

FERNANDO MEYER

ESTUDO HISTOLÓGICO DE RINS DE RATOS PERFUNDIDOS COM SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA, SOLUÇÃO DE EURO-COLLINS E SOLUÇÃO DE EURO-COLLINS ADICIONADA DE DILTIAZEM E PRESERVADOS POR ATÉ 48 HORAS.

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau acadêmico de Mestre. Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Bleggi Torres

Co-Orientador: Prof. Dr. Renato Tambara Filho

Coordenador: Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos

CURITIBA

1999

Estudo histológico de rins de ratos perfundidos com solução salina isotônica, solução de Euro-Collins e solução de Euro-Collins adicionada de diltiazem e preservados por até 48 horas/Fernando Meyer

Curitiba, 1999.

78p. Tabs ; il. color

Orientadores : Prof. Dr. Luiz Fernando Bleggi Torres

Prof. Dr. Renato Tambara Filho

Dissertação (Mestrado)/ Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

**PARECER CONJUNTO DA COMISSÃO EXAMINADORA
DA AVALIAÇÃO DE
TESE/DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Aluno: Fernando Meyer

*Título da Dissertação: "ESTUDO HISTOLÓGICO DE RINS DE RATOS
PERFUNDIDOS COM SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA,
SOLUÇÃO DE EURO-COLLINS E SOLUÇÃO DE EURO-
COLLINS ADICIONADA DE DILTIAZEM E PRESERVADOS POR
ATÉ 48 HORAS"*

CONCEITOS EMITIDOS:

Prof. Dr. Antonio de Pádua Gomes da Silva - Conceito emitido A, Equivalência 10,

Prof. Dr. Julio Cesar Wiederkehr - Conceito emitido A Equivalência 10


Prof. Dr. Luiz Carlos de Almeida Rocha - Conceito emitido A Equivalência 10

Conceito Final de Avaliação: A


Curitiba, 17 de dezembro de 1999



Prof. Dr. Antonio de Pádua Gomes da Silva



Prof. Dr. Julio Cesar Wiederkehr



Prof. Dr. Luiz Carlos de Almeida Rocha

À memória de meu irmão e amigo, Professor Maurício Meyer,
exemplo de dedicação e amor à vida, que nem mesmo a eternidade
apagará.

A Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, Edegar e Nina, pelo amor e carinho dispensados a mim em todos os momentos de minha vida, guiando-me sempre no caminho mais correto.

À Luciane Rinaldi Meyer, amiga e esposa, presente em todas as etapas deste trabalho, pelas palavras de incentivo e ânimo.

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Doutor Luiz Fernando Bleggi Torres, Professor Titular e Chefe do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela orientação sábia e preciosa dispensada à realização desta tese.
- Ao Professor Doutor Renato Tambara Filho, Professor Adjunto da Disciplina de Urologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela sólida amizade, paciência e colaboração presentes em todas as ocasiões de discussão desta tese.
- Ao Professor Doutor Antônio Carlos Ligocki Campos, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, meu reconhecimento pela condução exemplar do curso e meu agradecimento pela oportunidade da realização do mestrado nessa renomada instituição.
- Ao Professor Doutor Fernando Hintz Greca, Professor Titular da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, exemplo de seriedade e determinação, pela oportunidade da realização dos procedimentos experimentais no laboratório sob sua coordenação.
- À Doutora Betina Werner, médica residente da Disciplina de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela abnegável colaboração na realização do estudo histológico.
- Ao Professor Doutor Josuê Bruginski de Paula, pelo apoio concreto e auxílio diligente oferecidos nos momentos da realização dos procedimentos cirúrgicos deste tese.
- Ao Doutor Gassan Traya, amigo eterno, pelas opiniões e sugestões sempre precisas durante a elaboração deste trabalho.
- Ao Doutor Renato Valente de Almeida, médico da Disciplina de Nefrologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela valiosa colaboração durante a revisão da literatura.
- Aos Professores Márcia Olandoski e Ary Elias Sabbag Júnior, pela realização do estudo estatístico e pela gentil receptividade presente em todas as ocasiões de discussão deste trabalho.
- Ao Professor Leomar Brito, pelo gentil auxílio na documentação fotográfica durante a fase experimental deste trabalho.

- À bibliotecária Áurea Maria Costin, meu agradecimento pela ajuda sempre prestativa oferecida na realização e orientação das pesquisas bibliográficas.
- Aos acadêmicos Imad Izat El Tawil e Eduardo Wei Kin Chin, pelo valioso auxílio nas cirurgias deste experimento.
- Aos funcionários Álvaro Roberto Gonçalves Machado, Daniel Siedler e Stela Maris Patrício, da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pelo auxílio durante a realização da fase experimental deste trabalho.

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS	viii
	LISTA DE FIGURAS	ix
	LISTA DE TABELAS EM ANEXO	x
	LISTA DE ABREVIATURAS	xi
	RESUMO	xii
	ABSTRACT	xiii
1	INTRODUÇÃO	2
1.1	OBJETIVO.....	5
2	REVISÃO DA LITERATURA	7
3	MATERIAL E MÉTODO	14
3.1	CARACTERÍSTICAS DOS ANIMAIS.....	14
3.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	14
3.3	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	15
3.4	DIVISÃO DOS GRUPOS DE ACORDO COM A SOLUÇÃO DE PERFUSÃO.....	15
3.5	COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES DE PERFUSÃO EMPREGADAS.....	15
3.6	TÉCNICA OPERATÓRIA.....	16
3.7	PERÍODOS DE PRESERVAÇÃO.....	18
3.8	ESTUDO HISTOLÓGICO.....	19
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
4	RESULTADOS	29
4.1	PESO CORPORAL, TEMPO DE PERFUSÃO E VOLUME DE PERFUSÃO.....	30
4.1.1	Peso dos ratos.....	31

4.1.2	Volume de perfusão.....	31
4.1.3	Tempo de perfusão.....	31
4.2	TOTAL DE GLOMÉRULOS CONTADOS.....	32
4.3	PERCENTUAL DE GLOMÉRULOS LESADOS.....	35
4.4	ASSOCIAÇÃO ENTRE GLOMÉRULOS LESADOS E DANO TUBULAR.....	38
5	DISCUSSÃO	40
5.1	PESO DOS ANIMAIS, VOLUME E TEMPO DE PERFUSÃO.....	40
5.2	ANATOMIA PATOLÓGICA.....	41
6	CONCLUSÕES	48
	ANEXO	50
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE TABELAS

1	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA.....	15
2	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SOLUÇÃO DE EURO-COLLINS.....	16
3	NÚMERO DE RINS UTILIZADOS EM CADA GRUPO POR PERÍODO.....	19
4	GRADUAÇÃO DO DANO TUBULAR.....	25
5	AVALIAÇÃO DA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO PESO EM GRAMAS, DO TEMPO DE PERFUSÃO EM MINUTOS E DO VOLUME DE PERFUSÃO EM MILILITROS DOS 30 RATOS ESTUDADOS.....	30
6	AVALIAÇÃO DA MÉDIA, VALOR MÍNIMO, VALOR MÁXIMO, E DESVIO PADRÃO DO PESO, TEMPO DE PERFUSÃO E VOLUME DE PERFUSÃO DOS 10 RATOS ESTUDADOS EM CADA UM DOS GRUPOS DO EXPERIMENTO.....	30
7	VALORES DE p ENCONTRADOS NA COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DO NÚMERO TOTAL DE GLOMÉRULOS CONTADOS ENTRE OS GRUPOS A, B, e C NOS PERÍODOS ANALISADOS.....	32
8	VALORES DE p ENCONTRADOS NA COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DO NÚMERO TOTAL DE GLOMÉRULOS CONTADOS ENTRE OS PERÍODOS 12, 24, 36, e 48 HORAS NOS GRUPOS ANALISADOS....	33
9	VALOR MÉDIO, VALOR MÍNIMO E VALOR MÁXIMO DO NÚMERO DE GLOMÉRULOS CONTADOS NOS DIFERENTES GRUPOS E PERÍODOS.....	34
10	VALORES DE p ENCONTRADOS NA COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DO PERCENTUAL DE GLOMÉRULOS LESADOS ENTRE OS GRUPOS A, B e C, NOS PERÍODOS ANALISADOS.....	35
11	VALORES DE p ENCONTRADOS NA COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DO PERCENTUAL DE GLOMÉRULOS LESADOS ENTRE OS PERÍODOS 12, 24, 36 e 48 HORAS NOS GRUPOS ANALISADOS.....	36
12	VALOR MÉDIO, VALOR MÍNIMO E VALOR MÁXIMO DO PERCENTUAL DE GLOMÉRULOS LESADOS NOS DIFERENTES GRUPOS E PERÍODOS.....	37
13	FREQÜÊNCIAS OBSERVADAS NA COMPARAÇÃO DO GRAU DE LESÃO GLOMERULAR E DO DANO TUBULAR.....	38

LISTA DE FIGURAS

1	POSIÇÃO DO CATETER NA AORTA PARA PERFUSÃO RENAL.....	18
2	MANUSEIO DOS RINS PARA FIXAÇÃO EM FORMOL A 10%.....	20
3	INCLUSÃO DE FRAGMENTOS RENAIIS SEGUNDO TÉCNICA SERIADA (BEESLEY; DANIEL, 1956).....	20
4	FRAGMENTO RENAL SELECIONADO PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	21
5	CONTAGEM DE GLOMÉRULOS.....	22
6	GLOMÉRULO NORMAL.....	22
7	GLOMÉRULO LESADO.....	23
8	TÚBULOS RENAIIS NORMAIS.....	24
9	TÚBULOS RENAIIS LESADOS.....	24
10	DEMONSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DANO TUBULAR.....	25
11	DANO TUBULAR GRAU +.....	26
12	DANO TUBULAR GRAU ++++.....	26
13	COLORAÇÃO DOS ÓRGÃOS PÓS-PERFUSÃO.....	29

LISTA DE TABELAS EM ANEXO

A1	PESO EM GRAMAS DOS RATOS, TEMPO EM MINUTOS E VOLUME EM MILILITROS DE PERFUSÃO DO GRUPO A.....	50
A2	NÚMERO TOTAL DE GLOMÉRULOS CONTADOS NOS RINS DO GRUPO A.....	51
A3	NÚMERO DE GLOMÉRULOS LESADOS NOS RINS DO GRUPO A	52
A4	GRAU DE DANO TUBULAR NOS RINS DO GRUPO A.....	53
A5	PESO EM GRAMAS DOS RATOS, TEMPO EM MINUTOS E VOLUME EM MILILITROS DE PERFUSÃO DO GRUPO B.....	53
A6	NÚMERO TOTAL DE GLOMÉRULOS CONTADOS NOS RINS DO GRUPO B.....	54
A7	NÚMEROS DE GLOMÉRULOS LESADOS NOS RINS DO GRUPO B	55
A8	GRAU DE DANO TUBULAR NOS RINS DO GRUPO B.....	56
A9	PESO EM GRAMAS DOS RATOS, TEMPO EM MINUTOS E VOLUME EM MILILITROS DE PERFUSÃO DO GRUPO C.....	57
A10	NÚMERO TOTAL DE GLOMÉRULOS CONTADOS NOS RINS DO GRUPO C.....	57
A11	NÚMERO DE GLOMÉRULOS LESADOS NOS RINS DO GRUPO C...	58
A12	GRAU DE DANO TUBULAR DOS RINS DO GRUPO C.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

HE	Hemotoxilina e eosina
N	Nifedipina
NE	Norepinefrina
NTA	Necrose tubular aguda
SSI	Solução salina isotônica
UW	University of Wisconsin
V	Verapamil

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi analisar as alterações histológicas de rins de ratos perfundidos com solução salina isotônica, solução de Euro-Collins e solução de Euro-Collins adicionada de diltiazem e preservados sob hipotermia simples por até 48 horas. Foram utilizados 36 ratos Wistar *Novergicus albinus*, fêmeas, divididos em três grupos, com doze ratos cada: grupo A (rins perfundidos com solução salina isotônica), grupo B (rins perfundidos com solução de Euro-Collins) e grupo C (rins perfundidos com solução de Euro-Collins adicionada de diltiazem). Utilizou-se anestesia inalatória com éter comercial em todos os procedimentos cirúrgicos. Os ratos foram submetidos à laparotomia mediana e exposição da aorta abdominal. Por meio de cateter locado no interior da aorta abdominal, foi realizada perfusão renal utilizando-se a solução de acordo com o grupo a que pertencia o animal. Após o término da perfusão, foi realizada nefrectomia bilateral e os órgãos foram preservados sob hipotermia por cinco períodos de tempo distintos: 0, 12, 24, 36 e 48 horas. Os rins foram fixados em formol a 10% para análise histológica. Por meio de microscopia óptica foram avaliadas duas estruturas renais: glomérulo e túbulo. Contou-se o número total de glomérulos e o percentual de glomérulos lesados, e avaliou-se o grau de dano tubular. Não houve diferença significativa do número de glomérulos avaliados entre os diferentes períodos de tempo em cada grupo. Não se observou lesão glomerular e dano tubular em nenhum dos órgãos dos grupos A, B e C no período 0. A perfusão renal com solução salina isotônica mostrou-se efetiva na preservação dos órgãos por até 12 horas, verificando-se aumento do percentual de glomérulos lesados nos períodos de 24, 36 e 48 horas. A perfusão renal com solução de Euro-Collins e com solução de Euro-Collins adicionada de diltiazem mostraram-se igualmente efetivas na preservação dos órgãos por até 36 horas, observando-se aumento do percentual de glomérulos lesados somente no período de 48 horas. Os resultados demonstraram existir associação entre dano tubular e o grau de lesão glomerular, ou seja, os rins com maior grau de alteração tubular correlacionaram-se com lesão glomerular severa. Concluiu-se que a adição do bloqueador de canal de cálcio, diltiazem, à solução de Euro-Collins para a perfusão renal não diminuiu o percentual de lesão glomerular.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyse the histologic changes of rat kidneys perfused with isotonic saline solution, Euro-Collins solution and Euro-Collins solution added with diltiazem and stored hypothermically up to 48 hours. Thirty-six female Wistar *Novergicus albinus* rats were used, divided in three groups of twelve rats each, as follow: group A (kidneys perfused with isotonic saline solution), group B (kidneys perfused with Euro-Collins solution) and group C (kidneys perfused with Euro-Collins solution added with diltiazem). Ether anesthesia was used for all surgical procedures. The rats were submitted to laparotomy and abdominal aorta exposure. Through a catheter located in the interior of the abdominal aorta, a renal perfusion was performed using a solution according to the group to which the animal belonged. After the perfusion completion, bilateral nephrectomy was performed and the organs were preserved under hypothermia for five distinct periods of time: 0, 12, 24, 36 and 48 hours. The kidneys were fixed in formaldehyde at 10% for histological analysis. Two renal structures were evaluated through optical microscopy: glomerulus and tubule. The total number of glomeruli was counted, the percentage of the injured glomeruli established and the injured tubular degree evaluated. There was no meaningful difference in the number of glomeruli evaluated between the different periods of time in each group. Glomerular lesion and tubular injury were not observed in any of the organs in groups A, B and C in period 0. The renal perfusion with isotonic saline solution proved effective in the preservation of the organs up to 12 hours, an increase in the percentage of the injured glomeruli was noticed in the periods of 24, 36 and 48 hours. The renal perfusion with Euro-Collins solution and Euro-Collins solution added with diltiazem proved effective in the preservation of the organs up to 36 hours and an increase in the percentage of injured glomeruli was noticed only in the period of 48 hours. The results showed an association between the tubular injury and the glomeruli lesion degree, that is, the kidneys with a higher degree of tubular alteration were related to severe glomerular lesion. It was therefore concluded that the addition of a calcium channel blocker, diltiazem, to the Euro-Collins solution for the renal perfusion does not decrease the percentage of glomerular lesion.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O transplante renal tem sido uma das áreas mais estudadas na medicina devido ao grande número de pacientes que necessitam deste tipo de intervenção. A utilização mundial de órgãos de doador cadáver, a melhora do manejo clínico desse doador antes e durante a remoção dos órgãos, os progressos alcançados no aspecto legal, que agilizam os trâmites burocráticos, a rápida seleção do receptor devido à criação de centros informatizados que reúnem os dados de histocompatibilidade, os avanços na imunossupressão e a melhora dos métodos de preservação renal contribuíram para a eficácia do transplante de rim como o melhor tratamento para a doença renal terminal (BELZER, 1974 e MARSHALL; JABLONSKI; SCOTT, 1994).

