

RAIMUNDO MESSIAS DE ARAUJO FILHO

***EFEITOS COMPARATIVOS DO GLUTATION(GSH) EM
DOIS MODELOS DE SOLUÇÃO PRESERVADORA NO
RIM PERFUNDIDO DO COELHO***

TESE APRESENTADA AO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FARMACOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM FARMACOLOGIA

PROF. ORIENTADOR: MANASSÉS CLAUDINO FONTELES

TESE
T615.1
16586
2015

FC-00002601-3

1995

C208320

R483893

UFC	BIBLIOTECA CENTRAL
Nº	1129
28 1 11 195	

UFC	BIBLIOTECA CENTRAL
Nº	483893
02 1 05 196	

RAIMUNDO MESSIAS DE ARAUJO FILHO

TITULO DA TESE

DISSERTACAO APRESENTADA A UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSARIOS PARA OBTENCAO DO GRAU DE MESTRE EM FARMACOLOGIA.

APROVADO POR:



PROF. DR. MANASSES C. FONTELES



PROF. DR. HENRY DE H. CAMPOS



PROF. DRA. ADRIANA C. E FORTI

ORIENTADOR

PROF. MANASSÉS CLAUDINO FONTELES

CO-ORIENTADOR

PROF. HENRY DE HOLANDA CAMPOS

**TRABALHO REALIZADO NA UNIDADE DE
PESQUISAS CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ, COM RECURSOS DESTA
UNIDADE E DO CENTRO DE PESQUISAS EM
DOENÇAS HEPATO-RENAIS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ E TAMBÉM COM O APOIO
FINANCEIRO DO CNPq**

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Professor MANASSÉS CLAUDINO FONTELES, orientador deste trabalho, Professor pesquisador do CNPq, e Coordenador da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará pelo constante incentivo e valiosa colaboração em todas as etapas deste trabalho o que me fez sempre acreditar que é possível fazer Ciência.

Ao Professor HENRY DE HOLANDA CAMPOS, co-orientador deste trabalho, Professor Adjunto de Nefrologia do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará, que sempre me estimulou e acreditou no meu potencial científico.

AGRADECIMENTOS

* À estudante do Curso de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Manuela Meirelles Cabral Alves, bolsista do CNPQ, pela colaboração na realização deste trabalho.

* Aos técnicos José Wilson de Oliveira Pascoal, Valéria Jane Militão Barroso, Terezinha França Freire e Joana Araujo Tavares pela valiosa colaboração.

* À técnica de Laboratório Maria Silvia Helena de França pela realização cuidadosa do preparo das Soluções de preservação e também das dosagens bioquímicas.

* Ao Dr. Domingos Barreto de oliveira pela realização das dosagens do glutathion.

* Ao Professor Aldo Ângelo Moreira Lima por ter cedido seus computadores Macintosh que foram essenciais na confecção dos gráficos.

* Ao Professor João Batista Evangelista Júnior, do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará pela amizade e incentivo constante.

* À todos os amigos e colegas que fazem parte do Centro de Pesquisas em Doenças Hepato-Renais da Universidade Federal do Ceará.

* À todos os amigos que fazem parte da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará.

* À todos os amigos e colegas do Departamento de Farmacologia e Fisiologia da Universidade Federal do Ceará.

**A meu pai(in memorian), por ter sempre me dirigido
para o caminho do trabalho, da honestidade e da sinceridade.**

**À minha mãe que com os ensinamentos de meu pai me deu todo
seu amor e dedicação.**

**À minha grandiosa esposa que pela certeza de seu amor incondicional
sempre teve paciência e fé.**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1A.** Dinâmica de perfusão de rins perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit contendo 4g% de albumina bovina.
- Tabela 1B.** Avaliação funcional distal e segmentar de rins perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit contendo 4g% de albumina bovina.
- Tabela 2A.** Dinâmica de perfusão de rins perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit contendo 4g% de albumina bovina e 2 mM de GSH.
- Tabela 2B.** Avaliação funcional distal e segmentar de rins perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit contendo 4g% de albumina bovina e 2 mM de GSH.
- Tabela 2C.** Avaliação funcional da concentração de glutathion em rins perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit contendo 4g% de albumina bovina e 2 mM de GSH.
- Tabela 3A.** Dinâmica de perfusão de rins perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit contendo 4g% de albumina bovina e 4 mM de GSH.
- Tabela 3B.** Avaliação funcional distal e segmentar de rins perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit contendo 4g% de albumina bovina e 4 mM de GSH.
- Tabela 3C.** Avaliação funcional da concentração de glutathion em rins perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit contendo 4g% de albumina bovina e 4 mM de GSH.
- Tabela 4A.** Dinâmica de perfusão de rins perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit contendo 4g% de albumina bovina e 6 mM de GSH.
- Tabela 4B.** Avaliação funcional distal e segmentar de rins perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit contendo 4g% de albumina bovina e 6 mM de GSH.

Tabela 4C. Avaliação funcional da concentração de glutathione em rins perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit contendo 4g% de albumina bovina e 6 mM de GSH.

Tabela 5A. Dinâmica de perfusão de rins perfundidos com Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

Tabela 5B. Avaliação funcional distal e segmentar de rins perfundidos com Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

Tabela 6A. Dinâmica de perfusão de rins perfundidos com Solução A contendo 4g% de albumina bovina e 4 mM de GSH.

Tabela 6B. Avaliação funcional distal e segmentar de rins perfundidos com Solução A contendo 4g% de albumina bovina e 4 mM de GSH.

Tabela 6C. Avaliação funcional da concentração de glutathione em rins perfundidos com Solução A contendo 4g% de albumina bovina e 4 mM de GSH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistema de perfusão

Figura 2A. Cinética do fluxo plasmático de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

Figura 2B. Fluxo plasmático de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

Figura 3A. Cinética da resistência vascular de coelhos perfundidos com solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

Figura 3B. Resistência vascular de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

Figura 4A. Cinética do clearance de inulina de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

Figura 4B. Clearance de inulina de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

Figura 5A. Cinética da carga de sódio reabsorvida de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

Figura 5B. Carga de sódio reabsorvida de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

Figura 6A. Cinética da fração de sódio reabsorvida de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

Figura 6B. Fração de sódio reabsorvida de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

Figura 7A. Cinética da carga de potássio reabsorvida de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

Figura 7B. Carga de potássio reabsorvida de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

- Figura 8A.** Cinética da fração de potássio reabsorvida de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.
- Figura 8B.** Fração de potássio reabsorvida de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.
- Figura 9A.** Cinética do clearance osmolar de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.
- Figura 9B.** Clearance osmolar de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.
- Figura 10A.** Cinética do clearance de água livre de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.
- Figura 10B.** Clearance de água livre de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.
- Figura 11A.** Cinética da carga de glutatión reabsorvida de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.
- Figura 11B.** Carga de glutatión reabsorvida de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.
- Figura 12A.** Cinética do clearance de glutatión de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.
- Figura 12B.** Clearance de glutatión de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.
- Figura 13.** Composição de sódio intratissular de rins perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.
- Figura 14.** Composição de potássio intratissular de rins perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.
- Figura 15.** Percentuais de sódio de rins perfundidos em relação aos rins controles com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.
- Figura 16.** Percentuais de potássio de rins perfundidos em relação aos rins controles com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.
- Figura 17.** Regressão linear mostrando balanço glomérulo-tubular de rins perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit contendo 4g% de albumina bovina.

Figura 18. Regressão linear mostrando balanço glomérulo-tubular de rins perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit contendo 4g% de albumina bovina e 2 mM de GSH.

Figura 19. Regressão linear mostrando balanço glomérulo-tubular de rins perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit contendo 4g% de albumina bovina e 4 mM de GSH.

Figura 20. Regressão linear mostrando balanço glomérulo-tubular de rins perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit contendo 4g% de albumina bovina e 6 mM de GSH.

Figura 21. Regressão linear mostrando balanço glomérulo-tubular de rins perfundidos com Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

Figura 22. Regressão linear mostrando balanço glomérulo-tubular de rins perfundidos com Solução A contendo 4g% de albumina bovina e 4 mM de GSH.

