance.* ANN CLIN BIOCHEM, 19: 307-313, 1982
74. MOUKARZEL, M.; BENOIT, 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.
75. NÖRLENS, B.J.; ENGBERG, A.; KALLSKOG, Ö; WOLLGAST, M. - *Nephron function of the transplanted rat kidneys.* KIDNEY INT, 14: 10-20, 1978.
76. 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.
77. OLTHOFF, K.M.; MILLES, J.M.; IMAGAWA, D.K.; NUESSE, B.J.; DERUS, L.J.; ROSENTHAL, J.T.; MILEWICZ, A.L.; BUSTTIL, R.W. - *Comparison of UW solution and Euro-Collins solution for cold preservation of human liver grafts.* TRANSPLANTATION, 49(2): 284-290, 1990.
78. OPELZ, G. & TERASAKI, P.I. - *Kidney preservation: perfusion*

versus cold storage. TRANSPLANTATION PROC. 8(1): 121-125, 1976.

79. PARKS, D.A.; BULKLEY, G.B.; GRANDER, D.N. - *Role of oxygen free radicals in shock, ischemia, and organ preservation.* SURGERY, 94(3): 428-432, 1983.
80. PEGG, D.E. - *The water and calcium content of nonmetabolizing perfused rabbit kidneys.* CRYOBIOLOGY, 14: 160-167, 1977.
81. PIRIE, S.C. & POTTS, D.J. - *Application of cold flush preservation to "in vitro" microperfusion studies of kidney tubules.* KIDNEY INT, 28: 982-984, 1985.
82. PIRIE, S.C. & POTTS, D.J. - *A comparison of the relative effectiveness of three transplant preservation fluids upon the integrity and function of rabbit proximal convoluted tubules perfused "in vitro".* CLIN SCI, 70: 443-452, 1986
83. PLOEG, R.J.; GOOSSEENS, D.; McANULTY, J.F.; SOUTHARD, J.H.; BELZER, F.O. - *Successful 72-hour cold storage of dog kidneys with UW solution.* TRANSPLANTATION, 46(2): 191-196, 1988.
84. PLOEG, R.J. - *Kidney preservation with UW and Euro-Collins solutions.* TRANSPLANTATION, 49(2): 281-284, 1990.
85. PORTEOUS, C.; STEWART, R.M.; FINDLAY, J.; AKYOL, M.; GIBBS, P.; MURRAY, G. - *Improved immediate renal allograft function*

following aggressive donor management and perfusion with UW solution. TRANSPLANTATION PROC, 2338-2340, 1991.

86. REIF, M.C.; TROUTMAN, S.L.; SCHAFER, J.A. - *Sustained response to vasopressin in isolated rat cortical collecting tubule. KIDNEY INT, 26: 725-732, 1984.*
87. RIBEIRO, R.C.J.; FALKENSTEIN, D.; AJZEN, H.; RAMOS, O.L.; FIGUEIREDO, J.F. - *Effect of preservation solutions on osmotic permeability (Lp) of papillary collecting duct (PCD). ABSTRACT Xth INT CONG of NEPHROL - London, 26-31 July: 603, 1987.*
88. ROCHA, A.S. & KOKKO, J. - *Permeability of medullary nephron segments to ureia and water: effect of vasopressin. KIDNEY INT, 6: 379-387, 1974*
89. ROSS, H.; MARSHALL, V.C.; ESCOTT, M.L. - *72-Hr canine kidney preservation without continuous perfusion. TRANSPLANTATION, 21(6): 498-501, 1976.*
90. ROTH, E.; TOTH, I.; TOROK, B. - *Histological features of stored kidneys after simple hypothermic perfusion solutions of different types. INT ROL NEPHROL, 6: 243-251, 1974.*
91. ROY, C. & ASIELLO, D.A. - *Characterization of (8-lysine) vasopressin binding sites on a pig kidney cell line (LLC-PK1). J BIOL CHEM, 256(7): 3415-3422, 1981.*