A preservação renal efetiva é parte integrante de todos os programas de transplante. Desde que CARRELL, em 1911, (apud IRIARTE et al., 1981) descreveu pela primeira vez uma técnica de preservação baseada na hipotermia moderada, vários trabalhos têm sido publicados relacionados a este assunto, dispondo-se atualmente de diversas técnicas de preservação renal.

O objetivo da preservação renal ideal é promover o tempo necessário para a realização da prova cruzada, seleção do receptor, transporte do enxerto e preparo do receptor para a cirurgia, bem como levar ao restabelecimento precoce da função renal, pois o atraso desta função acarreta custos consideráveis devido ao tempo maior de permanência hospitalar e à necessidade de diálises repetidas (HALASZ; COLLINS, 1976).

A primeira tentativa de preservar órgãos e tecidos utilizou a hipotermia com o objetivo de evitar os efeitos prejudiciais causados pela isquemia. A hipotermia diminui a atividade metabólica e reduz a demanda de oxigênio do órgão preservado. O metabolismo celular não cessa durante a preservação hipotérmica, somente diminuem-se as reações e a morte celular (SOUTHARD et al., 1977 e BELZER; SOUTHARD, 1988). O simples resfriamento da superfície renal permite que o rim tolere período de isquemia de até 12 horas (COLLINS; BRAVO-SHUGARMAN; TERASAKI, 1969).

Na prática diária, os rins são inicialmente perfundidos com solução resfriada para retirar o sangue de seu interior, geralmente por meio de perfusão "in situ" (GARVIN et al., 1980). Após a remoção, os rins podem ser preservados utilizando-se duas maneiras distintas: imersão hipotérmica simples ou perfusão contínua (BELZER; ASHBY; DUNPHY, 1967). Devido à complexidade e ao alto custo da perfusão contínua, foram realizados vários estudos comparando os dois métodos. Concluiu-se que, quando a retirada dos órgãos for realizada sob condições ideais, ambos os métodos podem ser utilizados com a mesma segurança e os mesmos resultados (HEIL et al., 1987). Entretanto, quando os órgãos forem submetidos a um período maior de isquemia quente, somente a perfusão contínua pode fornecer preservação eficiente e segura (MARTIN; SMITH; FAREED, 1970; MOBERG et al., 1972; FILO et al., 1974; OPELZ; TERASAKI, 1976 e LAKEY, 1978). Outro método de preservação estudado foi o congelamento de órgãos (DIETZMAN et al., 1973). Exceto pelo estudo realizado por Dietzman et al. (1973), nenhum outro demonstrou sucesso com a utilização desta técnica (BELZER, 1974).

Várias soluções de perfusão compostas por diferentes solutos têm sido estudadas nos últimos anos. As soluções de composição eletrolítica extracelular, como plasma (JOHNSON et al., 1972), ou seus substitutos (GRENIER et al., 1973 e FRODIN, 1975), e solução salina, comprovaram ser inadequadas para preservação renal por período maior do que 12 horas (MARSHALL; JABLONSKI; SCOTT, 1994).

A preservação prolongada de órgãos somente tornou-se possível após o desenvolvimento de soluções de composição eletrolítica intracelular (COLLINS; HARTLEY; CLUNIE, 1972 e JABLONSKI et al., 1980). Desde então, foram feitas várias modificações na composição das soluções. SACKS et al. (1973) substituíram a glicose pelo manitol na solução de Collins, deixando-a hiperosmolar (SACKS; PETRITSCH; KAUFMAN, 1973). Embora a presença de manitol previna o edema celular resultante da hipotermia (BELZER et al., 1982) e possa estimular a vasodilatação (LANE et al., 1996), a solução de Collins fornece proteção maior à função celular do que a solução de Sacks (COLLINS; HALASZ, 1975 e DAHLAGER; BILDE, 1976). A solução UW (University of Wisconsin), que foi originalmente desenvolvida para preservação do pâncreas, tem tido maior impacto na preservação de múltiplos órgãos (UEDA et al., 1989 e PLOEG, 1990).

Com o objetivo de prolongar o tempo de preservação do enxerto renal sem no entanto alterar a função e viabilidade do órgão, estudos foram realizados adicionando-se diferentes substâncias à solução de perfusão como, por exemplo, oxigênio (PEGG et al., 1989), esteróides (BIGUZAS et al., 1990), eliminadores de radicais livres (GREEN et al., 1986 e BIGUZAS; JABLONSKI; HOWDEN, 1990) e bloqueadores de canal de cálcio como a trifluoperazina (ANAISE et al., 1987), verapamil (HERTLE; GARTHOFF, 1985) e diltiazem (BURKE et al., 1984 e PUIG et al., 1991).

Recentemente, considerável interesse tem sido demonstrado na função do cálcio como possível mediador do dano celular irreversível após período de isquemia. A injúria isquêmica da membrana celular está associada com o influxo de cálcio do compartimento extracelular para o compartimento intracelular e, como consequência, com a ativação do processo catabólico cálcio-dependente (SHAPIRO et al., 1985 e HERTLE; GARTHOFF, 1985). A análise deste processo tem sugerido que os bloqueadores de canal de cálcio podem prevenir distúrbios metabólicos e promover a recuperação funcional e estrutural após isquemia renal (BLANK et al., 1984 e CHAGNAC et al., 1992).

Baseado nos dados anteriormente citados, este estudo foi proposto para avaliar as alterações histológicas ocorridas em rins de ratos submetidos à perfusão com solução salina isotônica, solução de Euro-Collins e solução de Euro-Collins associada ao diltiazem, bloqueador de canal de cálcio, em diferentes períodos de preservação. Outro ponto utilizado como justificativa para a realização deste trabalho foi a escassez de estudos similares, pois a grande maioria dos estudos relatados na literatura utilizou parâmetros bioquímicos e histológicos para a avaliação funcional do enxerto após o implante do mesmo (LAKEY, 1978 e BITTARD et al., 1991), sendo que no presente estudo foi realizada a avaliação da preservação "in vitro".

1.1 OBJETIVO

O presente estudo tem como objetivo:

Analisar as alterações histológicas de rins de ratos perfundidos com solução salina isotônica, solução de Euro-Collins e solução de Euro-Collins adicionada de diltiazem e preservados sob hipotermia simples por 12, 24, 36 e 48 horas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

BELZER et al. (1967) estudaram a preservação renal em cães utilizando a perfusão contínua. Foram utilizados 12 cães mestiços, adultos, de ambos os sexos, divididos em dois grupos de seis cada. Os rins foram perfundidos com solução salina resfriada e colocados no circuito de perfusão contínua, a qual utilizava derivado do plasma canino como solução de perfusão. No grupo A os rins permaneceram neste circuito por período de 24 horas e no grupo B por 72 horas. Após esses períodos o rim foi reimplantado e nefrectomia contra-lateral foi realizada. A uréia foi dosada diariamente por duas semanas, e, após, semanalmente. A análise histológica foi realizada por meio de biópsia a céu aberto dos rins nos dois grupos. O nível de uréia foi normal após duas semanas em 7 dos 12 cães, e após cinco semanas, em 10 dos 12 cães. O exame histológico demonstrou arquitetura renal normal em todos os experimentos. Os autores concluíram que este método de perfusão renal é seguro, levando a danos celulares leves e reversíveis no rim reimplantado.

O estudo de COLLINS et al. (1969) teve como objetivo comparar a preservação renal utilizando hipotermia simples e hipotermia combinada com perfusão inicial com diferentes soluções. Cinquenta e quatro cães foram submetidos à nefrectomia e o rim foi resfriado por meio de resfriamento de superfície (série A) ou de perfusão com soluções distintas (série B). As soluções utilizadas apresentavam concentrações elevadas de potássio, magnésio, fosfato, sulfato e glicose; e diferenciavam entre si pela adição de procaína ou fenoxibenzamina. Após resfriamento os rins foram mantidos por 16 a 30 horas em embalagem de polipropileno preenchida de solução salina rodeada de gelo dentro de recipiente térmico. A função renal foi avaliada por meio de dosagens diárias de uréia e creatinina. Os resultados mostraram que os rins podem ser preservados por até 12 horas somente com resfriamento de superfície, porém, se adicionada a esse esquema perfusão com solução resfriada, consegue-se estender este período para 30 horas. Esses resultados demonstraram que a perfusão renal consegue obter a preservação do órgão por um período mais prolongado.

ACQUATELLA et al. (1972) estudaram as alterações iônicas e histológicas ocorridas após perfusão e preservação renal com diferentes soluções. Dezenove cães foram submetidos à nefrectomia bilateral, tendo os rins perfundidos com solução a 4° C e imersos na mesma solução por 48 horas. As soluções utilizadas foram: Ringer Lactato, Ringer Lactato hipertônico, solução de cloreto de potássio, solução de sulfato de potássio, solução de Collins e Collins sem glicose (Collins-C1). Foram avaliadas as trocas iônicas e as alterações histológicas ocorridas após 2 minutos da perfusão (tempo 0), 6, 24 e 48 horas. As alterações histológicas mais severas ocorreram com a utilização de solução de Collins sem glicose, Ringer Lactato e Ringer Lactato hipertônico. Os autores concluíram que a solução que produz menor alteração iônica e histológica é a solução hiperosmótica, com níveis elevados de glicose, potássio e sulfato, e baixa concentração de sódio e cloro.

GRENIER et al. (1973) realizaram estudo experimental comparando duas soluções eletrolíticas para preservação renal. Vinte e dois rins de cães foram retirados e perfundidos por aproximadamente 5 minutos com solução de Collins ou com substituto do plasma (Perfudex®). No grupo 1, oito rins foram perfundidos com solução de Collins e imersos nesta solução resfriada a 4° C. No grupo 2, nove rins foram perfundidos com Perfudex® e envoltos em compressas úmidas nesta solução e mantidos a 4° C. No grupo 3, cinco rins foram perfundidos com Perfudex® e imersos nesta solução resfriada a 4° C. Os rins foram armazenados por 24 horas antes do reimplante. A função renal foi avaliada por meio de medidas de radioisótopos e análise histológica foi realizada após 3 meses do reimplante. O resultado das medidas de radioisótopos mostrou que a maioria dos rins (6 dos 8) preservados com solução de Collins teve boa recuperação da função. Ao contrário, dos 14 rins perfundidos com Perfudex®, 9 não recuperaram a função. Não houve diferença significativa entre os grupos 2 e 3. As alterações histológicas observadas nos rins transplantados foram graduadas como leves (edema intersticial e congestão em poucos glomérulos), moderadas (células glomerulares com degeneração hidrópica e grande quantidade de material proteináceo nos túbulos renais) e severas (fibrose intersticial com vacuolação nos tufo glomerulares e necrose celular nos túbulos). Concluiu-se que a preservação satisfatória dos rins foi obtida com solução

de Collins e que esta solução permite o armazenamento por período de 24 horas sem decréscimo da função ou alteração morfológica dos rins.

Visando avaliar a injúria renal relacionada à perfusão, HILL et al. (1976) estudaram trinta e quatro pacientes que receberam rins de doador-cadáver. No grupo I, sete rins foram preservados por meio de hipotermia simples após perfusão com solução de Collins ou Sacks. No grupo II, vinte e sete rins foram submetidos à perfusão pulsátil com plasma crioprecipitado (21 rins) ou albumina (6 rins). No grupo Controle foram utilizados dezoito rins de doadores vivo-relacionados. A avaliação foi realizada por meio de imunofluorescência, microscopia óptica e microscopia eletrônica. Os autores encontraram lesões significativas somente no grupo II, sendo que as alterações relacionadas à perfusão foram morfológicamente idênticas às da rejeição hiperaguda. Os autores concluíram que a perfusão pulsátil está associada à injúria endotelial mecânica e sugerem que o termo “rejeição hiperaguda” seja reservado para situações em que a lesão endotelial possa ser excluída por meio de biópsia pré-implante e anticorpos citotóxicos do receptor possam ser encontrados.

HALASZ et al. (1976) estudaram preservação renal utilizando perfusão simples e perfusão contínua. Foram estudados quarenta rins de cães submetidos à perfusão inicial com solução de Collins e Sacks e armazenados com gelo, e rins submetidos à perfusão contínua utilizando máquina de perfusão pulsátil (MOX 100®). O mesmo experimento foi realizado, porém submetendo os rins à isquemia quente por período de vinte minutos. Em ambos os experimentos o tempo de armazenamento foi de 48 horas. A avaliação foi realizada por meio de dosagem sérica de creatinina e análise histológica. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre o grupo com perfusão inicial e o grupo com perfusão contínua, sendo ambos os métodos efetivos para preservação renal num período de 48 horas. Entretanto, no grupo submetido à isquemia quente sobreviveram somente os cães que receberam os rins preservados com perfusão contínua. Concluiu-se que a perfusão contínua, por ser método complexo e oneroso, somente deve ser utilizada nos órgãos que foram submetidos a algum grau de isquemia quente.

SABA et al. (1977) tiveram como objetivo do estudo identificar problemas relacionados à perfusão e conservação de rins de rato utilizados para transplante. A

perfusão renal foi realizada por meio de cânula introduzida na aorta, utilizando solução fisiológica em um grupo de animais e solução de Sacks em outro grupo. A avaliação foi realizada por meio de estudo histológico dos rins em diferentes períodos: imediatamente após a perfusão, 4 e 24 horas de conservação. A microscopia óptica foi utilizada em todas as análises, sendo empregada a microscopia eletrônica somente nos casos em que houve necessidade de informação mais precisa das lesões previamente analisadas. Os resultados da histologia demonstraram que a perfusão com solução do tipo extracelular (fisiológica) acarreta danos estruturais mais evidentes que com a solução do tipo intracelular (Sacks). Estes resultados demonstraram que a conservação renal com solução extracelular não deve ultrapassar 4-6 horas, entretanto, o uso de solução intracelular permite aumentar esse período para 24 horas.

O estudo de GARVIN et al. (1980) foi desenvolvido para examinar o efeito da perfusão renal intra-aórtica "in situ" em doadores com parada cardíaca. Doze cães foram divididos em dois grupos - seis doadores e seis receptores. Nos cães doadores foi realizada nefrectomia esquerda, perfusão imediata do rim com solução de Collins resfriada e reimplante deste rim no cão receptor (Grupo A). Imediatamente após parada cardíaca induzida, realizou-se perfusão do rim direito por meio de cânula intra-aórtica previamente locada. Este rim foi reimplantado no mesmo cão receptor (Grupo B). A avaliação da função renal fez-se pelas medidas de volume urinário e pelos *clearances* de creatinina, inulina e ácido para-aminohipúrico. Os resultados não demonstraram diferenças significativas, exceto pelo *clearance* de inulina que foi maior no grupo B. Neste mesmo experimento foi medida a temperatura dos rins durante a perfusão intra-aórtica, por meio de termômetro colocado no parênquima renal. Os resultados mostraram que há uma queda da temperatura de 35° C para menos de 20° C em todos os casos. Os autores concluíram que a perfusão renal "in situ" produz resultados satisfatórios, tanto no resfriamento rápido do parênquima renal como na função renal pós-reimplante.