LISTA DE ABREVIATURAS

NTA: Necrose tubular aguda

UW: Universidade de Wisconsin

EC: EuroCollins

PBS: Solução de sucrose tamponada com fosfato

RFG: Ritmo de filtração glomerular

GSH: Glutation

C_{IN}: Clearance de inulina

TNa⁺: Transporte de sódio

PGE₂: Prostaglandina E₂

R: Resistência vascular renal

FP: Fluxo plasmático renal

FU: Fluxo urinário

TK⁺: Transporte de potássio

AD: Aporte Distal

COSM: Clearance osmolar

CH₂O: Clearance de água livre

PDTNa⁺: Transporte de sódio distal

PPTNa⁺: Transporte de sódio proxima

INDICE

ASSUNTO:

1) ABSTRACT/RESUMO

- 1.1 SUMMARY
- 1.2 RESUMO

2) INTRODUÇÃO

- 2.1 PRESERVAÇÃO RENAL.....2-10
- 2.2 PERFUSÃO RENAL.....11-17
- 2.3 GLUTATION.....18-24
- 2.4 OBJETIVOS.....25

3) MATERIAIS E MÉTODOS

- 3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO.....27
- 3.2 GRUPOS DE ANIMAIS.....27-28
- 3.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....29-30
- 3.4 SISTEMA DE PERFUSÃO.....31-33
- 3.5 SOLUÇÃO DE PERFUSÃO.....34-35
- 3.6 PROTOCOLO DE PERFUSÃO.....36
- 3.7 PARÂMETROS FISIOLÓGICOS.....37-41
- 3.8 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....42

3.9 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS.....	43-45
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
4) RESULTADOS	
4.1 PERFUSÃO RENAL COM SOLUÇÃO DE KREBS-HENSELEIT CONTENDO 4G% DE ALBUMINA BOVINA.....	47-50
4.2 PERFUSÃO RENAL COM SOLUÇÃO DE KREBS-HENSELEIT CONTENDO 4G% DE ALBUMINA BOVINA E 2 mM DE GSH.....	51-55
4.3 PERFUSÃO RENAL COM SOLUÇÃO DE KREBS-HENSELEIT CONTENDO 4G% DE ALBUMINA BOVINA E 4 mM DE GSH.....	56-61
4.4 PERFUSÃO RENAL COM SOLUÇÃO DE KREBS-HENSELEIT CONTENDO 4G% DE ALBUMINA BOVINA E 6 mM DE GSH.....	62-67
4.5 PERFUSÃO RENAL COM SOLUÇÃO A CONTENDO 4G% DE ALBUMINA BOVINA.....	68-72
4.6 PERFUSÃO RENAL COM SOLUÇÃO A CONTENDO 4G% DE ALBUMINA BOVINA E 4 mM DE GSH.....	73-79
4.7 ASPECTOS COMPARATIVOS DA DINÂMICA DE PERFUSÃO RENAL ENTRE OS DIVERSOS GRUPOS.....	80-105
4.8 DETERMINAÇÃO DE ELETRÓLITOS INTRATISSULARES RENAI.....	106-111
4.9 BALANÇO GLOMÉRULO-TUBULAR.....	112-119
5) DISCUSSÃO.....	121-127
6) CONCLUSÃO.....	129-130
7) BIBLIOGRAFIA.....	132-141

SUMMARY

In order to evaluate relevant aspects related to organ preservation, renal parameters were examined in rabbit kidneys perfused "ex-vivo" either with Krebs-Henseleit solution, or with solution A, containing high potassium and magnesium concentrations. Glutathione(GSH) was added to the perfusate and its effects on renal functional parameters were also analysed.

Addition of GSH to the perfusate in rabbit kidneys perfused with Krebs-Henseleit had no influence on the glomerular filtration rate and induced no metabolic benefit on fractional Na^+ reabsorption, but a significant reduction of fractional K^+ was obtained($p < 0,04$).

In kidneys perfused with solution A, lower glomerular filtration rates and decreased Na^+ fractional transport were observed, as compared to Krebs-Henseleit perfused kidneys($p < 0,02$). This pattern was also observed in kidneys perfused with different GSH concentrations. Despite high K^+ concentrations of solution A, no difference was seen concerning K^+ reabsorption, but a significant increase in free water clearance was noted in solution A perfused kidneys($p < 0,05$). Addition of 4 mM to solution A induced higher Na^+ reabsorption($p < 0,02$) and an increase in osmolar clearance($p < 0,05$).

Addition of 4 mM GSH to solution A greatly enhanced Na^+ reabsorption($p < 0,002$) and also modified K^+ transport. Although no effects of GSH addition to solution A were observed in distal function related free water clearance, osmolar clearance was significantly increased in this group($p < 0,05$).

Our results suggest that addition of GSH to the perfusate, either Krebs-Henseleit solution or solution A, has no influence on GFR, but enhances ions transport when a solution with high potassium and magnesium content is used.

RESUMO

Com o objetivo de estudar diferenças funcionais e preservativas, rins de coelhos foram perfundidos "ex-vivo" com Solução de Krebs-Henseleit e um perfusato rico em potássio e magnésio(Solução A). Os efeitos do glutathione(GSH), um tripeptídeo, foram comparados na função renal e as concentrações de 2, 4 e 6 mM foram testadas nos rins perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e uma concentração média do tripeptídeo(4 mM) foi testada em rins perfundidos com Solução A.

Os resultados obtidos com a adição de GSH ao perfusato composto por Solução de Krebs-Henseleit permitiram concluir que a substância não exerce efeitos no ritmo de filtração glomerular(RFG). A fração de sódio reabsorvida não demonstrou benefício metabólico com a adição de GSH, enquanto que o transporte fracionário de potássio diminuiu significativamente($p < 0,04$).

Os rins perfundidos com Solução A apresentaram menor ritmo de filtração glomerular e taxa fracionária de transporte de sódio quando comparados com o grupo perfundido com Solução de Krebs-Henseleit($p < 0,02$). Essa diferença persiste quando foram comparados igualmente os rins perfundidos com diferentes concentrações de GSH. Quanto à fração de potássio reabsorvida, apesar das altas concentrações de potássio da Solução A, não se observou diferenças no transporte fracionário. Todavia, a função distal do néfron foi significativamente superior no grupo perfundido com soluto de composição extracelular, isso quanto a água livre já que o clearance osmolar foi semelhante em ambos os grupos($p < 0,05$).

A adição de 4 mM de GSH no grupo perfundido com Solução A aumentou consideravelmente a taxa de reabsorção de sódio ($p < 0,002$), quando comparado com o grupo perfundido somente com Solução A, demonstrando um efeito muito grande no incremento do transporte deste íon. O íon potássio também é igualmente modificado no seu transporte pela presença de GSH. Não se observou, todavia, efeitos do GSH na função distal no que diz respeito à água livre de rins perfundidos com Solução A. Todavia, o clearance osmolar foi grandemente influenciado pela ação do GSH nos rins perfundidos com Solução A ($p < 0,05$).

Nossos resultados sugerem que a adição do GSH ao perfusato, tanto na Solução de Krebs-Henseleit como na Solução A, não tem influência no ritmo de filtração glomerular, mas altera sensivelmente o transporte de íons quando uma solução contendo altas concentrações de potássio e magnésio (Solução A) é usada.

INTRODUÇÃO

1-PRESERVAÇÃO RENAL

Somente após o desenvolvimento de um método de conservação *in vitro* superior a 24 horas é que o transplante renal tornou-se uma terapêutica realista. O alongamento do período de conservação traz necessariamente uma modificação da fisionomia do programa de transplantes. Se conseguirmos conservar indefinidamente os órgãos a serem transplantados, veremos nascer os primeiros bancos de órgãos, o desaparecimento progressivo das listas de espera e a possibilidade de uma preparação imunológica do futuro receptor específico do seu doador com o objetivo de induzir uma tolerância do enxerto.

Se fossem resolvidos todos os problemas imunológicos e os outros problemas envolvidos na procura de um órgão normal funcionante, ainda permaneceriam os problemas da preservação e da estocagem de órgãos, que apresentam muitas dificuldades(Hendry e cols., 1965).

Os tempos médios de preservação têm aumentado constantemente. Rins eram preservados por somente 2 a 3 horas na década de sessenta. Antes de 1967, metade dos enxertos relatados eram estocados por 2 horas ou menos, e somente 10% por mais de 4 horas. Um ou dois dias era o normal na década de oitenta. Tempos de 12 a 24 horas são frequentemente adequados, mas muitos rins são transplantados depois de 24 a 48 horas de estocagem, e ocasionalmente a estocagem estende para o terceiro dia. Muito deste tempo é gasto na tipagem, seleção do receptor e transporte(Marshall, 1984).

Os problemas dominantes no transplante de órgãos estão ligados às reações imunológicas e à preservação da viabilidade do tecido até que o receptor seja capaz

de receber o transplante(Brunius e cols., 1966). Avanços recentes em transplante renal e o desenvolvimento de métodos efetivos de estocagem extracorpórea a curto prazo têm criado a necessidade para o desenvolvimento de meios seguros de avaliação funcional de rins antes do transplante. Foi demonstrado que a vasoconstrição agonal é a maior causa de perda funcional dos rins transplantados de doadores cadáveres. A sobrevida do enxerto renal não é sempre diretamente relacionada ao tempo de isquemia quente(Malinin e Hollerman, 1972). O transplante renal com rins de cadáveres é agora um tratamento comum e usado em todo o mundo. Um pré-requisito para bons resultados é o rápido estabelecimento da função renal após o transplante. Um dos métodos usados para conseguir este objetivo é a técnica que permite a estocagem de um rim doado desde que este rim não tenha sofrido durante a preservação(Skaaring e cols., 1975).

A preservação de órgãos tem sido alcançada por resfriamento, por perfusão permanente e por tratamento com alta pressão de oxigênio. A sobrevida dependerá do grau de dano celular produzido na ausência de fluxo durante o intervalo de tempo entre a remoção e a reimplantação, que também influenciará as possibilidades para restabelecer a circulação depois da reimplantação(Brunius e cols., 1966).