92. SACKS, S.A. & PETRITSCH, P.H. - *Canine kidney preservation used a new perfusate.* LANCET, 12: 1024-1028, 1973.
93. SACKS, S.A.; WOO, Y.C.; SMITH, R.B.; EHRLICH, R.M.; KAUFMAN, J.J. - *Magnesium: not essential for renal preservation by initial perfusion and hypothermic storage.* TRANSPLANTATION PROC, 10(1): 287-291, 1978.
94. SCHAFER, J.A. & ANDREOLI, T.E. - *The effect of antidiuretic hormone on water flows in isolated mammalian collecting tubules.* J CLIN INVEST, 51: 1264-1278, 1972.
95. SCHLUMPF, R.; MOREL, P.; LOVERAS, J.J.; CONDIE, R.M.; MATAS, A.; KURLE, J.; NAJARIAN, J.S.; SUTHERLAN, D.E.R. - *Examination of the role of the colloids hydroxyethylstarch, dextran, human albumin, and plasma proteins in a modified UW solution.* TRANSPLANTATION PROC, 23(5): 2362-2365, 1991.
96. SCHWEIZER, R.T. & SUTPHIN, B.A. - *Effect of different magnesium level in kidney preservation perfusate.* TRANSPLANTATION, 42(4): 225-226, 1982.
97. SEGAL, N.B. & GUTTMAN, F.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.
98. SIEGEL, N.J.; GLAZIER, W.B.; CHAUDRY, I.H.; GAUDIO, K.M.; LYTTON, B.; BAVE, A.E.; KASHGARIAN, M. - *Enhanced recovery*

from acute renal failure by the postischemic infusion of adenine nucleotides and magnesium chloride in rats. KIDNEY INT, 17: 338-349, 1980.

99. SILVA, L.A.C.V. - *Estudo da eficiência das soluções de Collins e Euro-Collins na conservação da função de Pars Recta (P3) do túbulo proximal de coelho isolado e perfundido "in vitro". Tese de mestrado na área de Ciências Biológicas apresentada no Instituto de Biologia da UNICAMP, 1991*
100. 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(4): 634, 1984.
101. SMITH, H.W. - *The Kidney: structure and function in health and disease.* New York. Oxford Univ. Press. pg 10, 1951
102. SNOWDOWNE, K.W.; FREUDENRICH, C.C.; BORLE, A. - *The effects of anoxia on cytosolic free calcium, calcium flushes and cellular ATP levels in cultured kidneys cells.* J BIOL CHEM, 260(21): 11619-11629, 1985.
103. SOUTHARD, J.H.; SENZIG, K.A.; HOFFMANN, R.M.; BELZER, F.O. - *Energy metabolism in kidney stored by simple hypothermia.* TRANSPLANTATION PROC, 9(3): 1535-1539, 1977
104. SOUTHARD, J.H.; RICE, M.J.; BELZER, F.O. - *Preservation of renal function by adenosine-stimulated ATP synthesis in*

hypothermically perfused dog kidneys. CRYOBIOLOGY, 22:
237-242, 1985

105. STOKES, J.B.; TISHER, C.C.; KOKKO, J.P. - *Structural functional heterogeneity along the rabbit collecting tubule.* KIDNEY INT, 14: 585-593, 1978.
106. STONER, L.C.; BURG, M.B.; ORLOFF, J. - *Ion transport in cortical collecting tubule: effect of amiloride.* AM J PHYSIOL, 227: 453-549, 1974.
107. SUMPPIO, B.E.; HULL, M.J.; BAUE, A.E. - *Comparison of effects of ATP-MgCl₂ and adenosine-MgCl₂ on renal function following ischemia.* AM J PHYSIOL, 252(21): R338-R339 1987.
108. 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
109. TOLEDO-PEREYRA, L.H. & CONDIE, R.M. - *Comparison of Sacks and a new colloid hyperosmolar solution for hypothermic renal storage.* TRANSPLANTATION, 25(3): 166-168, 1978.
110. TOMITA, K.; PISANO, J.J.; KNEPPER, M.A. - *Control of sodium and potassium transport in the cortical collecting duct of the rat. Effects of bradykinin, vasopressin and dioxycorticosterone.* J CLIN INVEST, 76: 132-136, 1985.

111. VERKMAN, A.S. - *Mechanisms and regulation of water permeability in renal epithelia. AM J PHYSIOL*, 257(26): C837-C850, 1989.