BURKE et al. (1984) estudaram o efeito da infusão intra-renal de bloqueadores de canal de cálcio pré e pós-isquemia renal. Vinte e seis ratos foram divididos em quatro grupos: A) infusão intra-renal de norepinefrina (NE) por 40 minutos, B) infusão intra-renal de verapamil (V) por 30 minutos antes da NE (V+NE),

C) infusão intra-renal de V por 2 horas após infusão de NE (NE+V) e D) infusão intra-renal de nifedipina(N) por 2 horas após infusão de NE (NE+N). A hemodinâmica renal e a função excretora foram avaliadas no período de 1 hora (fase inicial) e 24 horas (fase de manutenção) após a infusão intra-renal de NE. Os resultados mostraram que houve proteção do ritmo de filtração glomerular nos grupos (V+NE), (NE+V) e (NE+N). A microscopia óptica e eletrônica também demonstraram proteção morfológica de verapamil contra necrose tubular e injúria celular. Esses resultados demonstraram que os bloqueadores de canal de cálcio exercem substancial proteção funcional, celular e morfológica contra a isquemia renal experimental.

O objetivo do estudo de SHAPIRO et al. (1985) foi avaliar os efeitos de verapamil na função renal após isquemia quente e fria. Ratos *Sprague-Dawley* foram submetidos a dois modelos distintos de isquemia renal. No primeiro modelo, os rins foram expostos a 40 minutos de isquemia quente (37° C) no circuito de perfusão pulsátil, com adição de verapamil à solução. No segundo modelo, os rins foram submetidos à perfusão "in situ" com solução de Collins e preservados a 0° C por 8 horas. Neste modelo foram criados quatro grupos: no grupo 1 (controle) não houve adição de verapamil à perfusão, no grupo 2 foi adicionado verapamil somente à perfusão "in situ", no grupo 3 verapamil foi adicionado tanto à perfusão "in situ" como à perfusão pulsátil, e no grupo 4 houve adição de verapamil somente à perfusão pulsátil. Os resultados demonstraram que houve melhora do *clearance* de inulina e na absorção total de sódio após adição de verapamil, no primeiro modelo. No segundo modelo, a adição de verapamil nos grupos 2 e 3 melhorou o índice de fluxo urinário, *clearance* de inulina e absorção total de sódio. Os autores concluíram que o verapamil pode proteger o rim dos danos ocorridos durante a isquemia, e que isso pode ser útil na preservação do enxerto renal.

LAMBERT et al. (1987) estudaram ratos submetidos a transplante renal, examinando as alterações morfológicas dos glomérulos do enxerto renal ocorridas após um mês do transplante. O rim esquerdo do animal doador foi submetido à perfusão "in situ", por meio de cânula intra-aórtica, e mantido em perfusão contínua por 24 (grupo 1) ou 30 horas (grupo 2) antes do transplante. Após trinta dias, o rim transplantado foi retirado e preparado para estudo histológico. A incidência e

severidade das lesões epiteliais foram avaliadas por microscopia óptica. A maioria das alterações patológicas foi encontrada nas células epiteliais viscerais (formação de microvilosidades, perda dos podócitos, acúmulo de inclusão protéica e degeneração, necrose e perda das células epiteliais da membrana capilar). Os autores concluíram que o dano à célula epitelial glomerular aumenta a permeabilidade capilar e prejudica a manutenção da integridade da parede capilar, levando à proteinúria e glomeruloesclerose focal.

PUIG et al. (1991) realizaram estudo visando avaliar a utilidade de o diltiazem reduzir a incidência de necrose tubular aguda (NTA) em enxerto renal de cadáver preservado em solução de Euro-Collins. Foram estudados 150 enxertos renais, divididos em dois grupos. No grupo B (50 rins) foi administrado diltiazem ao doador-cadáver durante a cirurgia, adicionado à solução de Euro-Collins durante a perfusão, e administrado ao receptor previamente e durante três dias após o transplante. No grupo A não houve a utilização de diltiazem. A sobrevida do paciente foi de 96% em 3 anos no grupo A e de 100% no grupo B. A sobrevida do enxerto foi de 84,7% em 3 anos no grupo A e 90% no grupo B. A incidência de NTA foi de 31% no grupo A e de 16% no grupo B. Os autores relataram que o diltiazem aumenta o fluxo sanguíneo renal por meio da vasodilatação das arteríolas aferentes dos glomérulos e concluíram que a incidência de NTA pode ser diminuída pelo manejo adequado do doador, hiperhidratação do receptor e utilização de diltiazem no doador, receptor e na solução de perfusão renal.

3 MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

Este experimento consistiu, basicamente, em perfundir-se os rins de três grupos de ratos, cada um com uma solução diferente (solução salina isotônica, Euro-Collins e Euro-Collins adicionado de diltiazem), procedendo-se em seguida à nefrectomia bilateral e à preservação sob hipotermia dos órgãos retirados. Após determinados períodos de tempo (0, 12, 24, 36 e 48, horas) os rins assim preservados foram submetidos à análise histopatológica e os resultados comparados.

As normas técnicas, utilizadas neste trabalho, seguem as orientações determinadas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas e as normas da Universidade Federal do Paraná (1996).

3.1 CARACTERÍSTICAS DOS ANIMAIS

Foram utilizados 36 ratos *Wistar Norvegicus albinus*, obtidos no biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR).

Os ratos foram mantidos em condições ambientais constantes com ciclo dia/noite de 12 horas (8:00 – 20:00) e temperatura ambiente, durante o período prévio ao experimento. Durante este período tiveram livre acesso à água e ração para ratos (NUVILAB-CR1, Nuvital, Curitiba).

Para a descrição anatômica dos ratos, foram observadas as orientações de Waynforth (WAYNFORTH; FLECKNELL, 1992).

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos neste estudo ratos fêmeas, com 20 semanas de idade, peso variando de 150g a 300g, apresentando bom aspecto geral, ativos e sem evidência de doença à inspeção.

3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo os animais que apresentaram impossibilidade técnica de realização do procedimento cirúrgico, os que foram a óbito durante à indução anestésica ou durante o ato cirúrgico propriamente dito e aqueles em que não se obteve perfusão homogênea de ambos os rins, ou seja, não houve clareamento da superfície dos órgãos de maneira simultânea e simétrica.

3.4 DIVISÃO DOS GRUPOS DE ACORDO COM A SOLUÇÃO DE PERFUSÃO

Os ratos foram divididos em 3 grupos, com 12 ratos cada um:

GRUPO A: perfusão renal com solução salina isotônica (SSI).

GRUPO B: perfusão renal com solução de Euro-Collins.

GRUPO C: perfusão renal com solução de Euro-Collins adicionada de diltiazem.

3.5 COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES DE PERFUSÃO EMPREGADAS

As composições químicas das soluções utilizadas no grupo A (solução salina isotônica) e no grupo B (solução de Euro-Collins) estão relacionadas nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA

Cloreto de sódio	9,0g
Água destilada q.s.p.	1000ml
Heparina	5000 UI

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SOLUÇÃO DE EURO-COLLINS

Fosfato de Potássio monobásico	2,05g
Fosfato de Potássio bibásico	7,40g
Cloreto de Potássio	1,12g
Bicarbonato de Sódio	0,84g
Heparina	5000 UI
Glicose monoidratada	38,50g
Água destilada q.s.p.	1000ml

Fonte: Fresenius Laboratórios Ltda.

A solução empregada nos ratos do grupo C foi composta pela solução de Euro-Collins adicionada de diltiazem (25mg/l).

3.6 TÉCNICA OPERATÓRIA

Os ratos foram submetidos à anestesia inalatória com éter comercial. Após anestesiados, os ratos foram pesados (balança marca Ohaus® Precision Standard modelo TS-2KS). Em seguida foi realizada tricotomia ampla do abdômen e terço inferior do tórax, e os animais foram fixados em decúbito dorsal. Para a laparotomia, foi utilizada incisão mediana xifopúbica com abertura de todos os planos da parede abdominal e exposição da cavidade abdominal. Após a laparotomia foi realizada dissecação da aorta acima e abaixo dos vasos renais. A aorta foi isolada acima do tronco celíaco, sendo reparada a este nível utilizando-se fio de Seda 5-0. Foi realizada ligadura da aorta logo acima da sua bifurcação para os vasos ilíacos. A ligadura da veia cava também foi realizada a este nível (LAMBERT; CARROL; HENRY et al., 1987). A aorta foi cateterizada (figura 1) utilizando-se cateter tipo Abocath® n°24 introduzido logo acima da sua bifurcação (LEE, 1967). Após verificação do refluxo de sangue pelo cateter e, conseqüentemente, do posicionamento correto do mesmo, o fluxo sangüíneo renal foi interrompido por meio do tracionamento do reparo aórtico superior. Imediatamente foi iniciada a perfusão renal utilizando-se a solução de acordo com o grupo a que pertencia o animal. A temperatura das soluções utilizadas foi sempre de 4°C (WILLIAMS; PEET;

HAMSHERE, 1976 e BITTARD et al., 1991) e a pressão de perfusão foi de 100 cmH₂O (ANDERSON; WYLLIE; WILLIAMS, 1973; TAKENAKA et al., 1980, e KEMP et al., 1991) para todos os grupos (A, B e C). Durante a perfusão foi observada a mudança de coloração das alças intestinais e do parênquima renal. Essas alterações foram utilizadas como critério de perfusão efetiva, sendo a mesma interrompida no momento em que os rins encontravam-se de coloração homogênea e decorridos no mínimo cinco minutos do início desta. Nos 3 grupos, o rim direito foi retirado com gordura peri-renal para diferenciá-lo do rim esquerdo. Após nefrectomia bilateral, os rins foram armazenados conforme o grupo a que pertenciam:

Grupo A:

Neste grupo, os rins foram imersos em embalagem plástica contendo 30ml de SSI a 4°C e esta colocada dentro de outra embalagem contendo 10ml de SSI e gelo (HOWDEN et al., 1983). Após a identificação da embalagem, a mesma foi armazenada em recipiente térmico contendo gelo. Este método de armazenamento foi utilizado nos demais grupos, alterando-se apenas a solução na qual os órgãos foram imersos.

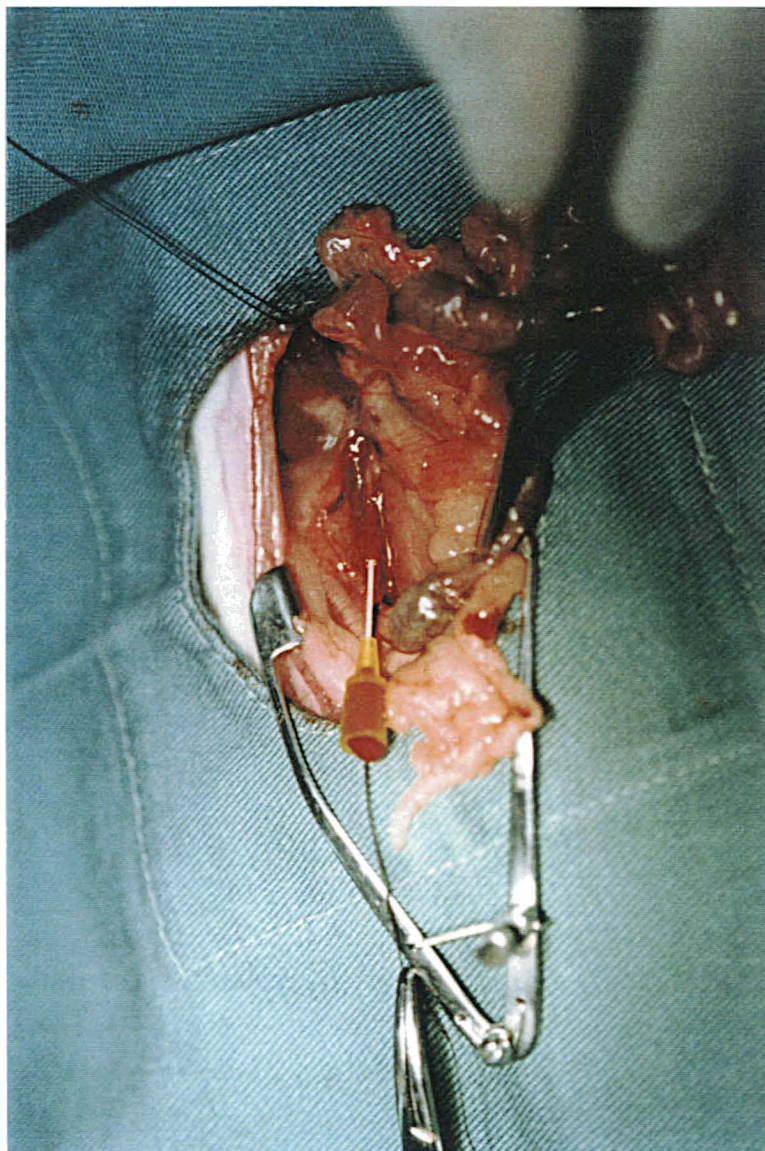
Grupo B:

Neste grupo, após nefrectomia os rins foram imersos em 30ml de solução de Euro-Collins e armazenados conforme descrito anteriormente.

Grupo C:

Neste grupo, após nefrectomia os rins foram imersos em 30ml de solução de Euro-Collins adicionada de diltiazem e armazenados conforme descrito anteriormente.

FIGURA 1 - POSIÇÃO DO CATETER NA AORTA PARA PERFUSÃO RENAL



3.7 PERÍODOS DE PRESERVAÇÃO

Os rins foram preservados e fixados para análise histológica em cinco períodos diferentes: 0 (logo após o término da perfusão), 12, 24, 36 e 48 horas. A escolha do período e do rim foi realizada mediante sorteio aleatório. Os períodos de 12, 24, 36 e 48 horas foram identificados pelos algarismos I, II, III e IV, respectivamente.

3.8 ESTUDO HISTOLÓGICO

Dos 72 rins utilizados neste experimento, 12 rins foram analisados do ponto de vista histológico no período 0 e 15 rins em cada um dos demais períodos (tabela 3).

TABELA 3 - NÚMERO DE RINS UTILIZADOS EM CADA GRUPO POR PERÍODO

Período/ grupo	A	B	C	Total
0	4	4	4	12
12h	5	5	5	15
24h	5	5	5	15
36h	5	5	5	15
48h	5	5	5	15
Total	24	24	24	72

A= rins perfundidos com solução salina isotônica

B= rins perfundidos com solução de Euro-Collins

C= rins perfundidos com solução de Euro-Collins adicionada de diltiazem

Todas as etapas anatomo-patológicas dos experimentos foram realizadas de forma sistemática e controlada, sendo sempre interpretadas pelos mesmos observadores e em estudo duplo-cego. Após sorteio aleatório, o rim foi seccionado longitudinalmente no seu bordo anti-hilar para melhor fixação (figura 2), sendo colocado em frascos individuais contendo formol a 10%, identificados por etiquetas contendo códigos conhecidos somente pelo cirurgião.