A preservação deve manter as funções vitais por mais de 3 dias de estocagem. A função imediata não é obrigatória, mas é altamente desejável. Necrose tubular aguda temporária(NTA) é a causa mais comum de não-função precoce. A frequência de NTA é influenciada pelo grau de isquemia ocorrida no doador, pelo tempo de estocagem e por outros vários fatores no receptor. Em Oxford, na Inglaterra, 55% dos enxertos funcionaram imediatamente(uma média de estocagem de 19 horas). Em Melbourne, na Austrália, na década de sessenta, com uma média de tempo de estocagem de 4 horas, a proporção de enxertos com função imediata foi de 80%, em 1978, com uma média de estocagem de 17 horas foi de 45%, e em 1982, com uma média de tempo de estocagem de 26 horas caiu para 35%(Marshall, 1984).

A frequência das NTA, então, aumenta com a estocagem prolongada, mas a isquemia quente é de grande importância. Experimentalmente o efeito de 30 minutos de isquemia quente é mais prejudicial do que 24 horas adicionais de estocagem fria. O maior objetivo da preservação renal é, então, estender seguramente o tempo de preservação sem aumentar significativamente a frequência de necrose tubular aguda(Marshall, 1984).

Os tempos de preservação têm sido estendidos com sucesso por mais de 24 horas sem prejudicar os resultados tardios do transplante. Problemas tubulares e intersticiais foram relatados serem maiores em rins estocados por mais de 24 horas, mas a sobrevivência do enxerto de 2 anos não foi reduzida. A preservação efetivamente começa com a identificação e preparação do doador. O estado da função renal no tempo da remoção do rim é de grande importância(Marshall, 1984). A solução da Universidade de Wisconsin(UW) tem sido mostrada ser uma solução de preservação efetiva para estocagem fria de rins, fígado, e pâncreas em preparação para transplante(Ploeg e cols., 1988; Nutt e cols., 1992). Sob condições experimentais, rins têm sido preservados por 3 dias de estocagem a frio e 5 dias perfundido continuamente, fígado por 2 dias de estocagem fria e 3 dias perfundido continuamente, e pâncreas por 3 dias de estocagem fria (Nutt e cols., 1992).

Rins de cães podiam sobreviver por 24 horas de estocagem a 10°C se eles fossem perfundidos a 30-40 mmHg com soro ou plasma diluídos(Pegg e Green, 1972). Vários perfusatos e soluções estocadas no gelo têm sido testadas. A técnica de Collins de estocagem no gelo tem ganho grande aceitação entre os Centros de Transplantes, porque fornece uma única via de estoque e transporte de rins e outros órgãos. Contudo, a estocagem fria com soluções usadas atualmente, frequentemente leva ao atraso da função do enxerto renal e taxas aumentadas de diálise pós-transplante(Ploeg e cols., 1988).

Três princípios têm que ser considerados para a efetiva estocagem no gelo. Primeiro, a lavagem vascular durante a coleta deve rapidamente esfriar os órgãos, remover o sangue, e permitir o equilíbrio entre a solução estocada no gelo e o tecido. Segundo, a solução estocada no gelo deve prevenir o edema celular por inclusão de substâncias que são osmoticamente ativas e impermeáveis à célula. Terceiro, a solução estocada no gelo deve prevenir o excesso de acidose celular por conter uma concentração suficiente de íons de hidrogênio tamponantes (Ploeg e cols., 1988).

A preservação extracorpórea é baseada fundamentalmente no resfriamento, que diminui a atividade metabólica. A preservação normotérmica, embora teoricamente atrativa, apresenta problemas técnicos maiores e a preservação de função por mais que poucas horas não tem sido possível. O metabolismo ainda continua durante a estocagem hipotérmica, mesmo a 0°C. O resfriamento sozinho sem um suprimento contínuo de metabólitos, é então capaz somente para minimizar (melhor do que prevenir) a perda lenta de função com o tempo. A heterogeneidade do metabolismo das diferentes células renais e tecidos - glomerular, tubular, mesangial, vascular, urotelial - e os efeitos variáveis do frio na taxa dos processos metabólicos individuais, torna isso talvez surpreendente que a preservação por técnicas relativamente simples tem sido bem sucedido (Marshall, 1984).

O consumo de oxigênio e de outras funções metabólicas diminuem a uma taxa exponencial com a queda da temperatura. Infelizmente o frio, como a isquemia, também inibe os sistemas enzimáticos controladores da bomba de sódio da membrana celular. A inatividade da bomba durante a estocagem hipotérmica, resulta em edema celular danoso e o edema com ingresso de água, sódio e cloro e perda de potássio e magnésio. As membranas também tornam-se mais rígidas pelo frio. O controle desses efeitos prejudiciais na membrana devido ao frio foi essencial para o progresso na preservação. Devido ao fato das fontes de energia celular serem

conservadas pelo frio, os efeitos do frio na bomba de sódio são mais prontamente reversíveis do que a isquemia(Marshall, 1984).

Os rins são inicialmente lavados com solução fria livre de sangue pela artéria renal, enquanto o rim é imerso em líquido frio. Depois disso, os rins são preservados em um de três modos: (a)Estocagem fria continuada por imersão no gelo a 0°C para reduzir o metabolismo; (b)Perfusão contínua a 5-10°C para fornecer metabolismo diminuído e para remover os produtos finais; (c)Estocagem fria continuada por imersão no gelo para suprimir maximamente o metabolismo com apoio adjuvante parcial da respiração por perfusão do órgão com oxigênio(Marshall, 1984; Jacobsen e cols., 1990).

Na estocagem no gelo depois de uma perfusão inicial, a temperatura preferida parece ser a mais baixa obtida sem congelamento, e lavagem e estocagem a 0°C foi consideravelmente mais efetiva no rato do que em altas temperaturas de 5 ou 10°C. A preservação de rins de ratos e cães foi mais efetiva a 0-5°C do que a 5-10°C(Marshall, 1984). A preservação de órgãos a temperaturas abaixo de zero, certamente precisará da introdução de agentes protetores para uma perfusão vascular uniforme, mas tentativas para preservar rins de mamíferos não têm tido sucesso. Muitos problemas têm surgido, a toxicidade dos agentes protetores, a dificuldade da captação satisfatória do agente protetor pelas células, a presença de dano vascular depois do esfriamento e muitos outros problemas(Pegg e Farrant, 1969).

As primeiras soluções de lavagem continham dextran ou plasma ou eram balanceadas com soluções eletrolíticas que simulavam o fluido extracelular. Tais soluções foram inefetivas para a preservação por 24 horas. Foi observado uma perda de potássio intracelular e magnésio dos rins lavados com solução salina, com um aumento de água e sódio. Estes efeitos foram diminuídos pela adição de potássio e magnésio na solução. No seu princípio fundamental, de acordo com Marshall,

Collins em 1979 desenvolveu uma solução mimetizando a composição intracelular, e pela primeira vez conseguiu 24 horas de preservação segura, subseqüentemente estendeu para 30, 48 e 72 horas por várias modificações(Marshall, 1984).

Ploeg e cols. em 1988 desenvolveram uma nova solução estocada no gelo para a preservação de pâncreas na Universidade de Wisconsin. Esta solução(UW) continha dois impermeantes, o ácido lactobiônico e a rafinose sacáride, para suprimir o edema celular induzido hipotermicamente. Eles examinaram como a solução UW efetivamente preservou os rins de cães comparados com duas outras soluções estocadas no gelo. As outras soluções usadas foram a EuroCollins(EC), que é a preferida por muitos Centros de Transplantes, e a solução de sucrose tamponada com fosfato(PBS), que tem sido relatada preservar rins melhor do que a solução EC depois de 24 a 48 horas de estocagem no gelo. A Solução da Universidade de Wisconsin preservou com sucesso o pâncreas de cães por 72 horas(Ploeg e cols., 1988). Os solutos impermeantes são essenciais e a solução deve ser hipertônica. Existem vários relatos que altos níveis de potássio ou magnésio são desnecessários para a preservação de fluxo e de hipertonidade(Jacobsen e cols., 1990).

A perfusão contínua ainda fornece a mais efetiva preservação por um tempo maior, especialmente em rins prejudicados pela isquemia quente. A preservação com sucesso por mais de 3 dias tem sido somente alcançada pela perfusão, mas a extensão segura da preservação para 6 ou 7 dias tem mostrado muita dificuldade. A perfusão contínua resiste a um metabolismo oxidativo diminuído, remove os produtos finais e restabelece os substratos(Marshall, 1984).

O rim pode utilizar uma ampla variedade de substratos. A 37°C, ácidos graxos livres, glicose, piruvato, aminoácidos e corpos cetônicos podem todos ser consumidos. A adição de aminoácidos aos perfusatos melhora consideravelmente a função do rim de rato perfundido normotermicamente, particularmente a função tubular. Um coquetel de aminoácidos incluindo o glutamato, asparagina e cisteína

maximiza o progresso alcançado pela solução. Os aminoácidos não têm ainda sido mostrados eficientes na preservação-perfusão hipotérmica(Marshall, 1984).

A perfusão é consideravelmente mais efetiva do que uma estocagem hipotérmica simples na manutenção dos nucleotídeos de adenina e no restabelecimento dos níveis depletados. Esta capacidade é cada vez mais aparente quando a estocagem excede 24 horas. Depois de 3 dias de estocagem hipotérmica simples, virtualmente todos os ATP têm sido quebrados, e somente cerca de 20% do total de nucleotídeos de adenina permanecem. Os níveis de ATP e do total de nucleotídeos podem ser restabelecidos para 50-80% do normal pela perfusão(Marshall, 1984).