Após processamento histológico dos rins (BANCROFT; STEVENS, 1982) utilizou-se a técnica de inclusão seriada em parafina (BEESLEY; DANIEL, 1956) na qual uma das metades do rim foi seccionada transversalmente em quatro partes e incluídas de maneira seqüencial (figura 3), para que a córtex e a medular renal fossem observadas em todos os cortes histológicos, de maneira similar e seriada. As lâminas foram confeccionadas com três níveis de corte, com 5 micrômetros de intervalo entre eles, e coradas por hematoxilina e eosina (BANCROFT; STEVENS, 1982)

FIGURA 2 - MANUSEIO DOS RINS PARA FIXAÇÃO EM FORMOL A 10%

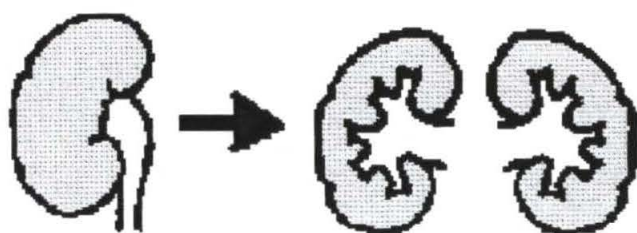
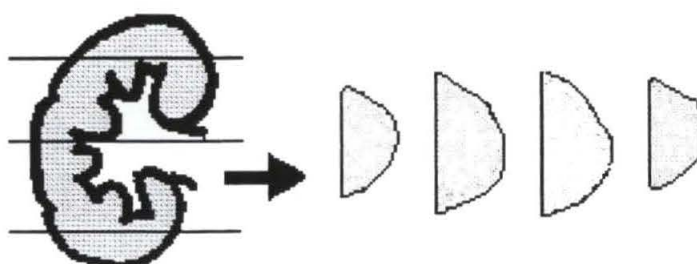
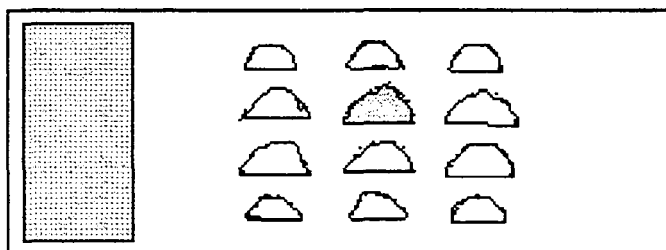


FIGURA 3 - INCLUSÃO DE FRAGMENTOS RENAIIS SEGUNDO TÉCNICA SERIADA (BEESLEY; DANIEL, 1956)



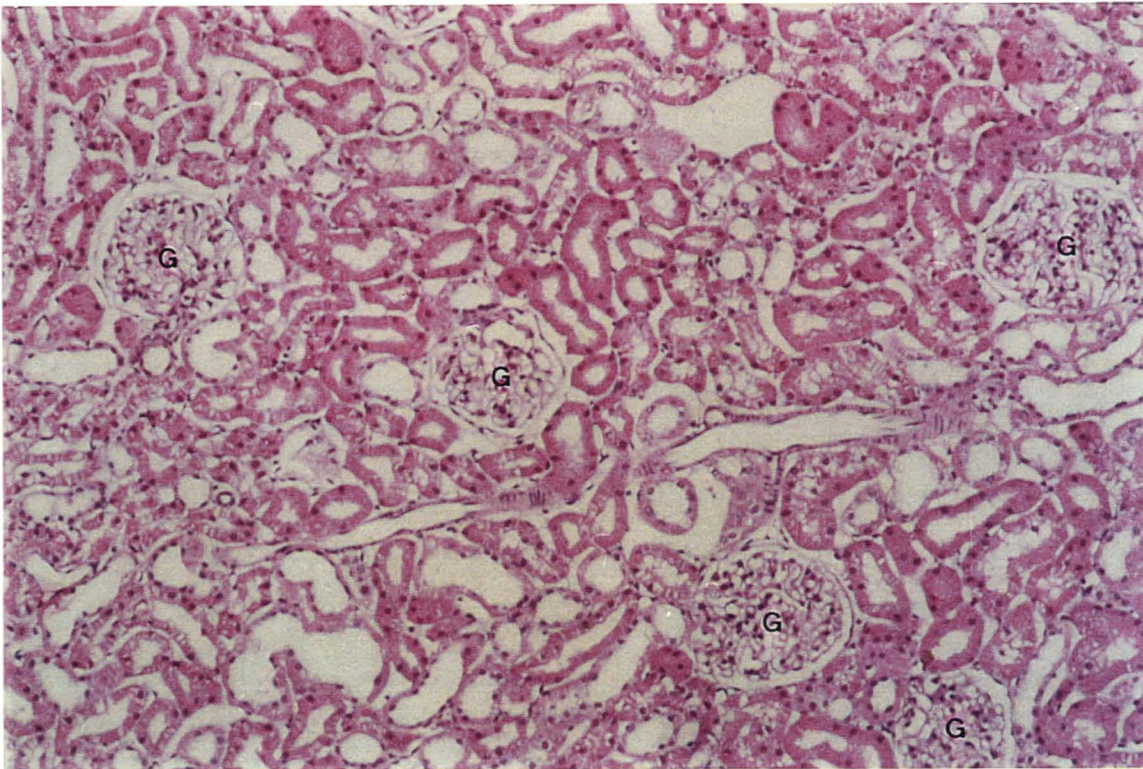
As lâminas foram avaliadas por dois patologistas, ambos sem conhecimento prévio do significado dos códigos utilizados para identificar os rins. Numa primeira etapa, um dos patologistas avaliou todas as lâminas, criando parâmetros de avaliação das alterações histológicas observadas. Foi escolhido de maneira aleatória entre os doze cortes da lâmina sempre o mesmo fragmento, em todas as lâminas, para que o segmento renal avaliado fosse sempre o mesmo (figura 4).

FIGURA 4 - FRAGMENTO RENAL SELECIONADO PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA



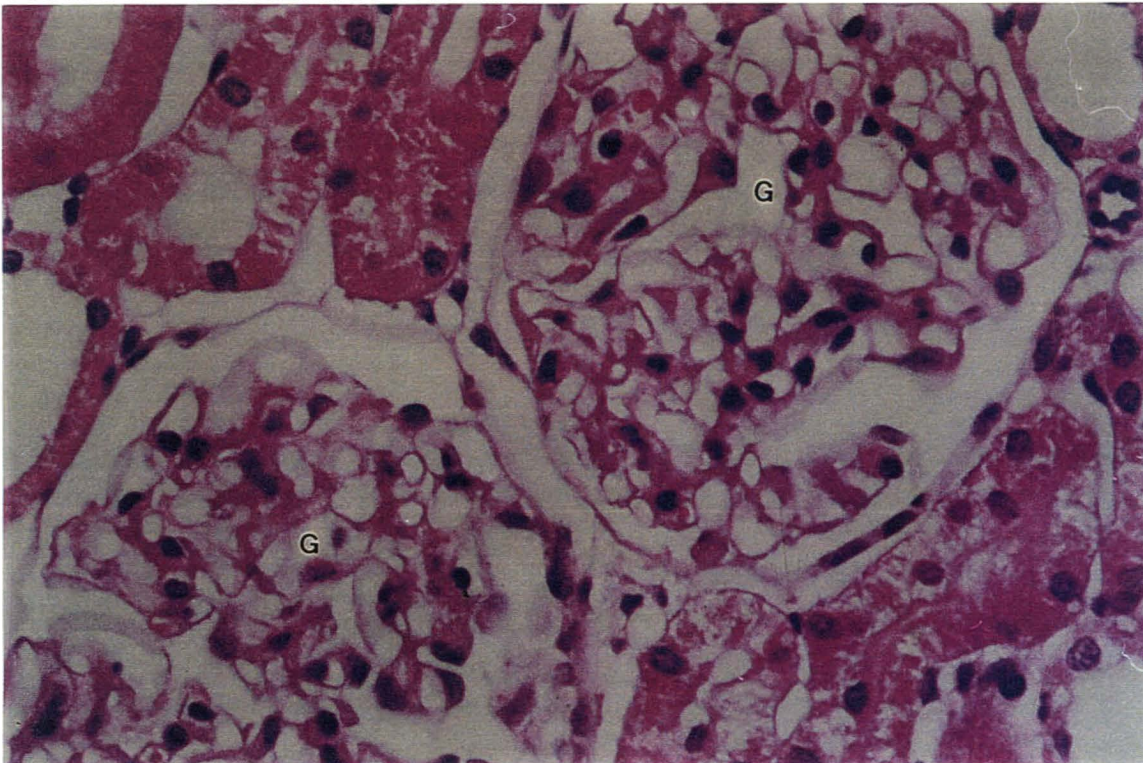
Foram avaliadas duas estruturas renais: glomérulos e túbulos. Contou-se o número total de glomérulos e o número de glomérulos lesados (figura 5). Os glomérulos foram considerados normais quando as alças capilares estavam abertas e com paredes delgadas, e quando não havia qualquer conteúdo no interior da cápsula de Bowman (figura 6). Os glomérulos foram considerados lesados quando apresentavam contração do tufo glomerular com aproximação das estruturas, conteúdo no interior da cápsula de Bowman ou vacuolização de células endoteliais (figura 7). O grau de lesão glomerular foi classificado como: leve (até 25% de glomérulos lesados), moderado (26% a 50% de glomérulos lesados), acentuado (51% a 75% de glomérulos lesados) e severo (acima de 75% de glomérulos lesados).

FIGURA 5 - CONTAGEM DE GLOMÉRULOS



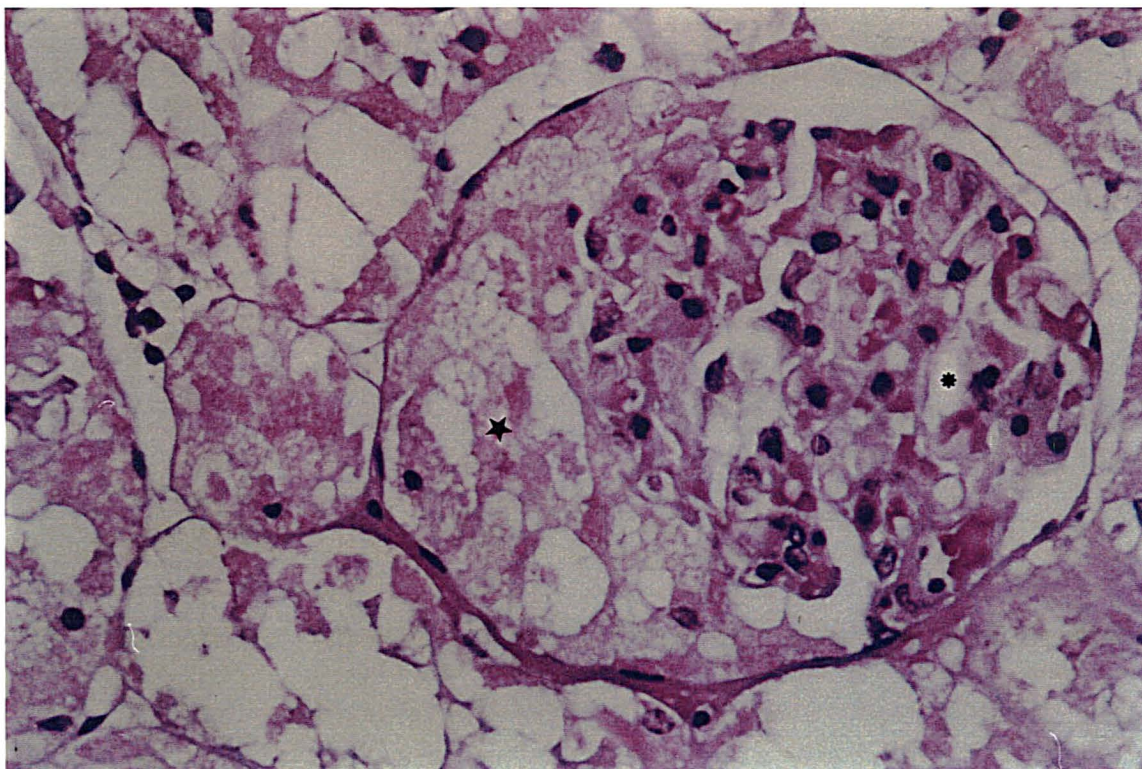
Fotomicrografia de rim mostrando inúmeros túbulos e cinco glomérulos (G) de aspecto microscópico habitual (HE 100x).

FIGURA 6 - GLOMÉRULO NORMAL



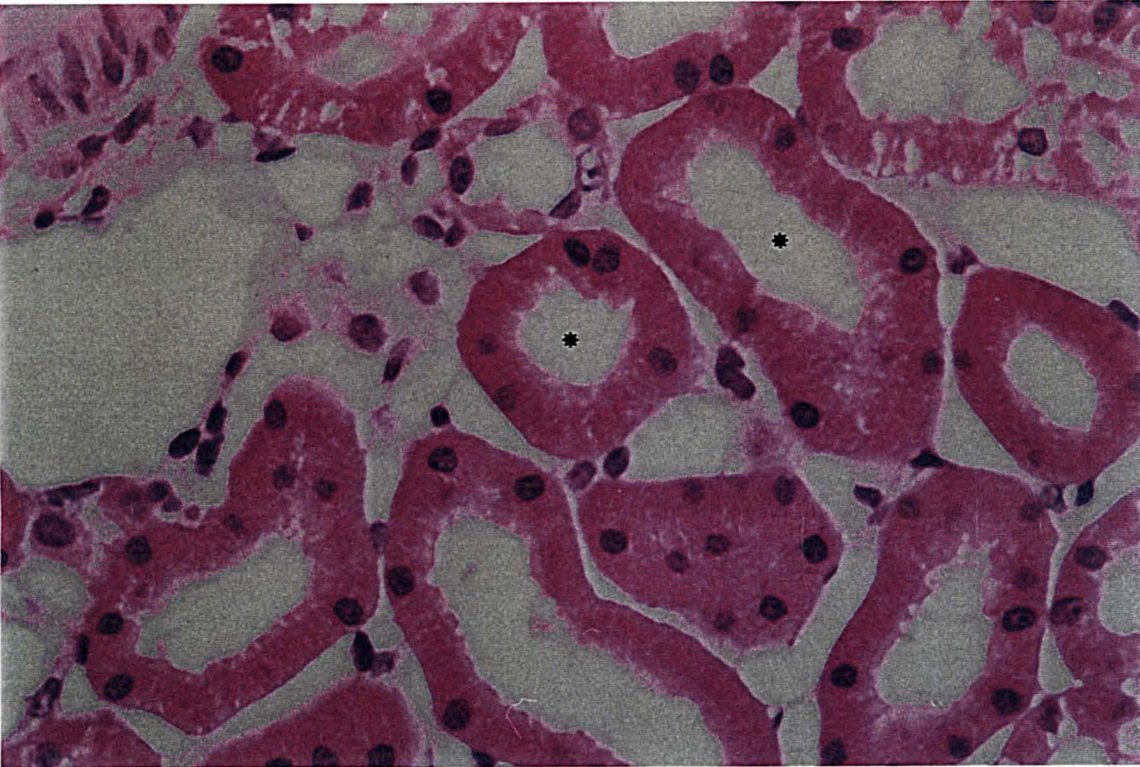
Fotomicrografia de rim mostrando dois glomérulos (G) com capilares e celularidade mesangial habituais (HE 400x).

FIGURA 7 - GLOMÉRULO LESADO

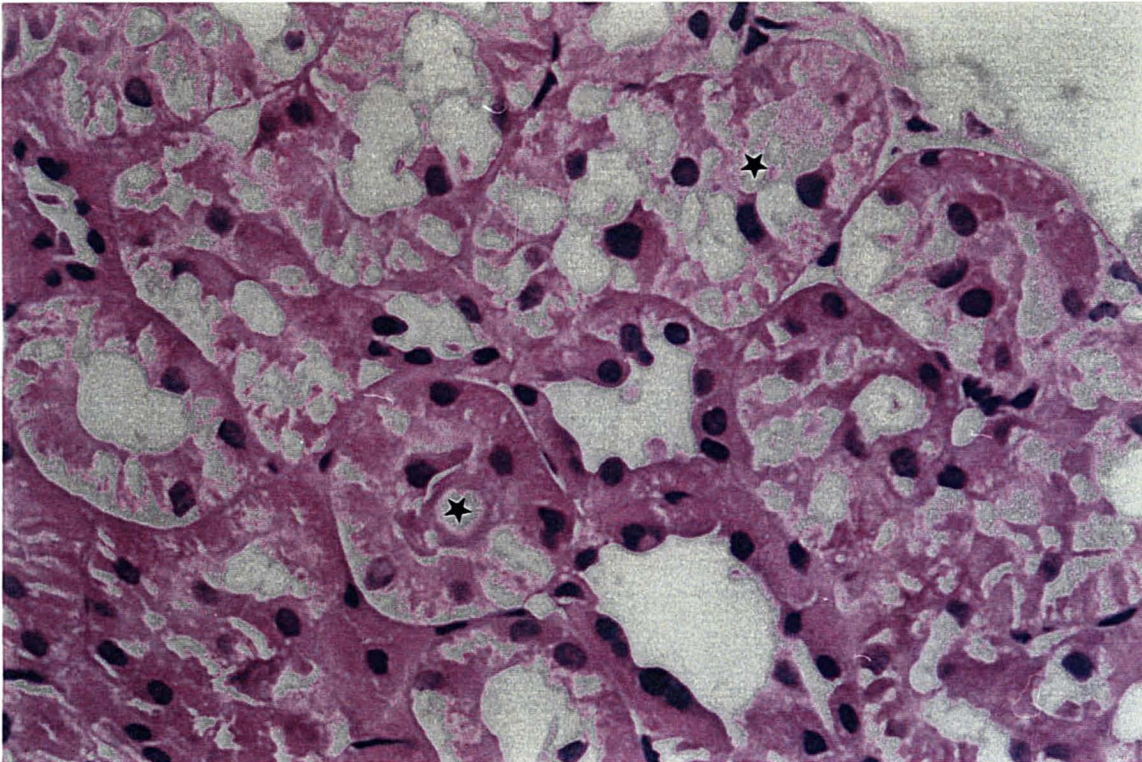


Fotomicrografia de rim mostrando glomérulo lesado onde se observa contração do tufo capilar (*), desorganização mesangial e conteúdo eosinofílico amorfo (★) no interior da cápsula de Bowman (HE 400x).

A avaliação do dano tubular foi realizada segundo sua extensão de comprometimento do rim. Os túbulos renais foram considerados normais quando revestidos por camada única de células cuboidais de citoplasma eosinofílico denso e as luzes tubulares eram opticamente vazias (figura 8). Os túbulos lesados apresentavam vacuolização citoplasmática de graus variados (figura 9). Foram utilizadas quatro categorias, conforme tabela 4 (figuras 10, 11 e 12). Após a avaliação geral do primeiro patologista, o segundo patologista avaliou os danos glomerulares e tubulares aplicando a classificação mencionada. Os resultados da avaliação dos patologistas foram comparados para avaliar o grau de concordância. Esta medida provou a reprodução do método e a fidedignidade dos resultados entre os observadores.

FIGURA 8 - TÚBULOS RENAIIS NORMAIS

Fotomicrografia de rim mostrando túbulos contornados proximais revestidos por células cuboidais sem alterações e luzes opticamente vazias (*) (HE 400x).

FIGURA 9 - TÚBULOS RENAIIS LESADOS

Fotomicrografia de rim mostrando túbulos com intensa vacuolização citoplasmática das células de revestimento com descamação para o interior da luz (★) (HE 400x).

TABELA 4 - GRADUAÇÃO DO DANO TUBULAR

+	Somente uma tênue faixa cortical apresentava vacuolização tubular.
++	Além do comprometimento cortical, alguns túbulos da medular também estavam comprometidos.
+++	Região cortical e medular comprometida, mas ainda apresentando algumas áreas preservadas.
++++	Vacuolização difusa da cortical e da medular, sem qualquer área preservada.

FIGURA 10 - DEMONSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DANO TUBULAR

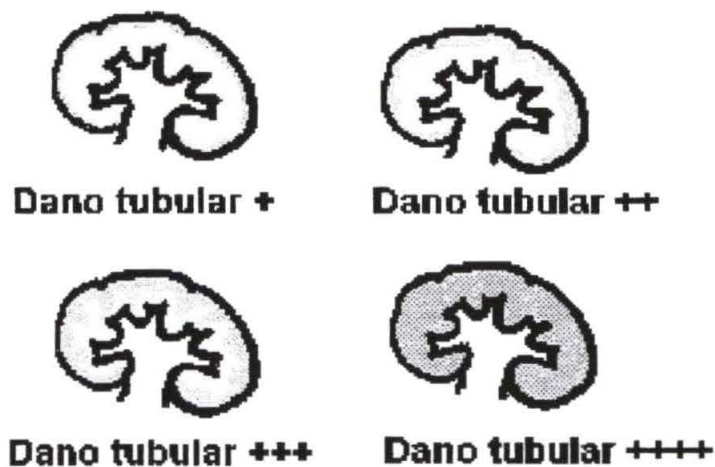
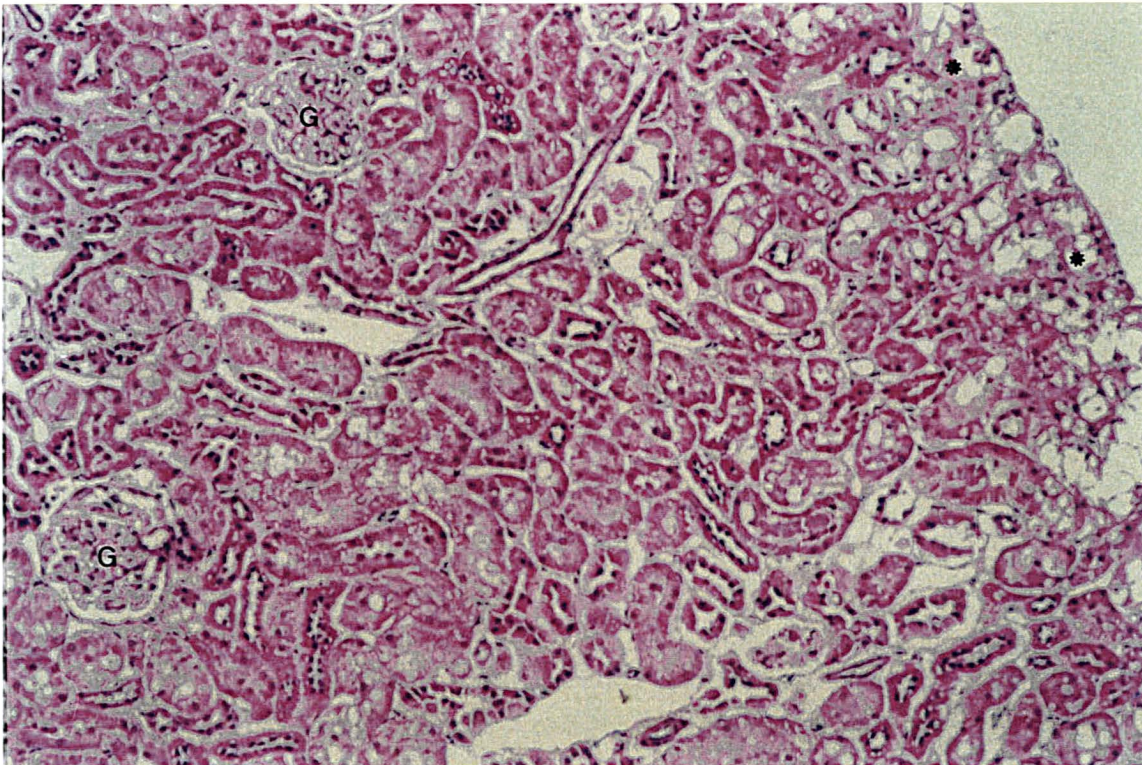
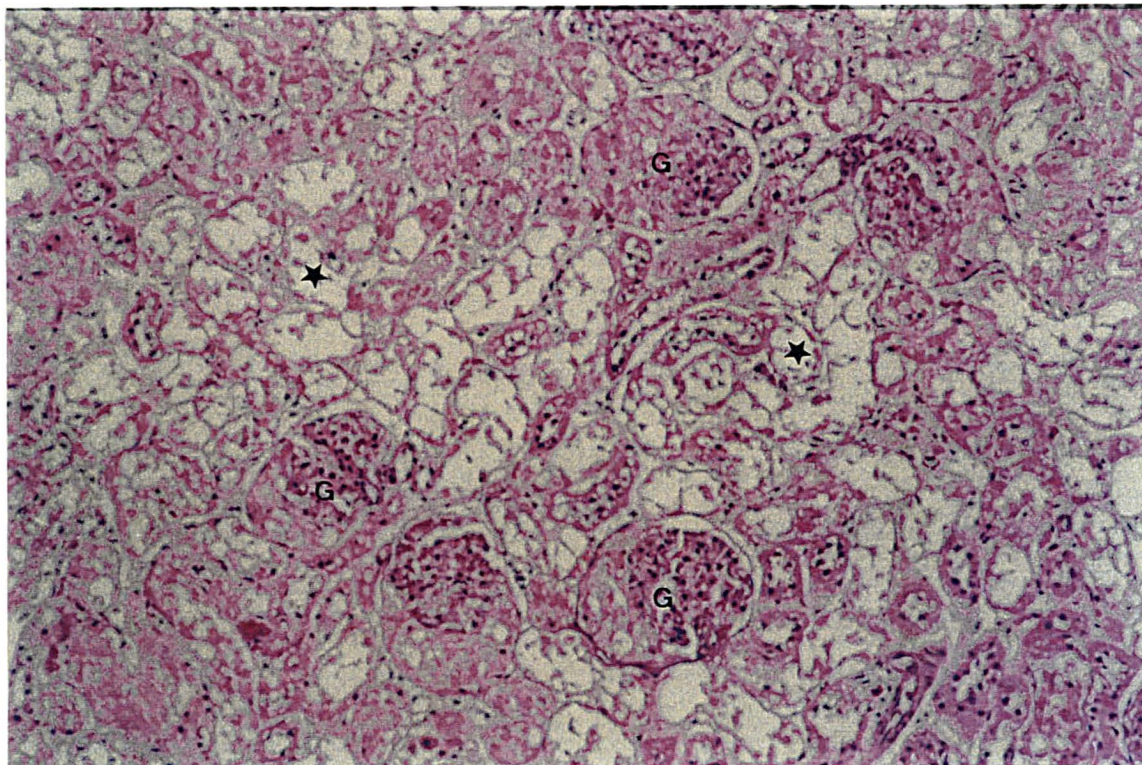


FIGURA 11 - DANO TUBULAR GRAU +



Fotomicrografia de rim exemplificando o dano tubular grau + em que se observa vacuolização celular nos túbulos da região subcapsular (*). Notam-se dois glomérulos preservados (G) (HE 100x).

FIGURA 12 - DANO TUBULAR GRAU ++++



Fotomicrografia de rim exemplificando o dano tubular grau ++++ em que há intensa e difusa vacuolização citoplasmática das células tubulares (★). Notam-se diversos glomérulos lesados (G) (HE 100x).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foram considerados 30 ratos, alocados de forma aleatória em 3 grupos (10 ratos em cada grupo) sendo utilizados os dois rins de cada um deles. Desta forma, ao todo foram considerados 60 rins. As avaliações dos resultados foram feitas em 4 períodos: 12 horas, 24 horas, 36 horas e 48 horas.

As variáveis consideradas neste estudo foram: peso dos ratos, tempo de perfusão, volume da solução de perfusão, total de glomérulos contados, percentual de glomérulos lesados e dano tubular.

Para cada uma das variáveis: peso dos ratos, tempo de perfusão e volume de perfusão, testou-se a hipótese nula de médias iguais para os três grupos considerados (A, B e C), versus a hipótese alternativa de que pelo menos um dos grupos apresenta média diferente dos demais. Para tanto, adotou-se um modelo de Análise de Variância para um fator, testando-se, inicialmente, a hipótese nula de homogeneidade das variâncias nos três grupos, versus a hipótese alternativa de que pelo menos um dos grupos tem variância diferente. Para isso, aplicou-se o teste de Cochran. No caso de existir diferença significativa entre os grupos, adotou-se o teste "t de Student" para amostras independentes a fim de investigar estas diferenças, considerando-se os grupos dois a dois.

Para a análise das variáveis: número total de glomérulos, percentual de glomérulos lesados e dano tubular, as comparações foram realizadas duas a duas. Em função da natureza dos dados (contagem e proporções) e do número de repetições em cada combinação de grupo e período, adotou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney para as comparações a serem consideradas. Para investigação da associação entre glomérulos lesados e dano tubular, estimou-se o coeficiente de correlação de postos de Spearman para avaliação desta associação (SIEGEL, 1981).

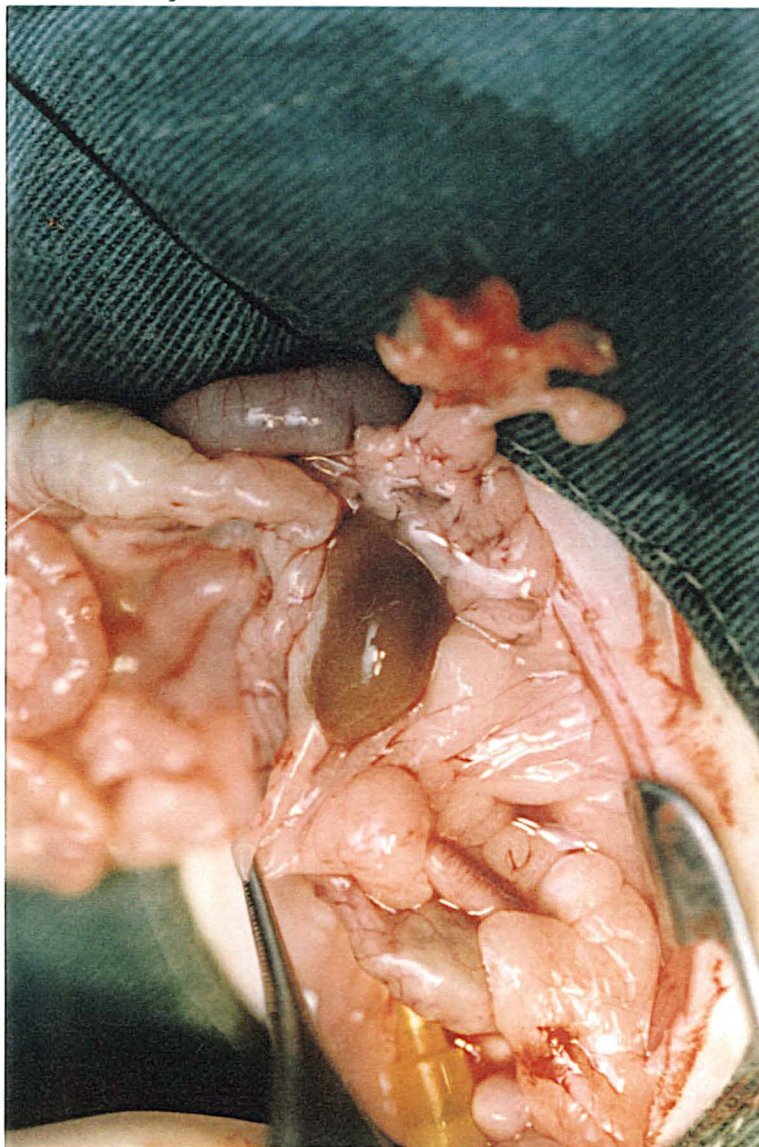
Em todos os testes o nível de significância adotado foi de 5%.

4 RESULTADOS

Dos 36 ratos utilizados no experimento, 6 ratos foram utilizados para o período 0 (4 rins em cada grupo: A, B e C). Em todos esses rins a análise histológica demonstrou arquitetura renal normal, ou seja, todos os glomérulos estavam normais e não havia dano tubular em nenhum dos rins dos grupos A, B e C no período 0. Portanto, esses rins não fizeram parte da análise estatística, porém, foram utilizados como padrão para o estudo histológico dos demais períodos.

Nos três grupos estudados não houve diferença na coloração dos rins após o término da perfusão. Todos os órgãos apresentaram coloração homogênea, brancacenta, demonstrando perfusão renal efetiva e simétrica (figura 13).

FIGURA 13 – COLORAÇÃO DOS ÓRGÃOS PÓS-PERFUSÃO



4.1 PESO CORPORAL, TEMPO DE PERFUSÃO E VOLUME DE PERFUSÃO

TABELA 5 - AVALIAÇÃO DA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO PESO EM GRAMAS, DO TEMPO DE PERFUSÃO EM MINUTOS E DO VOLUME DE PERFUSÃO EM MILILITROS DOS 30 RATOS ESTUDADOS

Variável	Média	Desvio Padrão
Peso (g)	238.83	20.2721
Tempo de perfusão (min)	9.47	4.3050
Volume de perfusão (ml)	16.00	1.9476

TABELA 6 - AVALIAÇÃO DA MÉDIA, VALOR MÍNIMO, VALOR MÁXIMO E DESVIO PADRÃO DO PESO, TEMPO DE PERFUSÃO E VOLUME DE PERFUSÃO DOS 10 RATOS ESTUDADOS EM CADA UM DOS GRUPOS DO EXPERIMENTO

GRUPO	VARIÁVEL	Média	Valor Mínimo	Valor Máximo	Desvio Padrão
A	PESO	232.89	189	271	23.7974
	TEMPO	6.00	5	10	1.7638
	VOLUME	15.90	15	20	1.7288
B	PESO	235.10	203	271	19.6381
	TEMPO	13.90	10	20	2.9981
	VOLUME	15.90	13	20	2.2828
C	PESO	248.50	225	275	14.6154
	TEMPO	8.50	5	15	3.3747
	VOLUME	16.20	15	20	1.9889

A: rins perfundidos com solução salina isotônica.