A perfusão tem a vantagem de lavar continuamente o lactato e os íons hidrogênio. A acidose intracelular correlaciona com preservação pobre e a perfusão é mais efetiva na manutenção do pH intracelular. Os agentes oncóticos são essenciais para prevenir o colapso vascular e o edema celular. A albumina tem provado ser o melhor agente e tem provado ser superior consistentemente aos dextrans, gelatina, amido, goma arábica e outros agentes(Marshall, 1984).

O perfusato ideal tem sido considerado aquele que mimetiza a composição do fluido extracelular e osmolaridade, com substratos de glicose, ácidos graxos ligados a albumina e oxigênio. Contudo, a inibição hipotérmica da bomba da membrana persiste durante a perfusão. Esta inibição limita a perfusão prolongada. O trabalho inicial com preservação-perfusão mostrou um benefício da adição do potássio e magnésio(Marshall, 1984).

Os primeiros perfusatos foram constituídos para mimetizar o sangue e por este motivo tinham uma concentração de sódio de 140 mM e uma concentração de potássio de 4 mM. Hemácias foram excluídas do sistema de perfusão, porque uma alta capacidade de oxigênio seria desnecessária em níveis de temperatura baixos, usados na preservação de órgãos(Pegg e Farrant, 1969). Aqueles primeiros

perfusatos foram chamados de extracelulares. Collins, impressionado com um trabalho de Keeler, formulou uma solução com 115 mM de potássio, 10 mM de sódio, e 30 mM de magnésio. A concentração desses cátions mimetizou aquela no fluido intracelular, e dessa maneira tais soluções foram chamadas de intracelulares. Essas concentrações tinham a intenção de prevenir a perda de potássio das células renais hipóxicas hipotérmicas. Outros cátions de importância para as células são o cálcio e o magnésio. Na normotermia, uma bomba dependente de ATP remove o cálcio das células. O excesso de cálcio intracelular altera a enzima xantina desidrogenase, e causa produção excessiva de ânion superóxido, um radical livre que prejudica as membranas celulares e as membranas mitocondriais. A concentração apropriada de cálcio e magnésio para o uso na preservação hipotérmica não é conhecida.

O uso de temperaturas muito baixas do que aquelas usadas na preservação convencional permite que medula óssea, sangue, córnea, ilhotas de Langerhans, válvula cardíaca, espermatozoides e embriões humanos possam ser preservados viáveis por anos. As temperaturas necessárias estão bem abaixo do ponto de congelamento da água, tal que a formação de gelo usualmente ocorre. A técnica de criopreservação resulta na formação de gelo. Ainda que o gelo seja usualmente letal, a criopreservação modifica a formação de gelo até que as células sobrevivam. A criopreservação envolve o uso de uma crioproteção antes do congelamento. Um crioprotetor típico é o dimetilsulfóxido. Para evitar o congelamento a temperaturas muito baixas, Fahy em 1986, começou a estudar a vitrificação que previne a formação de cristais de gelo. A vantagem da vitrificação é que o volume celular não altera. O volume celular é mantido por rápido congelamento e pelo uso de concentrações de crioprotetores excepcionalmente altos. Não somente um rápido congelamento é necessário, mas também um rápido aquecimento é necessário para prevenir a formação de cristais. Tal que a vitrificação é muito mais complexa do que a

criopreservação e os resultados não são melhores do que a criopreservação (Jacobsen e cols., 1990)

2-PERFUSÃO RENAL

A perfusão de órgãos tem sido um instrumento da pesquisa fisiológica por mais de um século(Belzer e cols., 1968). As primeiras tentativas de perfusão de rim isolado de cães são antigas, pois elas foram realizadas por Lobell em 1849, Bidder em 1862, Ludwig e cols. em 1868, Bunge e Schmiedeberg em 1876, Hoffman em 1877 e Schroder em 1882. Jacobj em 1890 realizou uma técnica mais aperfeiçoada utilizando um sangue desfibrinado e um sistema de bomba oxigenadora(Cuypers e cols., 1964).

Em 1903, Cuypers, Pfaff e Vejn-Tyrode fizeram igualmente perfusões de rins isolados com sangue desfibrinado e um sistema de bomba oxigenadora. Eles conseguiram a atenção sobre a redução do débito sanguíneo e atribuíram a ação tóxica e vasoconstrictora do sangue desfibrinado. Este fato já tinha sido descrito em 1903 por Stevens e Lee. Brodie. Bainbridge e Evans em 1914 obtiveram um débito sanguíneo melhor, contudo com uma diurese fraca num sistema de perfusão tríplice compreendendo o coração, pulmões e rins. Starling e Verney em 1925, usando a mesma preparação anterior obtiveram melhores resultados, utilizando sangue desfibrinado fresco(Cuypers e cols., 1964).

Parece que o sangue desfibrinado torna-se detoxificado na preparação coração-pulmão, presumivelmente nos pulmões. Bickford e Winton em 1937, e Kramer e Winton em 1939 utilizaram um sistema bomba-pulmão para neutralizar as propriedades vasoconstrictoras do sangue desfibrinado na perfusão de rins isolados. Brull e Louis-Bar em 1957 mostraram que o sangue heparinizado conservava como o sangue desfibrinado, mas com uma ação vasoconstrictora

impedindo a perfusão dos rins isolados com um sistema bomba oxigenadora. Estes fatores vasoconstrictores são rapidamente neutralizados pelos pulmões e pelo fígado. Eles podem igualmente ser neutralizado pelos rins(Cuypers e cols., 1964).

Rins isolados foram perfundidos com vários sistemas artificiais de bomba oxigenadora, no rato, no coelho, gato, e cão. Similarmente, reduções progressivas grandes ou subnormais no ritmo de filtração glomerular e nas funções tubulares foram encontradas em todos estes estudos(Waugh e Kubo, 1969).

Foram descritas preservações de tecidos humanos e animais por estocagem hipotérmica. Pesquisadores neste campo, contudo, têm experimentado dificuldades com o aumento da pressão, do edema tissular e do ganho de peso, com fluxo diminuído e com prejuízo ou não da função na reimplantação do órgão(Belzer e cols., 1968).

Um método de perfusão extracorpórea de rins de cães, usando plasma filtrado, uma bomba pulsátil e uma membrana oxigenadora já foi descrita com sucesso. A única característica desse método era o alto fluxo, sem um aumento na pressão de perfusão e a ausência de edema tissular. A escolha de um fluxo pulsátil em vez de um fluxo não pulsátil foi baseada nos estudos de vários estudiosos que em geral revelaram um significativo aumento na pressão de perfusão e na resistência vascular em resposta ao fluxo não pulsátil(Belzer e cols., 1968). O plasma foi evitado porque tem sido relatado que a alta resistência vascular pode estar associada com ele(Pegg e Farrant, 1969).

A crescente aceitação de rins de cadáveres como os doadores adequados de órgãos nos programas terapêuticos de homotransplante tem resultado considerável em pesquisa de métodos de estocagem extracorpórea temporária. A hipotermia, a oxigenação hiperbárica e as técnicas de perfusão têm sido empregadas na tentativa de prolongar o tempo de sobrevivência isquêmica do órgão isolado com variável sucesso

no animal em experimentação. O procedimento experimental relatado com mais sucesso foi a hipotermia combinada com perfusão contínua(Kane e Edwards, 1966).

A perfusão hipotérmica contínua tem alcançado grande sucesso como um meio adequado de preservação renal para transplante clínico, embora o sine qua non da realização é ainda a função definitiva do órgão no receptor(Benjamin e Sell, 1971).

Embora a hipotermia sozinha produza um aumento mínimo no volume celular, a combinação de hipóxia e hipotermia produzem maior e mais significativa edema celular. O edema celular e o aumento no peso do órgão de mais de 5% depois do período de perfusão é indicativa de destruição tecidual e resulta em morte celular(Belzer e cols., 1968).

Esforços têm sido feitos nos últimos 70 anos para desenvolver uma técnica para manutenção de uma função normal no rim perfundido de mamífero. Os primeiros experimentos de Bainbridge e Evans, Verney e Starling foram realizados na preparação coração-pulmão-rim. Subseqüentemente, bombas oxigenadoras foram substituídas pelo coração-pulmão de mamíferos no sistema de perfusão para permitir o estudo do metabolismo do rim, não influenciado pela presença de outros órgãos. Outra característica do rim perfundido é sua responsividade a drogas e hormônios, conhecida afetar a função renal no animal intacto(Rosenfeld e cols., 1959).

Um problema importante encontrado por pesquisadores foi uma vasoconstrição progressiva que rapidamente reduziu o fluxo sanguíneo renal e o RFG para valores marcadamente anormais. Esta vasoconstrição podia ser reduzida pela inclusão de uma preparação coração-pulmão ou unicamente o pulmão no circuito de perfusão. Uma maior objeção para os trabalhos prévios tem sido uma incapacidade de obter uma função renal normal no rim perfundido com coração-pulmão artificial e sangue total(Rosenfeld e Seller, 1960). Presumivelmente, os

órgãos adicionais foram capazes de detoxificar certas substâncias vasoconstrictoras não identificadas que tinham formado durante a perfusão(Berkowitz e cols., 1968).