B: rins perfundidos com solução de Euro-Collins.

C: rins perfundidos com solução de Euro-Collins adicionada de diltiazem.

4.1.1 Peso dos ratos

O resultado do teste de homogeneidade de variâncias indicou a não rejeição da hipótese nula ($p=0,3748$). O resultado da análise de variância indicou a não rejeição da hipótese de igualdade das médias dos pesos ($p=0,1786$). Portanto, não houve diferença significativa do peso dos ratos entre os grupos A, B e C.

4.1.2 Volume de perfusão

O resultado do teste de homogeneidade de variâncias indicou a não rejeição da hipótese nula ($p=0,7197$). O resultado da análise de variância indicou a não rejeição da hipótese de igualdade das médias dos volumes ($p=0,9288$). Portanto, não houve diferença significativa do volume de perfusão entre os grupos A, B e C.

4.1.3 Tempo de perfusão

O resultado do teste de homogeneidade de variâncias indicou a não rejeição da hipótese nula ($p=0,1723$). O resultado da análise de variância indicou a rejeição da hipótese de igualdade das médias dos tempos ($p=0,000003$). Na comparação entre os grupos A e B, o resultado do teste indicou a rejeição da hipótese de igualdade de médias dos tempos ($p=0,000001$). Na comparação entre os grupos A e C, o resultado do teste indicou a não rejeição da hipótese de igualdade de médias dos tempos ($p=0,0666$). Na comparação entre os grupos B e C, o resultado do teste indicou a rejeição da hipótese de igualdade de médias dos tempos ($p=0,0014$). Portanto, não houve diferença significativa do tempo de perfusão entre os rins perfundidos com SSI e com solução de Euro-Collins adicionada de diltiazem. Porém, os rins perfundidos com solução de Euro-Collins tiveram um tempo de perfusão maior que os rins perfundidos com SSI e com solução de Euro-Collins adicionada de diltiazem, sendo esta diferença significativa.

4.2 TOTAL DE GLOMÉRULOS CONTADOS

TABELA 7 - VALORES DE p ENCONTRADOS NA COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DO NÚMERO TOTAL DE GLOMÉRULOS CONTADOS ENTRE OS GRUPOS A, B e C NOS PERÍODOS ANALISADOS

PERÍODO	GRUPOS COMPARADOS	VALOR DE p
12	A x B	0.1150
	A x C	0.1666
	B x C	0.9166
24	A x B	0.0361 *
	A x C	0.0361 *
	B x C	0.6015
36	A x B	0.0283 *
	A x C	0.2506
	B x C	0.6752
48	A x B	0.5284
	A x C	0.0749
	B x C	0.4620

* Comparações em que houve a rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5%.

A: rins perfundidos com solução salina isotônica.

B: rins perfundidos com solução de Euro-Collins.

C: rins perfundidos com solução de Euro-Collins adicionada de diltiazem.

Com relação ao número total de glomérulos contados, houve diferença significativa entre os grupos AxB e AxC no período de 24 horas e entre os grupos AxB no período de 36 horas ($p < 0,05$).

TABELA 8 - VALORES DE p ENCONTRADOS NA COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DO NÚMERO TOTAL DE GLOMÉRULOS CONTADOS ENTRE OS PERÍODOS 12, 24, 36 e 48 HORAS NOS GRUPOS ANALISADOS

GRUPO	PERÍODOS COMPARADOS	VALOR DE p
A	12 x 24	0.4578
	12 x 36	0.0640
	12 x 48	0.9161
	24 x 36	0.5896
	24 x 48	0.7533
	36 x 48	0.4633
B	12 x 24	0.9168
	12 x 36	0.4647
	12 x 48	0.0758
	24 x 36	0.4020
	24 x 48	0.2087
	36 x 48	0.3443
C	12 x 24	0.6742
	12 x 36	0.4005
	12 x 48	0.5982
	24 x 36	0.6733
	24 x 48	0.9158
	36 x 48	0.7526

A: rins perfundidos com solução salina isotônica.

B: rins perfundidos com solução de Euro-Collins.

C: rins perfundidos com solução de Euro-Collins adicionada de diltiazem.

Não houve diferença significativa do número total de glomérulos contados entre os diferentes períodos em cada grupo ($p < 0,05$).

TABELA 9 - VALOR MÉDIO, VALOR MÍNIMO E VALOR MÁXIMO DO NÚMERO DE GLOMÉRULOS CONTADOS NOS DIFERENTES GRUPOS E PERÍODOS

GRUPO	PERÍODO	MÉDIA	VALOR MIN	VALOR MÁX
A	I	90.40	87	102
A	II	85.80	66	98
A	III	85.20	78	98
A	IV	88.20	72	97
B	I	101.80	83	109
B	II	108.20	94	126
B	III	102.00	93	120
B	IV	93.40	82	103
C	I	102.20	87	114
C	II	98.80	95	104
C	III	95.60	75	111
C	IV	98.60	95	104
	Geral	95.85	66	126

A: rins perfundidos com solução salina isotônica.

B: rins perfundidos com solução de Euro-Collins.

C: rins perfundidos com solução de Euro-Collins adicionada de diltiazem.

I: rins preservados por período de 12 horas.

II: rins preservados por período de 24 horas.

III: rins preservados por período de 36 horas.

IV: rins preservados por período de 48 horas.

4.3 PERCENTUAL DE GLOMÉRULOS LESADOS

TABELA 10 - VALORES DE p ENCONTRADOS NA COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DO PERCENTUAL DE GLOMÉRULOS LESADOS ENTRE OS GRUPOS A, B e C NOS PERÍODOS ANALISADOS

PERÍODO	GRUPOS COMPARADOS	VALOR DE p
12	A x B	0.0723
	A x C	0.0947
	B x C	0.4101
24	A x B	0.0088 *
	A x C	0.0439 *
	B x C	0.2448
36	A x B	0.0088 *
	A x C	0.0723
	B x C	0.5296
48	A x B	0.0088 *
	A x C	0.3321
	B x C	0.3458

* Comparações em que houve a rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5%.

A: rins perfundidos com solução salina isotônica.

B: rins perfundidos com solução de Euro-Collins.

C: rins perfundidos com solução de Euro-Collins adicionada de diltiazem.

Em relação ao percentual de glomérulos lesados em cada período, encontrou-se diferença significativa entre os grupos AxB e AxC no período de 24 horas, entre os grupos AxB no período de 36 horas e entre os grupos AxB no período de 48 horas ($p < 0,05$).

TABELA 11 - VALORES DE p ENCONTRADOS NA COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DO PERCENTUAL DE GLOMÉRULOS LESADOS ENTRE OS PERÍODOS 12, 24, 36 e 48 HORAS NOS GRUPOS ANALISADOS

GRUPO	PERÍODOS COMPARADOS	VALOR DE p
A	12 x 24	0.0088 *
	12 x 36	0.0088 *
	12 x 48	0.0088 *
	24 x 36	0.3321
	24 x 48	0.3321
	36 x 48	0.9142
B	12 x 24	0.1732
	12 x 36	0.0749
	12 x 48	0.0465 *
	24 x 36	0.6015
	24 x 48	0.7540
	36 x 48	0.9168
C	12 x 24	0.5205
	12 x 36	0.0947
	12 x 48	0.0232 *
	24 x 36	0.1960
	24 x 48	0.0439 *
	36 x 48	0.4592

* Comparações em que houve a rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5%.

A: rins perfundidos com solução salina isotônica.

B: rins perfundidos com solução de Euro-Collins.

C: rins perfundidos com solução de Euro-Collins adicionada de diltiazem.

Em relação ao percentual de glomérulos lesados em cada grupo, houve diferença significativa entre os períodos 12x24, 12x36 e 12x48 horas no grupo A, entre os períodos 12x48 horas no grupo B, e entre os períodos 12x48 e 24x48 horas no grupo C ($p < 0,05$).

TABELA 12 - VALOR MÉDIO, VALOR MÍNIMO E VALOR MÁXIMO DO PERCENTUAL DE GLOMÉRULOS LESADOS NOS DIFERENTES GRUPOS E PERÍODOS

GRUPO	PERÍODO	MÉDIA	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
A	I	0.18	0.00	0.37
A	II	0.85	0.73	1.00
A	III	0.97	0.90	1.00
A	IV	0.96	0.90	1.00
B	I	0.02	0.00	0.04
B	II	0.16	0.02	0.64
B	III	0.03	0.01	0.05
B	IV	0.19	0.02	0.78
C	I	0.03	0.00	0.16
C	II	0.20	0.00	0.98
C	III	0.36	0.00	1.00
C	IV	0.52	0.02	1.00
Geral		0.37	0.00	1.00

A: rins perfundidos com solução salina isotônica.

B: rins perfundidos com solução de Euro-Collins.

C: rins perfundidos com solução de Euro-Collins adicionada de diltiazem.

I: rins preservados por período de 12 horas.

II: rins preservados por período de 24 horas.

III: rins preservados por período de 36 horas.

IV: rins preservados por período de 48 horas.

4.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE GLOMÉRULOS LESADOS E DANO TUBULAR

Para a investigação da associação entre glomérulos lesados e dano tubular, testou-se a hipótese nula de que não existe associação entre estas variáveis, contra a hipótese alternativa de que existe esta associação. O coeficiente de correlação de Spearman estimado foi de 0,7523 e o resultado do teste indicou a rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5% ($p < 0,0001$). Desta forma, pode-se perceber a existência de associação entre glomérulos lesados e dano tubular.

TABELA 13 - FREQUÊNCIAS OBSERVADAS NA COMPARAÇÃO DO GRAU DE LESÃO GLOMERULAR E DO DANO TUBULAR

Glomérulos	Dano Tubular				Total
	+	++	+++	++++	
Lesão leve	12	12	12	0	36
Lesão moderada	1	0	0	1	2
Lesão acentuada	0	0	4	4	8
Lesão severa	0	0	3	11	14
Total	13	12	19	16	60

5 DISCUSSÃO

Com a utilização cada vez maior de órgãos de doador-cadáver, a preservação renal tornou-se fator fundamental para a obtenção da função adequada do enxerto após o transplante. Nos últimos anos, tentativas têm sido feitas para melhorar a preservação renal a partir de alterações na composição das soluções empregadas para perfusão dos rins. Outro fator que tem sido alvo de sucessivos estudos é o método que possa determinar a viabilidade do órgão, mesmo antes do seu implante no receptor.

A escolha do rato como animal experimental no presente estudo deveu-se à facilidade na obtenção e manuseio do referido animal, e considerando a literatura que estabelece o rim isolado de rato como método exequível e confiável para a avaliação da preservação de órgãos (NAKAMOTO et al., 1988 e BIGUZAS et al., 1990).

A opção pela utilização do diltiazem neste trabalho foi baseada no mecanismo de ação deste bloqueador de canal de cálcio. O diltiazem aumenta o fluxo sanguíneo renal mediante vasodilatação direta das arteríolas aferentes do glomérulo. Também impede a entrada de íons cálcio para o espaço intracelular, conseqüentemente, interrompendo o ciclo vicioso iniciado pela isquemia, o qual leva ao dano celular. Além disso, esta substância aumenta o volume urinário e é natriurético, pela inibição da reabsorção de sódio nos túbulos distais. Isto aumenta o índice de filtração glomerular devido à maior perfusão renal produzida pelo aumento do débito cardíaco (BUCKLEY et al., 1990).

5.1 PESO DOS ANIMAIS, VOLUME E TEMPO DE PERFUSÃO

Em relação ao peso dos ratos ($p=0,1786$) e ao volume de solução perfundido ($p=0,9288$) em cada rato do experimento, os resultados demonstram que não houve diferença significativa entre os três grupos. Entretanto, os rins perfundidos com solução de Euro-Collins tiveram tempo de perfusão maior do que os rins perfundidos com SSI ($p=0,000001$) e do que os perfundidos com solução de Euro-Collins

adicionada de diltiazem ($p=0,0014$). Porém, não houve diferença significativa no tempo de perfusão entre os rins perfundidos com SSI e os perfundidos com solução de Euro-Collins adicionada de diltiazem ($p=0,0666$). No estudo de IRIARTE et al. (1981), houve diferença no tempo de perfusão inclusive entre os rins perfundidos com a mesma solução (Solução de Collins e solução de Sacks-Kaufman). A diferença no tempo de perfusão, encontrada no presente trabalho, pode ser devida às diferentes composições das soluções empregadas na perfusão renal. Isto faz com que determinada solução precise de tempo maior para perfundir um mesmo volume de perfusão.

5.2 ANATOMIA PATOLÓGICA

A inclusão do rim em parafina e a coloração de hematoxilina e eosina (HE) foram utilizadas por se tratarem de métodos de rotina em qualquer laboratório de anatomia patológica. Além disso, este método seria facilmente aplicável se houvesse a intenção de se extrapolar o experimento para situações do dia-a-dia do transplante renal, como, por exemplo, avaliação da viabilidade dos órgãos. Optou-se pela técnica de inclusão seriada do rim (BEESLEY; DANIEL, 1956) para que tanto a região cortical como a medular do órgão fossem observadas em todos os cortes histológicos. Este método garantiu a observação da maior superfície possível do órgão, para que não houvesse o risco de se avaliar a mesma face de corte do rim duas vezes.

Importante salientar que o experimento foi baseado na avaliação das alterações histológicas ocorridas nos órgãos perfundidos com diferentes soluções e preservados por períodos de tempo distintos, não sendo realizado o reimplante dos mesmos (preservação "in vitro"). O estudo, portanto, deteve-se nas alterações morfológicas encontradas, decorrentes do processo de preservação e viabilidade dos rins, sem avaliar a resposta do hospedeiro.

A maior parte dos trabalhos relatados na literatura estuda as alterações histológicas dos rins após o implante dos mesmos nos receptores. PERLOFF et al. (1973) estudaram os resultados de biópsias realizadas uma hora após o implante dos rins. Concluíram que esse tipo de teste não é útil para o prognóstico funcional

do enxerto, porém pode ser utilizado como parâmetro de comparação com achados de biópsias realizadas durante o período de seguimento do mesmo.

Como os órgãos perfundidos não foram reimplantados no presente estudo, a avaliação ficou restrita às alterações morfológicas de glomérulos e túbulos, já que não havia reação vital. Quando os rins são reimplantados e a avaliação histológica é feita após o transplante, observam-se diversas alterações patológicas, entre elas a reação inflamatória de diversos graus. Isto pode ser verificado no estudo de KINCAID-SMITH et al. (1968), em que foram realizadas biópsias em 25 rins imediatamente após o implante (30 minutos), sendo comparados o número de células polimorfonucleares encontradas nos glomérulos com a incidência e a severidade da rejeição. Os autores concluíram que a infiltração polimorfonuclear (4 ou mais células) no glomérulo, presente nos espécimes de biópsias realizadas trinta minutos após revascularização do enxerto, traduz um prognóstico ruim para a sobrevida prolongada do enxerto.

Nos 12 rins avaliados logo após o término da perfusão (período 0) no presente trabalho, a análise histológica não demonstrou glomérulos lesados e nem dano tubular. Portanto, estes achados demonstraram que a passagem da solução de perfusão pelo interior dos vasos renais e a pressão de perfusão não causaram alteração da arquitetura renal nos três grupos estudados. Com isso, estes rins foram utilizados como parâmetros para os rins dos demais períodos analisados. Resultado similar foi obtido por ACQUATELLA et al. (1972), sendo que a histologia dos rins perfundidos com solução de Collins, de cloreto de potássio e de sulfato de potássio, estava praticamente normal, exceto pela presença de citoplasma levemente edemaciado.