É bem estabelecido que a vasoconstrição constitui um mecanismo adaptativo principal nos estados hipovolêmicos e hipotensivos. Foi demonstrado que pacientes com choque hipovolêmico mostraram evidência de depressão do RFG e do fluxo plasmático renal efetivo(Kane e Edwards, 1966).

Foi sugerido que a vasoconstrição renal não é um mecanismo adaptativo benéfico e pode resultar em prejuízo no rim intacto. O possível efeito deletério da vasoconstrição no doador renal em potencial pode ser um fator crítico na determinação do sucesso do transplante. Um declínio gradual no fluxo sanguíneo renal associado com edema do rim isolado é uma complicação bem estabelecida da perfusão isolada e que a vasoconstrição ocorrida em resposta ao choque transitório e persistindo após a restauração do volume circulante normal e após a remoção do rim contribuiu para tal fato(Kane e Edwards, 1966). A vasodilatação terminal parece estar relacionada tanto com a remoção dos fatores vasoconstrictores como com a ativação de substâncias tipo bradicinina.

A auto-regulação do fluxo renal sanguíneo é normal durante a primeira hora; mais tarde desaparece progressivamente, enquanto o fluxo sanguíneo aumenta por causa do tônus vascular prejudicado ou depleção dos substratos metabólicos(Nizet, 1975).

Foi demonstrado que os clearances renais caem dentro da faixa normal, quando o rim isolado de coelho é perfundido com sangue e que o rim sob estas condições responde a renina, pitressina e papaverina como in vivo. Tem sido aceito que o fenômeno da autoregulação do fluxo sanguíneo é uma propriedade única do rim(Rosenfeld e Sellers, 1960).

O estudo experimental da função renal e do metabolismo requer a dissociação dos mecanismos de controle extra-renais e intra-renais. Tal dissociação pode ser

alcançada pela supressão das mensagens transmitidas para os rins pelas vias humoral, hormonal, hemodinâmica ou nervosa por meio do isolamento progressivo desses órgãos(Nizet, 1975; Rosenfeld, 1965). A possibilidade de análise das funções renais sob condições bem definidas e sem a intervenção de fatores sistêmicos tem levado pesquisadores a usar o rim isolado e perfundido de rato para estudar vários aspectos do transporte e do metabolismo renais. Contudo, algumas das preparações isoladas foram instáveis, tiveram um RFG baixo e um alto grau de diurese e natriurese. As causas dessas deficiências funcionais foram relatadas consistir principalmente em uma reabsorção tubular proximal de fluidos e sódio diminuídas e uma pressão proximal intratubular muito alta(Mello e Maack, 1976).

Foi relatado o desenvolvimento de uma melhor preparação de rim de rato perfundido e isolado que tinha um RFG estável e um alto grau de conservação de sódio. Além disso, foram encontradas que as funções que dependem primariamente da integridade do túbulo proximal, tal como o transporte de glicose, proteínas de baixo peso molecular e aminoácidos, foram bem mantidos nessa preparação isolada. Contudo, as deficiências funcionais persistiram por causa do RFG ainda que estável, foi ainda abaixo do normal(Mello e Maack, 1976).

Desenvolvimentos recentes em preservação de órgãos e transplante têm renovado o interesse pelas preparações de rim isolado como uma alternativa para o estudo de técnicas que promovam a viabilidade de órgãos a longo termo(Berkowitz e cols., 1968). Embora não tenha-se êxito na preservação da função normal do órgão isolado por um período superior a 3 horas, mostrou-se que dentro deste período, a perfusão podia, pelo menos, ser usada como um instrumento no estudo dos processos fisiológicos(Nizet e cols., 1967). O rim isolado tem também encontrado utilidade no estudo de problemas básicos em fisiologia renal e metabolismo. Apesar dos avanços significantes neste campo, certas limitações ainda existem na função dos rins isolados(Berkowitz e cols., 1968).

Coelhos foram usados nestes experimentos, porque foi reconhecido que os rins de coelhos têm pobre tolerância à isquemia. Por conseguinte, a perda de função em rins estocados ou perfundidos decorre com rapidez (Malinin e Hollerman, 1972). Os experimentos de perfusão de órgãos têm sido usados extensivamente em pesquisa biológica e pode encontrar experimentos na literatura que têm envolvido a perfusão de órgãos tais como o cérebro, fígado, rins, pulmões, baço, mesentério, músculo esquelético e pâncreas. Em adição, essas técnicas têm sido usadas em numerosas espécies incluindo o rato, coelhos, cobaia, gato e cão (Bomzon e Naidu, 1985).

O rim de coelho foi escolhido, porque seu tamanho se aproxima do ovário humano, mas tem a vantagem de possuir um pedículo simples com uma única artéria e veia, de tal modo que o problema do vazamento das artérias colaterais que contribui para o fluxo é removido (Richardson e Ulfelder, 1960). Esses experimentos de perfusão de órgãos têm sido usados para investigar e avaliar uma vasta série de tópicos biológicos que incluem a atividade biológica, secreção hormonal, reatividade vascular e farmacocinética (Bomzon e Naidu, 1985).

Os rins representam um importante papel no metabolismo de drogas, funcionando nas reações de oxidação e conjugação, além disso no metabolismo dos compostos conjugados formados em outros tecidos, e na excreção de drogas e metabólitos de drogas (Jones e cols., 1979). Os problemas de perfusão renal normotérmica têm sido resolvidos de dois modos principais. A primeira solução tem sido fornecida pelo uso de um fluido artificial de perfusão livre de células, tais como as soluções salinas tamponadas e suplementadas com albumina ou substitutos de plasma macromolecular. Esta técnica é relativamente simples e melhor satisfaz para os rins de animais pequenos. Contudo, por causa da baixa viscosidade do fluido de perfusão e a ausência de hemácias, são observados fluxos de perfusato muito altos (Nizet, 1975). As preparações de rim isolado de rato são afetadas

marcadamente com relação ao volume urinário pela concentração de albumina no perfusato(Little e Cohen, 1974).

A segunda solução principal, que é próxima às condições fisiológicas, é fornecida pelo uso de sangue total como líquido perfusor. Uma maior dificuldade é a vasoconstrição que ocorre quase imediatamente após o início da perfusão com sangue desfibrinado ou com sangue heparinizado. O sangue extravasado exhibe propriedades vasoconstrictoras detectáveis após ter sido estocado por 5 minutos a 37°C; sangue estocado por 40 minutos bloqueia a circulação quase que totalmente(Nizet, 1975).

3-GLUTATION

O glutation, gamaglutamilcisteinilglicina, foi primeiramente detectado em 1888, e sua estrutura aprovada para síntese em 1935. Ele é um importante agente oxidante que integra numa concentração muito alta o tecido renal, sendo conhecido há mais de um século e é provavelmente o mais abundante composto tiólico de baixo peso molecular encontrado em animais, onde geralmente se localiza no espaço intracelular em quantidades relativamente altas, podendo atingir até 10 mM(Meister, 1981).

O GSH ocorre em células animais e também em muitas plantas e bactérias. O GSH tem um papel na inativação de um número de drogas e no processo metabólico de certos compostos endógenos, tais como, estrógenos, prostaglandinas e leucotrienos. É também uma coenzima para várias enzimas (Meister, 1983). O intestino é o órgão responsável pela digestão e absorção de nutrientes, mas também funciona como um sítio para detoxificação de carcinógenos e xenobióticos ingeridos. O intestino pode prevenir injúria a ele mesmo e ao corpo, sendo altamente seletivo em todos os tipos de compostos absorvidos, então agindo como uma barreira contra toxinas ingeridas(Lash e cols., 1986; Meister, 1991). O órgão primário para o clearance do GSH circulante é o rim que tem sido estimado o turnover do GSH plasmático em torno de 50-67%(Lash e Jones, 1984).

O glutation(GSH) é um dos mais importantes anticarcinogênicos e antioxidantes em células de mamíferos. Ele serve para a detoxificação de diversos prócarcinogênicos, toxinas químicas, e radicais livres. Sob uma variedade de condições, as concentrações celulares de GSH podem ser diminuídas e resultam em detoxificação prejudicada e injúria celular(Hagen e cols., 1990). Vários estudos têm

demonstrado que o GSH intracelular é da maior importância na proteção celular contra dano celular por compostos tóxicos, compostos reativos do oxigênio e radiação. Por esta razão, tem existido interesse nos fatores que influenciam a síntese intracelular de GSH e especialmente um modo de aumentar os níveis celulares deste tripeptídeo(Puri e Meister, 1983).

O GSH está presente em muitas fontes de alimentos como um suplemento nutricional. Estudos anteriores mostraram que o GSH pode substituir a cisteína na manutenção do balanço nitrogenado e que os bordos em escova do intestino delgado contêm a enzima que degrada o GSH. Outros estudos mostram que o GSH pode também ser absorvido do lúmen do intestino delgado como um tripeptídeo intacto. Medidas de captação do glutathione em diferentes regiões mostraram que o transporte ocorreu predominantemente no jejuno. Então, o GSH parece estar presente no lúmen sob condições fisiológicas e está aumentado quando o GSH está disponível na dieta. Isto indica que o GSH está disponível para os processos de detoxificação no lúmen do intestino delgado e também fornece uma fonte potencial de GSH para as células epiteliais. A liberação de GSH para o lúmen intestinal é estimulada com a resposta do ato da mastigação(Hagen e cols., 1990).