SABA et al. (1977) também encontraram mínimo dano da estrutura renal em ratos submetidos à perfusão com solução salina isotônica.

BREIMER et al. (1996) avaliaram rins de porcos submetidos à perfusão com solução de Euro-Collins. Os rins foram perfundidos por quatro períodos de tempo diferentes: 160, 123, 81 e 53 minutos, encontrando-se dano endotelial de grau variado. As lesões mais proeminentes foram encontradas nos rins perfundidos por 123 e 160 minutos, nos quais as células endoteliais encontravam-se separadas da

camada íntima da árvore arterial. Alterações similares, em menor intensidade, estavam presentes após 53 e 81 minutos de perfusão.

A contagem de glomérulos normais e lesados realizada de maneira comparativa e com o intuito de avaliar a preservação renal é um método pouco empregado na literatura. No presente estudo, foram contados, em média, 95.85 glomérulos em cada rim, com variação entre 66 e 126 glomérulos. Para se manter uma média do número de glomérulos contados, foi escolhido aleatoriamente o mesmo corte histológico, garantindo que a mesma área renal fosse avaliada em todos os casos. Os resultados demonstraram diferença estatisticamente significativa do número total de glomérulos contados entre os grupos SSI x Euro-Collins e SSI x Euro-Collins adicionada de diltiazem no período de 24 horas e entre os grupos SSI x Euro-Collins no período de 36 horas ($p < 0,05$). Entretanto, não houve diferença significativa entre os diferentes períodos em cada grupo ($p < 0,05$), confirmando que a contagem de glomérulos foi similar nos grupos avaliados.

A avaliação da lesão glomerular é outro fator utilizado para analisar, do ponto de vista histológico, as alterações ocorridas no enxerto após a perfusão e preservação do mesmo. GRENIER et al. (1973) estudaram as alterações morfológicas em rins de cães submetidos à perfusão com solução de Collins ou com substituto do plasma (Perfudex®) e preservados por vinte e quatro horas. Os autores graduaram estas alterações como sendo leve, quando poucos glomérulos apresentavam edema e congestão intersticial, moderada, quando os glomérulos apresentavam degeneração hidrópica, e severa, quando havia vacuolização do tufo glomerular. Concluíram que a maioria das alterações severas foi encontrada nos rins perfundidos com o substituto do plasma, e que as alterações leves foram encontradas nos rins perfundidos com solução de Collins.

O estudo de IRIARTE et al. (1981) constou da análise histológica de 64 rins de cães divididos em dois grupos, sendo um grupo submetido à perfusão simples e preservação sob hipotermia e outro à perfusão contínua. Os autores utilizaram o percentual de glomérulos e túbulos lesados para a avaliação dos resultados. Concluíram que a perfusão simples com solução de Collins ou Sacks-Kaufman levou a um menor percentual de glomérulos e túbulos lesados do que à perfusão contínua utilizando as mesmas soluções.

No presente estudo, avaliou-se a lesão glomerular ocorrida nos diferentes grupos e períodos. Quando foram comparados os grupos, não houve diferença significativa no percentual de glomérulos lesados entre os grupos A, B e C no período de 12 horas, demonstrando que as três diferentes soluções obtiveram resultados semelhantes na preservação renal durante este período. Estes dados estão de acordo com o trabalho de FISHER et al. (1967), que demonstraram haver mínima lesão glomerular nos rins perfundidos com solução de Ringer lactato e preservados sob hipotermia simples por até 12 horas. Porém, os resultados demonstraram existir diferença significativa no percentual de glomérulos lesados entre os grupos SSI x Euro-Collins nos períodos de 24, 36 e 48 horas e entre os grupos SSI x Euro-Collins adicionada de diltiazem no período de 24 horas ($p < 0,05$). Estes dados mostram que a solução de Euro-Collins, por se tratar de uma solução intracelular, foi mais efetiva na prevenção da lesão glomerular do que a SSI, que é extracelular.

SABA et al. (1977) também obtiveram o mesmo resultado estudando a preservação de rins de ratos. Os autores demonstraram que a solução de Sacks (intracelular) leva a um mínimo dano glomerular quando comparada com a solução fisiológica (extracelular).

Em relação à comparação entre os grupos Euro-Collins x Euro-Collins adicionada de diltiazem, não houve diferença significativa no percentual de glomérulos lesados em nenhum dos períodos analisados ($p < 0,05$), demonstrando que a adição de bloqueador de canal de cálcio à solução de EuroCollins não foi eficiente na prevenção da lesão glomerular, no presente estudo.

A literatura é controversa em relação aos resultados obtidos pelos bloqueadores de canal de cálcio na preservação renal. BLANK et al. (1984), avaliaram os efeitos da hipotermia e do verapamil em rins de ratos submetidos a sessenta minutos de isquemia, demonstrando que a hipotermia isolada fornece a melhor proteção, e que o verapamil não obteve efeitos protetores contra a isquemia quente e fria. Esses resultados foram confirmados pelos achados da microscopia eletrônica.

NAKAMOTO et al. (1988) analisaram os efeitos do verapamil na preservação renal após vinte e quatro horas de perfusão hipotérmica e compararam com a

perfusão simples utilizando solução de Euro-Collins. Os autores demonstraram que o verapamil não somente aumentou a preservação dos rins, como também melhorou a função deles após a reperfusão.

O fato de não ter sido encontrado, no presente estudo, diferença no percentual de lesão glomerular entre os grupos Euro-Collins x Euro-Collins adicionada de diltiazem, pode ser explicado pelo dano renal causado pela reperfusão tecidual. Lesões devido à isquemia/reperfusão tecidual têm sido descritas no miocárdio, cérebro, intestino, fígado e rim (LITTLE et al., 1973). Além disso, a reperfusão tecidual pode provocar lesão celular quando da reoxigenação tecidual.

A injúria celular decorrente da isquemia/reperfusão renal pode ser resultante de uma série de eventos: depleção das reservas de ATP, formação de radicais livres derivados do oxigênio, acidose celular, aumento do influxo celular de íons cálcio, ação lítica de algumas enzimas (proteases, fosfolipases) e apoptose celular. O fenômeno isquêmico/reperfusional envolve, também, a produção de mediadores inflamatórios, a ativação de células endoteliais e a ativação leucocitária (RHODEN et al., 1999).

Portanto, a ação protetora dos bloqueadores de canal de cálcio pode se dar quando do início da reperfusão tecidual. ANAISE et al. (1987) utilizaram bloqueador de canal de cálcio (verapamil) durante a perfusão de rins de cães e submetidos à reperfusão, após preservação por 48 e 72 horas. Demonstraram que esta substância exerce efeito favorável no fluxo sanguíneo renal, diminuindo os danos causados pela reperfusão tecidual.

Ainda com relação ao percentual de glomérulos lesados, o presente estudo avaliou os diferentes períodos em cada grupo. Houve diferença significativa no grupo A quando comparados os períodos 12x24, 12x36 e 12x48 horas, mostrando que a solução salina isotônica não é eficiente na preservação renal por período maior que doze horas.

Nos rins perfundidos com solução de Euro-Collins houve diferença significativa somente quando foram comparados os períodos 12x48 horas. No grupo dos rins perfundidos com solução de Euro-Collins adicionada de diltiazem houve diferença entre os períodos 12x48 e 24x48 horas. Estes dados sugerem que a

solução de EuroCollins, associada ou não ao diltiazem, fornece proteção contra o dano glomerular por período de até trinta e seis horas.

O menor percentual de glomérulos lesados encontrados nos rins perfundidos com solução de Euro-Collins, no presente estudo, também pode ser explicado pelo tempo de perfusão maior a que os rins deste grupo foram submetidos.

O dano tubular é outro fator importante observado nas alterações histológicas ocorridas em rins preservados. DUNN et al. (1984) estudaram rins de cães submetidos à perfusão contínua utilizando meio fluorocarbonado ao invés da suspensão eritrocitária. Foram realizadas biópsias antes e após 1, 3, 6, 12, 18 e 24 horas da colocação do órgão no circuito de perfusão. A estrutura tubular foi avaliada com relação ao grau de vacuolização do citoplasma e a patência da luz tubular. Os resultados demonstraram que o dano tubular foi menor nos rins em que se utilizou meio fluorocarbonado na perfusão.

DAHLAGER et al. (1976) avaliaram a integridade da função da célula tubular em rins preservados com solução de Collins ou com solução de Sacks. Os autores demonstraram que a solução de Collins foi superior na preservação das células tubulares.

No presente estudo foi realizada a avaliação do dano tubular, bem como a associação deste com o grau de lesão glomerular. Os resultados obtidos mostraram que quanto mais intenso o dano tubular maior o grau de lesão glomerular, e vice-versa. Desta maneira, onze dos quatorze rins que apresentaram lesão glomerular severa tiveram dano tubular severo. Entretanto, nenhum dos rins que apresentaram lesão glomerular leve teve dano tubular severo. Resultado similar foi obtido por HILL et al. (1976), que realizaram biópsia renal uma hora após o transplante e observaram que os rins com maior grau de alteração tubular se correlacionavam com uma lesão glomerular mais intensa, o que comprova a correlação direta existente entre o grau de alteração tubular e a lesão glomerular.

A contribuição deste trabalho no campo da preservação renal poderá ser ampliada no futuro com outras pesquisas, como, por exemplo, comparando-se novas soluções de perfusão ou comparando-se os resultados obtidos com alterações histológicas ocorridas nos órgãos após o transplante dos mesmos.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitiram as seguintes conclusões:

1. A perfusão com solução salina isotônica é efetiva na preservação da histologia renal por até 12 horas, verificando-se aumento do percentual de glomérulos lesados nos períodos de 24, 36 e 48 horas.
2. A perfusão com solução de Euro-Collins e a com Euro-Collins adicionada de diltiazem são efetivas na preservação da histologia renal por até 36 horas, verificando-se aumento do percentual de glomérulos lesados no período de 48 horas.
3. A adição de diltiazem à solução de Euro-Collins não diminui o percentual de glomérulos lesados, em comparação à solução de Euro-Collins isolada, nos períodos de 12, 24, 36 e 48 horas.

ANEXO

ANEXO**TABELA A1 - PESO EM GRAMAS DOS RATOS, TEMPO DE PERFUSÃO EM MINUTOS E VOLUME DE PERFUSÃO EM MILILITROS DO GRUPO A**

RATO	PESO	TEMPO	VOLUME
1	253	5	15
2	235	5	15
3	189	5	15
4	210	8	18
5	222	5	20
6	271	5	15
7	246	10	15
8	217	7	15
9	248	5	16
10	237	5	15

TABELA A2 - NÚMERO TOTAL DE GLOMÉRULOS CONTADOS NOS RINS DO GRUPO A

RATO	LADO	PERÍODO	NÚMERO TOTAL DE GLOMÉRULOS
1	X	I	87
1	Y	I	88
2	X	III	82
2	Y	IV	97
3	X	IV	97
3	Y	III	78
4	X	III	98
4	Y	IV	89
5	X	III	85
5	Y	III	83
6	X	I	102
6	Y	I	87
7	X	I	88
7	Y	II	98
8	X	II	66
8	Y	II	84
9	X	IV	86
9	Y	IV	72
10	X	II	94
10	Y	II	87

X – Rim direito

Y – Rim esquerdo

TABELA A3 - NÚMERO DE GLOMÉRULOS LESADOS NOS RINS DO GRUPO A

RATO	LADO	PERÍODO	NÚMERO DE GLOMÉRULOS LESADOS
1	X	I	12
1	Y	I	25
2	X	III	82
2	Y	IV	87
3	X	IV	97
3	Y	III	70
4	X	III	96
4	Y	IV	88
5	X	III	85
5	Y	III	80
6	X	I	0
6	Y	I	32
7	X	I	9
7	Y	II	76
8	X	II	66
8	Y	II	64
9	X	IV	86
9	Y	IV	65
10	X	II	69
10	Y	II	87

X – Rim direito

Y – Rim esquerdo

TABELA A4 - GRAU DE DANO TUBULAR NOS RINS DO GRUPO A

RATO	LADO	PERÍODO	DANO TUBULAR
1	X	I	+++
1	Y	I	+++
2	X	III	++++
2	Y	IV	+++
3	X	IV	++++
3	Y	III	++++
4	X	III	++++
4	Y	IV	++++
5	X	III	++++
5	Y	III	++++
6	X	I	+
6	Y	I	+
7	X	I	+
7	Y	II	+++
8	X	II	++++
8	Y	II	+++
9	X	IV	+++
9	Y	IV	+++
10	X	II	+++
10	Y	II	++++

TABELA A5 - PESO EM GRAMAS DOS RATOS, TEMPO EM MINUTOS E VOLUME EM MILILITROS DE PERFUSÃO DO GRUPO B

RATO	PESO	TEMPO	VOLUME
11	250	15	20
12	226	10	20
13	231	12	15
14	271	10	15
15	244	15	13
16	203	20	15
17	234	15	15
18	222	15	16
19	218	15	15
20	252	12	15

TABELA A6 - NÚMERO TOTAL DE GLOMÉRULOS CONTADOS NOS RINS DO GRUPO B

RATO	LADO	PERÍODO	NÚMERO TOTAL DE GLOMÉRULOS
11	X	I	104
11	Y	I	107
12	X	II	94
12	Y	I	109
13	X	I	106
13	Y	II	101
14	X	II	126
14	Y	II	124
15	X	I	83
15	Y	III	103
16	X	III	100
16	Y	III	94
17	X	III	120
17	Y	IV	82
18	X	IV	100
18	Y	III	93
19	X	IV	86
19	Y	IV	103
20	X	II	96
20	Y	IV	96

X – Rim direito

Y – Rim esquerdo

TABELA A7 - NÚMERO DE GLOMÉRULOS LESADOS NOS RINS DO GRUPO B

RATO	LADO	PERIODO	NÚMERO DE GLOMÉRULOS LESADOS
11	X	I	4
11	Y	I	2
12	X	II	60
12	Y	I	2
13	X	I	0
13	Y	II	4
14	X	II	2
14	Y	II	2
15	X	I	0
15	Y	III	4
16	X	III	4
16	Y	III	1
17	X	III	6
17	Y	IV	2
18	X	IV	3
18	Y	III	3
19	X	IV	2
19	Y	IV	11
20	X	II	11
20	Y	IV	75

X – Rim direito

Y – Rim esquerdo

TABELA A8 - GRAU DE DANO TUBULAR NOS RINS DO GRUPO B

RATO	LADO	PERÍODO	DANO TUBULAR
11	X	I	+
11	Y	I	+
12	X	II	+++
12	Y	I	+
13	X	I	++
13	Y	II	++
14	X	II	++
14	Y	II	+
15	X	I	+
15	Y	III	++
16	X	III	++
16	Y	III	+
17	X	III	++
17	Y	IV	++
18	X	IV	+++
18	Y	III	+++
19	X	IV	+++
19	Y	IV	+++
20	X	II	+++
20	Y	IV	++++

X – Rim direito

Y – Rim esquerdo

TABELA A9 - PESO EM GRAMAS DOS RATOS, TEMPO EM MINUTOS E VOLUME EM MILILITROS DE PERFUSÃO DO GRUPO C

RATO	PESO	TEMPO	VOLUME
21	275	10	20
22	242	10	19
23	261	10	15
24	236	10	15
25	225	15	15
26	255	10	18
27	237	5	15
28	260	5	15
29	246	5	15
30	248	5	15

TABELA A10 - NÚMERO TOTAL DE GLOMÉRULOS CONTADOS NOS RINS DO GRUPO C

RATO	LADO	PERÍODO	NÚMERO TOTAL DE GLOMÉRULOS
21	X	I	100
21	Y	I	114
22	X	I	114
22	Y	I	87
23	X	II	104
23	Y	I	96
24	X	II	95
24	Y	II	98
25	X	II	97
25	Y	III	111
26	X	II	100
26	Y	III	95
27	X	III	97
27	Y	III	100
28	X	IV	95
28	Y	III	75
29	X	IV	96
29	Y	IV	104
30	X	IV	98
30	Y	IV	100