As células endoteliais têm sido mostradas serem um alvo primordial para a injúria oxidante. A injúria oxidante às células e tecidos é induzida por metabólitos reativos do oxigênio, tais como o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio, e o radical hidróxido. A extensão da injúria oxidante envolve alterações químicas nas proteínas, lipídios, carboidratos, e ácidos nucleicos. Como um substrato para a glutathione peroxidase, o GSH fornece reduções equivalentes para o metabolismo do peróxido de hidrogênio e os hidroperóxidos de lipídios(Chang e cols.,1992; Vreugdenhil e cols., 1990; Brezis e cols., 1983). Nas células endoteliais, o sistema do glutathione é acreditado ser importante em fornecer proteção contra o início dos eventos peroxidativos(Mak e cols., 1992).

A proteção contra o stress oxidante endógeno como o exógeno é proporcionado por vários sistemas enzimáticos, incluindo a catalase, a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase. O glutathione e a glutathione peroxidase inativam potencialmente os radicais livres e os metabólitos do oxigênio derivados das reações oxidativas e do metabolismo (Messana e cols., 1988). A deficiência do GSH afeta a síntese dos dois maiores polímeros celulares, isto é, as proteínas e o DNA. A oxidação ou a depleção do GSH pode diminuir a biossíntese das proteínas (Uhlir e Wendel, 1992).

O stress oxidante exógeno produz injúria letal celular por prejuízo direto da integridade da membrana plasmática com desajuste secundário das funções metabólicas celulares críticas (Messana e cols., 1988). O glutathione é um grande tiol não-protéico que participa como um cofator essencial em várias reações enzimáticas, na redução de peróxidos, na detoxificação de substâncias eletrofílicas, e como uma reserva importante de cisteína. O tripeptídeo é sintetizado no citoplasma de todas as células de mamíferos através da ação sequencial de 2 enzimas específicas dependentes de ATP. Em contraste, o turnover do glutathione ocorre através de um processo interórgãos envolvendo a liberação por vários tecidos, via transporte plasmático, e o catabolismo que ocorre primariamente dentro do rim (Rankin e cols., 1985).

É agora bem estabelecido que o rim representa um papel importante no metabolismo do glutathione plasmático. Estudos mostraram que o metabolismo renal do GSH extracelular muito provavelmente envolve uma série de reações catalizadas pela glutathione oxidase, gamma-glutamyltransferase e a cisteinylglycine dipeptidase. Todas estas enzimas têm sido encontradas nas membranas plasmáticas das células tubulares epiteliais. Estudos anteriores têm revelado que a gamma-glutamyltransferase renal está localizada exclusivamente no bordo em escova do epitélio tubular e

A proteção contra o stress oxidante endógeno como o exógeno é proporcionado por vários sistemas enzimáticos, incluindo a catalase, a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase. O glutathione e a glutathione peroxidase inativam potencialmente os radicais livres e os metabólitos do oxigênio derivados das reações oxidativas e do metabolismo (Messana e cols., 1988). A deficiência do GSH afeta a síntese dos dois maiores polímeros celulares, isto é, as proteínas e o DNA. A oxidação ou a depleção do GSH pode diminuir a biossíntese das proteínas (Uhlir e Wendel, 1992).

O stress oxidante exógeno produz injúria letal celular por prejuízo direto da integridade da membrana plasmática com desajuste secundário das funções metabólicas celulares críticas (Messana e cols., 1988). O glutathione é um grande tiol não-protéico que participa como um cofator essencial em várias reações enzimáticas, na redução de peróxidos, na detoxificação de substâncias eletrofílicas, e como uma reserva importante de cisteína. O tripeptídeo é sintetizado no citoplasma de todas as células de mamíferos através da ação sequencial de 2 enzimas específicas dependentes de ATP. Em contraste, o turnover do glutathione ocorre através de um processo interórgãos envolvendo a liberação por vários tecidos, via transporte plasmático, e o catabolismo que ocorre primariamente dentro do rim (Rankin e cols., 1985).

É agora bem estabelecido que o rim representa um papel importante no metabolismo do glutathione plasmático. Estudos mostraram que o metabolismo renal do GSH extracelular muito provavelmente envolve uma série de reações catalizadas pela glutathione oxidase, gamma-glutamyltransferase e a cisteinylglycine dipeptidase. Todas estas enzimas têm sido encontradas nas membranas plasmáticas das células tubulares epiteliais. Estudos anteriores têm revelado que a gamma-glutamyltransferase renal está localizada exclusivamente no bordo em escova do epitélio tubular e

presumivelmente está restringida sua ação nos substratos extracelulares daqueles presentes no fluido tubular(Ormstad e Orrenius, 1980).

Vários metabólitos do oxigênio molecular têm sido mostrado participar na patofisiologia das doenças. Eventos bioquímicos implicados na geração desses compostos oxidantes incluem a transferência aberrante de elétrons durante a fosforilação oxidativa mitocondrial, metabolismo oxidativo dos compostos de purina endógena, detoxificação oxidativa de drogas exógenas, como também a produção de vários metabólitos do oxigênio por células inflamatórias(Messana e cols., 1988).

O glutathion é um tripeptídeo com uma vasta distribuição biológica. O GSH tem várias funções protetoras e metabólicas para o controle da homeostase celular. A fim de prevenir a injúria mediada por moléculas oxidantes e eletrofílicas, vários métodos têm sido propostos para aumentar ou manter os níveis celulares de GSH durante o insulto toxicológico. Estes incluem a administração de GSH, cisteína, metionina, N-acetilcisteína, cisteamina, os precursores da cisteína e vários ésteres do GSH. Um fator chave determinante na taxa de biossíntese de GSH é a oferta de L-cisteína, como as células são usualmente bem supridas com glicina e glutamato, os outros componentes de aminoácidos do GSH. Os níveis intracelulares de cisteína podem ser influenciados pela captação de gamaglutamilmcisteína, ou alternativamente vários tipos celulares acumulam cisteína pré-formada e cistina usando sistemas de transporte de aminoácidos(Butterworth e cols., 1993).

O papel do glutathion no transporte de aminoácidos e nas reações de detoxificação de drogas no rim tem sido detalhado em vários relatos. As células tubulares renais proximais são quase inteiramente dependentes da fosforilação oxidativa para a produção de energia e também possuem uma alta taxa metabólica para suportar múltiplos processos de transporte ativo. A aberrante transferência de elétrons nestas células pode produzir quantidades significantes de reações do

oxigênio. De fato, a disfunção mitocondrial característica de certos estados patológicos podem aumentar o transporte aberrante de elétrons e resultar em aumento do estresse oxidante das células. O túbulo proximal é o sítio de reações detoxificantes para numerosas drogas e compostos endógenos. A infiltração do interstício renal por células inflamatórias, que têm a capacidade de gerar metabólitos tóxicos do oxigênio, aumenta o potencial de prejuízo oxidativo. Os estoques celulares de GSH mais comumente representam um papel central na proteção do epitélio celular proximal renal contra a injúria oxidante exógena por limitante deterioração funcional da membrana plasmática induzida pela oxidação. A suplementação com GSH exógeno ou com aminoácidos constituintes resultam no retorno do GSH celular tubular para os níveis fisiológicos(Messana e cols.,1988).

O glutathione representa um papel vital em um número de reações celulares. O turnover do GSH é mais rápido no rim do que em outro órgão com uma meia-vida de somente 30 minutos. Tem sido sugerido por vários pesquisadores que o GSH tem um papel especial na manutenção da função renal e na estrutura no rim de rato isolado e perfundido. A sensibilidade especial da função concentrante do rim perfundido à depleção de GSH é de particular interesse desde que isto sugere a possibilidade do envolvimento do GSH em certas desordens clínicas da capacidade dos rins em concentrar urina(Brezis e cols., 1982).

A estocagem fria de órgãos para transplantes produz uma injúria celular que aumenta com o tempo de estocagem. Muitos mecanismos têm sido propostos para explicar a injúria de órgãos induzida pela hipotermia, incluindo a injúria da reperfusão causada por radicais livres derivados do oxigênio(ânions superóxidos). As células normais contêm muitos mecanismos de defesa para reduzir a toxicidade dos radicais livres; contudo, não é conhecido como a estocagem de órgãos afeta a capacidade das células em suprimir a injúria celular induzida pelos radicais livres. Estudos prévios têm mostrado que o glutathione é depletado de células expostas à

isquemia quente, e as células depletadas de glutathione são mais sensíveis para uma perda da viabilidade sobre a reoxigenação. O mecanismo de injúria causado pela depleção de glutathione tem sido relatado às reações mediadas por radicais livres na célula, e à adição de agentes que melhorem as concentrações de glutathione nas células suprime a injúria causada pelos radicais livres(Vreugdenhil e cols., 1990).

A estocagem no frio afeta a concentração do glutathione no fígado, coração e rins. O glutathione é mais rapidamente depletado no fígado do que no rim ou coração, mas por 3 dias de preservação, todos os órgãos mostram uma diminuição de 50 a 70% no glutathione. A perda do glutathione nos órgãos estocados no frio pode ser um mecanismo que explica a perda tempo-dependente da viabilidade do órgão ou da função retardada do enxerto. Métodos de elevar a concentração do glutathione de órgãos estocados pode ser importante na obtenção de uma excelente qualidade e uma preservação a longo prazo(Vreugdenhil e cols., 1990).

O glutathione(GSH) tem sido reconhecido em muitos anos como um importante composto na economia da célula hepática. Sua função como um cofator para certas enzimas é bem estabelecido. Foi demonstrada sua importância na manutenção da integridade da membrana celular. Um papel para o glutathione no transporte e absorção de aminoácidos no rim e no intestino delgado foi sugerido por Binkley em 1951. Resultados de estudos no metabolismo do GSH em que a função do ciclo do gamaglutamyl foi estudado in vivo são consistentes com a idéia de que o ciclo serve como um dos sistemas que media a translocação de aminoácidos através das membranas celulares. De acordo com esta hipótese, os aminoácidos são translocados através da membrana celular com os gamaglutamyl aminoácidos, que são formados pela ação da gamaglutamyltranspeptidase ligada a membrana.O GSH é predominantemente intracelular, enquanto uma fração maior da gamaglutamyltranspeptidase celular está na superfície externa das membranas celulares. A translocação do GSH ocorre através das membranas celulares do rim e

de outros órgãos(Griffith, 1979). Em 1970, Orlowski e Meister apresentaram um modelo para transporte de aminoácido baseado no glutation e nas enzimas envolvidas no seu metabolismo(Leibach e cols., 1974).

A perfusão renal tem ganho significado clínico como um meio de preservar rins para transplante. A técnica de preservação de mais sucesso tem sido a perfusão hipotérmica, mas a preservação por mais de 3 dias tem sido rara. A perfusão hipotérmica leva a uma redução significativa no nível de GSH e este fato indicaria que consideração deve ser dada ao papel do GSH no rim isolado. A adição do GSH ao perfusato, aliviaria a depleção do glutation durante a perfusão, e isso pode representar um simples e econômico meio de aumentar o efeito da preservação renal, tanto à normotermia quanto à hipotermia(Leibach e cols., 1974). O conteúdo de GSH dos rins perfundidos diminui quando o perfusato contém aminoácidos(Meister e Anderson, 1983).

4-OBJETIVOS

O nosso projeto de tese de Mestrado usando o rim de coelho perfundido como um modelo para estudo de preservação funcional e bioquímica por circulação extracorpórea, visando a busca de melhores perfusatos com vistas ao transplante renal teve os seguintes objetivos:

- 1-O estudo fisiofarmacológico do rim perfundido e isolado de coelho com uma solução de Krebs-Henseleit associada com a adição de 4g% de albumina bovina.
- 2-Avaliação dos efeitos do glutathione(GSH) nas concentrações de 2, 4 e 6 mM na solução de Krebs-Henseleit associada com a adição de 4g% de albumina bovina.
- 3-Estudo fisiofarmacológico do rim perfundido e isolado de coelho com uma solução de composição intracelular rica em potássio e magnésio, conhecida como Solução A associada com a adição de 4g% de albumina bovina.
- 4-Avaliação dos efeitos do glutathione(GSH) na concentração de 4 mM adicionado à Solução A associada com a adição de 4g% de albumina bovina.

MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Coelhos Califórnia, do sexo masculino, provenientes da cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, pesando em média 1 Kg, eram mantidos em gaiolas, com ingestão livre de água e ração padronizada para coelhos. Nas 24 horas que antecederiam o experimento, os animais eram mantidos em jejum alimentar, com ingestão de água ad libitum.

GRUPOS DE ANIMAIS

Foram usados um total de 35 coelhos os quais foram divididos nos seguintes grupos:

Grupo controle: Os animais deste grupo foram perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit mais 4g% de albumina bovina. Este grupo foi constituído por seis animais(n=6).

Grupo Glutation 2 mM: Os animais deste grupo foram perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit mais 4g% de albumina bovina e foi adicionado à esta solução 2 mM de glutacion(GSH). Este grupo foi constituído por seis animais(n=6).

Grupo Glutation 4 mM: Os animais deste grupo foram perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit mais 4g% de albumina bovina e foi adicionado à esta solução 4 mM de glutacion(GSH). Este grupo foi constituído por seis animais(n=6).

Grupo Glutation 6 mM: Os animais deste grupo foram perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit mais 4g% de albumina bovina e foi adicionado à esta solução 6 mM de glutacion(GSH). Este grupo foi constituído por seis animais(n=6).

Grupo Solução A: Os animais deste grupo foram perfundidos com Solução A mais 4g% de albumina bovina. Este grupo foi constituído por cinco animais(n=5).

Grupo Solução A + Glutation 4 mM: Os animais deste grupo foram perfundidos com Solução A mais 4g% de albumina bovina e foi adicionado à esta solução 4 mM de glutacion(GSH). Este grupo foi constituído por seis animais(n=6).

PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais eram anestesiados com uretana(1200 mg/kg) por via intraperitoneal e após trinta minutos com pentobarbital sódico(40 mg/kg), por via intramuscular. Após o animal encontrar-se anestesiado, era administrado através da veia marginal da orelha do animal uma solução de manitol a 20% contendo 400 mg e posteriormente procedia-se uma incisão mediana, cerca de um centímetro abaixo do apêndice xifóide até à região hipogástrica, rebatendo-se lateralmente as vísceras abdominais, de modo a permitir a exposição do rim esquerdo, da aorta abdominal e de suas ramificações. As vísceras abdominais e o rim eram recobertos com compressas de gaze umedecidas em solução salina aquecida a 37°C. O ureter esquerdo era imediatamente canulado com um tubo de polietileno(PE50) e a aorta abdominal dissecada até próximo da bexiga, realizando-se a ligadura dos vasos colaterais anteriores e posteriores. Concluída a dissecação da aorta, a glândula supra-renal esquerda era cuidadosamente isolada, e o seu pedúnculo vascular retirado, sendo a glândula então removida.

Ligava-se em seguida a artéria mesentérica, procedendo-se então a ligadura e retirada do rim contralateral, que era imediatamente pesado. A seguir o coto proximal da artéria renal direita era amarrado próximo à aorta. Após todas as estruturas estarem completamente suturadas e isoladas era administrado através da veia marginal da orelha 400 mg de manitol a 20% + 1000 UI de heparina

sódica e somente então, através de uma cânula metálica que era introduzida na aorta iniciava-se a perfusão renal in situ, com ligadura simultânea da aorta acima da artéria renal.

Esta manobra permitia o início da perfusão com isquemia zero, já que não havia interrupção do fluxo. Antes da remoção do órgão para perfusão, fazia-se uma inspeção cuidadosa nos principais vasos com o objetivo de se verificar se todas as suturas estavam adequadas. A veia renal era seccionada e simultaneamente clampeada abaixo do ponto de secção. Isolada a preparação, era feita uma lavagem rápida com solução salina aquecida a 37°C e a imediata transferência para o circuito de perfusão. Maiores detalhes deste procedimento estão apresentados em Moraes(1984).

SISTEMA DE PERFUSÃO

Utilizamos um sistema de perfusão fechado, semelhante ao que foi descrito por Moraes(1984), composto por:

a)Uma bomba Flexflo(modelo Nº A-1860-V), previamente calibrada para fluxo de 20-200 ml/minuto, com medida simultânea da resistência na ponta da cânula;

b)Linha de perfusão do tipo teflon previamente esterilizada;

c)Filtro milipore de 8 um acoplado à linha de perfusão, permitindo a calibragem do fluxo e da pressão;

d)Pulmão constituído por tubos do tipo silástico(Dow Corning), onde uma mistura de 95 e 5% de O₂-CO₂ flui na velocidade de 2 litros/minuto, permitindo uma oxigenação superior a 400 mmHg;

e)Fluxômetro para medida do fluxo de perfusão a cada minuto;

f)Condensador de Allyn para aquecimento contínuo do perfusato;

g)Um catabolha ligado à linha de perfusão, proximal à emergência da cânula arterial;

h)Um monitor de pressão conectado à cânula de perfusão;

i)Um reservatório de vidro, em espiral, capaz de reaquecer a solução após a sua oxigenação, cuja temperatura é estabilizada a 37°C;

j)Uma bomba aquecedora com termostato;

O sistema de perfusão está representado em diagrama a seguir na figura

1.