TABELA A11 - NÚMERO DE GLOMÉRULOS LESADOS NOS RINS DO GRUPO C

RATO	LADO	PERÍODO	NÚMERO DE GLOMÉRULOS LESADOS
21	X	I	0
21	Y	I	18
22	X	I	0
22	Y	I	0
23	X	II	2
23	Y	I	0
24	X	II	0
24	Y	II	0
25	X	II	0
25	Y	III	4
26	X	II	98
26	Y	III	95
27	X	III	0
27	Y	III	4
28	X	IV	49
28	Y	III	55
29	X	IV	96
29	Y	IV	104
30	X	IV	8
30	Y	IV	2

X – Rim direito

Y – Rim esquerdo

TABELA A12 - GRAU DE DANO TUBULAR DOS RINS DO GRUPO C

RATO	LADO	PERÍODO	DANO TUBULAR
21	X	I	+
21	Y	I	++
22	X	I	+
22	Y	I	++
23	X	II	+++
23	Y	I	++
24	X	II	+
24	Y	II	++
25	X	II	+
25	Y	III	+++
26	X	II	++++
26	Y	III	++++
27	X	III	+++
27	Y	III	+++
28	X	IV	++++
28	Y	III	++++
29	X	IV	++++
29	Y	IV	++++
30	X	IV	++
30	Y	IV	+++

X – Rim direito

Y – Rim esquerdo

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANAISE, D.; LANE, B.; WALTZER, W. C. et al. The protective effect of calcium inhibitors and of Captopril on the renal microcirculation during reperfusion. **Transplantation**, Baltimore, v.43, n.1, p.128-133, Jan. 1987.
- ACQUATELLA, H.; PÉREZ-GONZÁLEZ, M.; MORALES, J. M. et al. Ionic and histological changes in the kidney after perfusion and storage for transplantation. **Transplantation**, Baltimore, v.14, n.4, p.480-489, Oct. 1972.
- ANDERSON, N.; WYLLIE, R.; WILLIAMS, M. Structural and metabolic changes in "preserved" renal allografts. **Surg. Forum**, New York, v.24, p.332-334, 1973.
- BANCROFT, J.D.; STEVENS, A. **Theory and practice of histological techniques**. 2. ed. New York : Churchill Livingstone, 1982.
- BEESELEY, R. A.; DANIEL, P. M. A simple method for preparing serial blocks of tissue. **J. Clin. Patol.**, London, v.9, p.267-268, 1956
- BELZER, F. O.; ASHBY, B. S.; DUNPHY, J. E. 24-hour and 72-hour preservation of canine kidneys. **Lancet**, London, p.536-539, Sept. 1967.
- BELZER, F. O. Renal preservation. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.291, n.8, p.402-404, Aug. 1974.
- BELZER, F. O.; GLASS, N. R.; SOLLINGER, H. W. et al. A new perfusate for kidney preservation. **Transplantation**, Baltimore, v.33, n.3, p.322-323, Mar. 1982.
- BELZER, F. O.; SOUTHARD, J. H. Principles of solid-organ preservation by cold storage. **Transplantation**, Baltimore, v.45, n.4, p.673-676, Apr. 1988.
- BIGUZAS, M.; JABLONSKI, P.; THOMAS, A. C. et al. Evaluation of UW solution in a rat kidney preservation model: effect of hydroxyethyl starch and electrolyte composition. **Transplantation**, Baltimore, v.49, n.5, p.872-875, May 1990.
- BIGUZAS, M.; JABLONSKI, P.; HOWDEN, A. C. et al. Evaluation of UW solution in rat kidney preservation: the effect of pharmacological additives. **Transplantation**, Baltimore, v.49, n.6, p.1051-1055, June 1990.
- BITTARD, H.; BENOIT, G.; MOUKARZEL, M. et al. Prediction of renal function by intraoperative renal blood flow and renal vascular resistance during kidney transplantation. **Transplant. Proc.**, E. Norwalk, v.23, n.5, p.2396, Oct. 1991.
- BITTARD, H.; CHICHE, L.; CAPRON, M. et al. Evaluation of kidney grafts in the BN rat after variable perfusion flow rates: microscopic aspects and intracellular ATP estimation. **Transplant. Proc.**, E. Norwalk, v.23, n.5, p.2397-2398, Oct. 1991.

- BLANK, W.; MOOPAN, M. M. U.; CHHAJWANI, B. et al. Effects of Verapamil on preservation of renal function after ischemia: functional and ultrastructural study. **J. Urol.**, Baltimore, v.131, p.992-994, May 1984.
- BREIMER, M. E.; SVALANDER, C. T.; HARALDSSON, B. et al. Physiological and histological characterisation of pig kidney "in vitro" perfusion model for xenotransplantation studies. **Scand. J. Urol. Nephrol.**, Stockholm, v.30, p.213-221, 1996.
- BUCKLEY, M. M. T.; GRANT, S. M.; GOA, K. L. et al. Diltiazem – a reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use. **Drugs**, Auckland, v.39, n.5, p.757-806, 1990.
- BURKE, T. J.; ARNOLD, P. E.; GORDON, J. A. et al. Protective effect of intrarenal calcium membrane blockers before or after renal ischemia: functional, morphological, and mitochondrial studies. **J. Clin. Invest.**, New York, v.74, p.1830-1841, Nov. 1984.
- CHAGNAC, A.; ZEVIN, D.; ORI, Y. et al. The effect of high-dose nifedipine on renal hemodynamics of cyclosporine-treated renal allograft recipients. **Transplantation**, Baltimore, v.53, n.4, p.766-769, Apr. 1992.
- COLLINS, G. M.; BRAVO-SHUGARMAN, M.; TERASAKI, P. I. Kidney preservation for transportation: initial perfusion and 30 hours` ice storage. **Lancet**, London, p.1219-1222, Dec. 1969.
- COLLINS, G. M.; HARTLEY, L. C. J.; CLUNIE, G. J. A. Kidney preservation for transportation: experimental analysis of optimal perfusate composition. **Brit. J. Surg.**, London, v.59, n.3, p.187-189, Mar. 1972.
- COLLINS, G. M.; HALASZ, N. A. Composition of intracellular flush solutions for hypothermic kidney storage. **Lancet**, London, p.220, Jan. 1975.
- DAHLAGER, J. I.; BILDE, T. The integrity of tubular cell function after preservation in Collins` or Sacks` solution. **Transplantation**, Baltimore, v.21, n.5, p.365-369, May 1976.
- DIETZMAN, R. H.; REBELO, A. E.; GRAHAM, E. F. et al. Long-term functional success following freezing of canine kidneys. **Surgery**, St. Louis, v.74, n.2, p.181-189, Aug. 1973.
- DUNN, R. N.; MERKEL, F. K.; ROSEMAN, D. et al. Experimental normothermic kidney preservation: histological considerations. **Proc. EDTA**, London, v.18, p.410-415, 1984.

- FILO, R. S.; DICKSON, L. G.; SUBA, E. A. et al. Immunologic injury induced by ex vivo perfusion of canine renal autografts. **Surgery**, St. Louis, v.76, n.1, p.88-100, July 1974.
- FISHER, E. R.; COPELAND, C.; FISHER, B. Correlation of ultrastructure and function following hypothermic preservation of canine kidneys. **Lab. Invest.**, Baltimore, v.17, n.1, p.99-119, 1967.
- FRÖDIN, L. Renal transplantation in the rat: the effect of colloidal and non-colloidal perfusates on the clearing of blood from the "in vitro" perfused rat kidney. **Scand. J. Urol. Nephrol.**, Stockholm, v.9, p.75-79, 1975.
- GARVIN, P. J.; BUTTORFF, J. D.; MORGAN, R. et al. In situ cold perfusion of kidneys for transplantation: an experimental and clinical evaluation. **Arch. Surg.**, Chicago, v.115, p.180-182, Feb. 1980.
- GREEN, C. J.; HEALING, G.; LUNEC, J. et al. Evidence of free-radical-induced damage in rabbit kidneys after simple hypothermic preservation and autotransplantation. **Transplantation**, Baltimore, v.41, n.2, p.161-165, Feb. 1986.
- GRENIER, J. F.; DAUCHEL, J.; JAECK, D. et al. Comparison of two electrolyte solutions for short perfusion and hypothermic storage in experimental renal preservation. **Brit. J. Surg.**, London, v.60, n.12, p.964-968, Dec. 1973.
- HALASZ, N. A.; COLLINS, G. M. Forty-eight-hour kidney preservation: a comparison of flushing and ice storage with perfusion. **Arch. Surg.**, Chicago, v.111, p.175-177, Feb. 1976.
- HEIL, J. E.; CANAFAX, D. M.; SUTHERLAND, D. E. R. et al. A controlled comparison of kidney preservation by two methods: machine perfusion and cold storage. **Transplant. Proc.**, E. Norwalk, v.19, n.1, p.2046, Feb. 1987.
- HERTLE, L.; GARTHOFF, B. Calcium channel blocker nisoldipine limits ischemic damage in rat kidney. **J. Urol.**, Baltimore, v.134, p.1251-1254, Dec. 1985.
- HILL, G. S.; LIGHT, J. A.; PERLOFF, L. J. Perfusion-related injury in renal transplantation. **Surgery**, St. Louis, v.79, n.4, p.440-447, Apr. 1976.
- HOWDEN, B.; RAE, D.; JABLONSKI, P. et al. Studies of renal preservation using a rat kidney transplant model: evaluation of citrate flushing. **Transplantation**, Baltimore, v.35, n.4, p.311-314, Apr. 1983.
- IRIARTE, E. G.; MIGUEL, E.; AVELLANA, J. A. et al. Conservación renal: estudio experimental comparativo del método de simple inmersión bajo hipotermia y la técnica combinada de perfusión continua e hipotermia. **Actas Urol. Esp.**, Madrid, v.5, n.5, p.273-280, 1981.

- JABLONSKI, P.; HOWDEN, B.; MARSHALL, V. et al. Evaluation of citrate flushing solution using the isolated perfused rat kidney. **Transplantation**, Baltimore, v.30, n.4, p.239-243, Oct. 1980.
- JOHNSON, R. W. G.; ANDERSON, M.; FLEAR, C. T. G. et al. Evaluation of a new perfusion solution for kidney preservation. **Transplantation**, Baltimore, v.13, n.3, p.270-275, Mar. 1972.
- KEMP, E.; LARSEN, S.; JORGENSEN, K. A. et al. Flush perfusion of rabbit kidneys with autogeneic, allogeneic and xenogeneic blood. **Scand. J. Urol. Nephrol.**, Stockholm, v.25, p.45-49, 1991.
- KINCAID-SMITH, P.; MORRIS, P. J.; SAKER, B. M. et al. Immediate renal-graft biopsy and subsequent rejection. **Lancet**, London, p.748-749, Oct. 1968.
- LAKEY, W. H. Kidney preservation: experimental studies. **Trans. Am. Assoc. Genitourin. Surg.**, Baltimore, v.69, p.125-130, 1978.
- LAMBERT, R.; CARROL, N.; HENRY, M. et al. Glomerular epithelial cell lesions in rat renal isografts. **Pathology**, Philadelphia, v.19, p.31-37, Jan. 1987.
- LANE, N. J.; THORNILEY, M. S.; MANEK, S. et al. Effect of mannitol and polyethylene glycol on the action of frusemide during renal storage and transplantation. **Transplantation**, Baltimore, v.62, n.5, p.575-582, Sept. 1996.
- LEE, S. An improved technique of renal transplantation in the rat. **Surgery**, St. Louis, v.61, n.5, p.771-773, May 1967.
- LITTLE, J. H.; COOPER, P.; SARWAT, A. et al. Factors influencing endothelial injury and vascular thrombosis after perfusion. **J. Surg. Res.**, New York, v.14, n.3, p.221-227, Mar. 1973.
- MARSHALL, V. C.; JABLONSKI, P.; SCOTT, D. F. Renal preservation. In: MORRIS, P. J. **Kidney transplantation**. 4. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1994. p.86-108.
- MARTIN, D. C.; SMITH, G.; FAREED, D. O. Experimental renal preservation. **J. Urol.**, Baltimore, v.103, p.681-685, June 1970.
- MOBERG, A. W.; MOZES, M. F.; CAMPOS, R. A. et al. Simplification of organ preservation techniques: experimental and clinical experience. **Transplant. Proc.**, E. Norwalk, v.4, n.4, p.611-615, Dec. 1972.
- NAKAMOTO, M.; SHAPIRO, J. I.; MILLS, S. D. et al. Improvement of renal preservation by Verapamil with 24-hour cold perfusion in the isolated rat kidney. **Transplantation**, Baltimore, v.45, n.2, p.313-315, Feb. 1988.

- OPELZ, G.; TERASAKI, P. Kidney preservation: perfusion versus cold storage. **Transplant. Proc.**, E. Norwalk, v.8, n.1, p.121-125, Mar. 1976.
- PEGG, D. E.; FOREMAN, J.; HUNT, C. J. et al. The mechanism of action of retrograde oxygen persufflation in renal preservation. **Transplantation**, Baltimore, v.48, n.2, p.210-217, Aug. 1989.
- PERLOFF, L. J.; GOODLOE JR., S.; JENIS, E. H. et al. Value of one-hour renal-allograft biopsy. **Lancet**, London, p.1294-1295, Dec. 1973.
- PLOEG, R. J. Kidney preservation with the UW and Euro-Collins solutions: a preliminary report of a clinical comparison. **Transplantation**, Baltimore, v.49, n.2, p.281-284, Feb. 1990.
- PUIG, J. M.; LLOVERAS, J.; OLIVERAS, A. et al. Usefulness of Diltiazem in reducing the incidence of acute tubular necrosis in Euro-Collins-Preserved cadaveric renal grafts. **Transplant. Proc.**, E. Norwalk, v.23, n.5, p.2368-2369, Oct. 1991.
- RHODEN, E. L.; RHODEN, C. R.; MAURI, M. et al. Modelo experimental de isquemia-reperfusão renal em ratos: estudo do estresse oxidativo provocado pelos radicais livres derivados do oxigênio. **J. Bras. Urol.**, São Paulo, v.25, n.3, p.431-436, jul./set. 1999.
- SABA, V.; ORSO, G.; PETRINI, E. et al. Problemi di perfusione e conservazione di rene di ratto isolato a scopo di trapianto. **Chirurgia Italiana**, Verona, v.29, n.3, p.308-318, 1977.
- SACKS, S. A.; PETRITSCH, P. H.; KAUFMAN, J. J. Canine kidney preservation using a new perfusate. **Lancet**, London, p.1024-1026, May 1973.
- SHAPIRO, J. I.; CHEUNG, C.; ITABASHI, A. et al. The effect of Verapamil on renal function after warm and cold ischemia in the isolated perfused rat kidney. **Transplantation**, Baltimore, v.40, n.6, p.596-600, Dec. 1985.
- SIEGEL, Sidney. **Estatística não-paramétrica**. 3. Ed. New York: McGraw-Hill, 1981. p.209-217.
- SOUTHARD, J. H.; SENZIG, K. A.; HOFFMANN, R. M. et al. Energy metabolism in kidneys stored by simple hypothermia. **Transplant. Proc.**, E. Norwalk, v.9, n.3, p.1535-1539, Sept. 1977.
- TAKENAKA, M.; TATSUKAWA, Y.; YAMANE, S. et al. An experimental model to test the viability of ischemic kidney. **Transplantation**, Baltimore, v.30, n.4, p.311-312, Oct. 1980.
- UEDA, Y.; TODO, S.; IMVENTARZA, O. et al. The UW solution for canine kidney preservation. **Transplantation**, Baltimore, v.48, n.6, p.913-918, Dec. 1989.

WAYNFORTH, H. B.; FLECKNELL, P. A. **Experimental and surgical technique in the rat.** 2. ed. San Diego : Academic Press, 1992.

WILLIAMS, G.; PEET, T. N. D.; HAMSHERE, R. J. Assessment of a test of renal viability. **B. M. J.**, London, v.2, p.75-77, July 1976.