SISTEMA DE PERFUSÃO

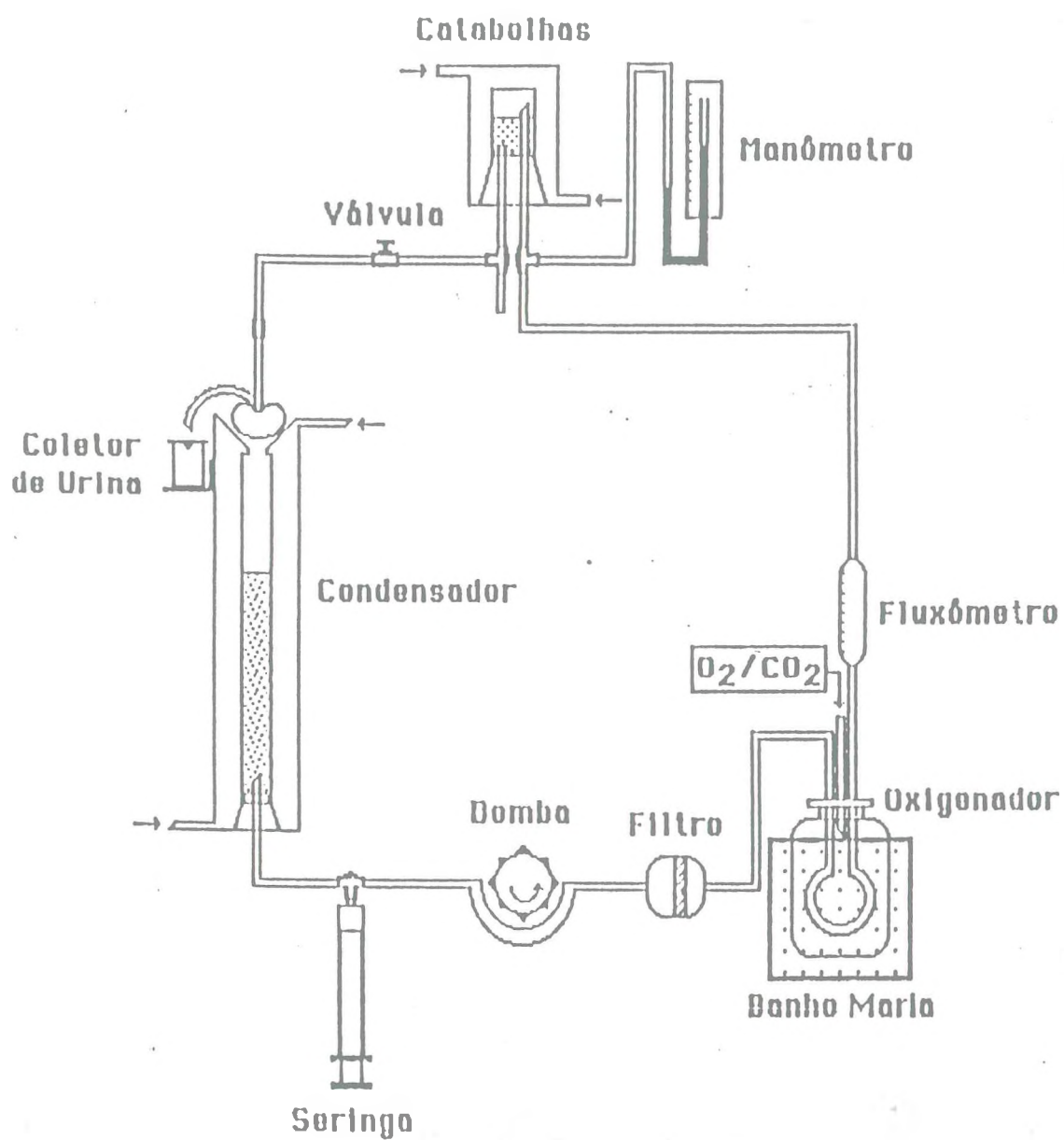


Figura 1 - Sistema de perfusão.

SOLUÇÃO DE PERFUSÃO

Uma solução de Krebs-Henseleit contendo 4 gramas(g) de albumina bovina/100 ml foi utilizada para perfusão. A solução de Krebs-Henseleit era preparada a partir de um concentrado salino(20 vezes), sendo diluída a cada experimento, obtendo-se a seguinte concentração final em mM/l: $\text{Na}^+=147$; $\text{K}^+=5,0$; $\text{Ca}^{++}=2,5$; $\text{Mg}^{++}=1,0$; $\text{Cl}^-=110$; $\text{HCO}_3^{-1}=25$; $\text{SO}_4^{-2}=1,0$; $\text{PO}_4^{-3}=2,0$. Tal composição é similar à encontrada no plasma do coelho(PEG e FARRANT, 1969).

Procedia-se então a diluição da albumina bovina na concentração de 4g/100 ml, sendo após esta etapa distribuída em alíquotas em membranas de celofane(Dialysis Sacks 250-7 U, Sigma, St.Louis-USA). A solução era então dialisada por 48 horas(h) à 4°C em recipiente contendo 20 vezes o volume de solução de Krebs-Henseleit mantido em agitação magnética permanentemente. A solução de diálise era trocada após 24 horas. Antes do início do experimento, o perfusato era filtrado em membrana milipore de 0,8 μm , o pH era ajustado com solução de ácido clorídrico 0,1N para 7,2 a 7,4, adicionando-se em seguida inulina na concentração de 0,5 mg/ml em todos os grupos experimentais e glutathion(GSH) nos seus respectivos grupos de tratamento nas seguintes concentrações de 2, 4 e 6 mM.

Uma solução de perfusão conhecida como Solução A contendo 4 gramas de albumina bovina/100 ml foi também utilizada. A Solução A era preparada com a seguinte composição, em mmol/l: NaCl, 96,2; KCl, 40,3; CaCl_2 , 1,7; MgSO_4 , 12,5; NaHCO_3 , 11,9; e glicose, 111.

O perfusato usado contém concentrações relativamente altas de cátions intracelulares como o potássio e o magnésio, e também concentrações relativamente baixas de cátions extracelulares, no caso o sódio.

Procedia-se da mesma forma anterior a diluição da albumina sendo posteriormente distribuída em alíquotas em membranas de celofane. A solução era também dialisada por 48 horas à uma temperatura de 4°C em recipiente mantido permanentemente em agitação magnética. A solução de diálise era trocada após 24 horas. Antes do início do experimento, o perfusato era filtrado em membrana milipore de 0,8 μm , o pH era ajustado com solução de ácido clorídrico 0,1 N para 7,2-7,4, adicionando-se em seguida inulina e no grupo do glutation era adicionado 4 mM de GSH.

PROTOCOLO DE PERFUSÃO

Transferida a preparação para o sistema de perfusão, observava-se um período de equilíbrio de quinze minutos, conhecidos os valores da pré-calibração do fluxo e resistência, os quais eram mantidos constantes. Após os cinco minutos iniciais, colhia-se a primeira amostra de filtrado urinário, em recipiente com peso previamente calibrado, determinando-se imediatamente o peso da amostra em balança de precisão. No tempo zero era coletado uma amostra de perfusato e após os dez minutos iniciais era colhida a segunda amostra de perfusato, registrando-se na ocasião as leituras de fluxo e pressão. A intervalos de dez minutos repetia-se estes procedimentos até completar noventa minutos de observação. Imediatamente após a colheita, as amostras eram congeladas a -20°C. A colheita do perfusato era feita no período intermediário de cada duas coletas de urina.

PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

Foram estudados os seguintes parâmetros fisiológicos durante a perfusão renal:

1)Peso do Rim: o peso do rim contralateral(direito) era determinado imediatamente após a nefrectomia, sendo utilizado para as determinações de fluxo de perfusato e de resistência vascular, bem como medidas de sódio(Na⁺), potássio(K⁺) e água intracelulares. Ao final da perfusão, também era determinado o peso do rim perfundido para realização dessas mesmas medidas.

2)Fluxo de Perfusato(FP): registrado a cada dez minutos, com coleta de amostras de perfusato. O resultado é expresso em ml/g/min, correspondendo ao valor medido, dividido pelo intervalo de tempo e pelo peso do rim. $FP = \text{volume(ml)}/\text{tempo(min)}/\text{peso do rim(g)}$.

3)Resistência Vascular(RV): calculava-se pela divisão da média da pressão de perfusão(mmHg) pelo fluxo de perfusato(ml/g/min). $RV = PP(\text{mmHg})/FP(\text{ml/g/min})$

4)Pressão de Perfusão(PP): refere-se à pressão de todo o leito vascular renal, sendo registrada a intervalos de dez minutos. A PP é medida em manômetro e expressa em mmHg, descontada a resistência na ponta da cânula perfusora.

5) Fluxo Urinário(FU): é calculado pela divisão do volume de urina coletada pelo intervalo de tempo(10 minutos) e pelo peso do rim. É expresso em ml/g/min.

6) Ritmo de Filtração Glomerular(RFG): expresso através do clearance de inulina em ml/g/min.

7) Sódio Filtrado(FNa⁺): é obtido pelo produto do RFG e da concentração de sódio no perfusato(PNa⁺). $FNa^+ = RFG \times PNa^+$, (uEq/g/min).

8) Sódio Excretado(ENa⁺): é o produto do fluxo urinário(FU) pela concentração de sódio na urina(UNa⁺). $ENa^+ = FU \times UNa^+$, (uEq/g/min).

9) Sódio Transportado(TNa⁺): é obtido da diferença entre o sódio filtrado(FNa⁺) e o sódio excretado(ENa⁺). $TNa^+ = FNa^+ - ENa^+$, (uEq/g/min).

10) Percentual de Sódio Transportado(%TNa⁺): é dado pela divisão do produto sódio transportado(TNa⁺) x 100 pelo sódio filtrado(FNa⁺). $\%TNa^+ = (TNa^+ \times 100)/(Fna^+)$.

11) Potássio Filtrado(FK⁺): é o produto do ritmo de filtração glomerular(RFG) pela concentração de potássio no perfusato (PK⁺). $FK^+ = RFG \times PK^+$, (uEq/g/min).

12) Potássio Excretado(EK⁺): é o produto do fluxo urinário(FU) pela concentração de potássio na urina. $EK^+ = FU \times UK^+$, (uEq/g/min).

13)Potássio Transportado(TK⁺): resulta da diferença entre o potássio filtrado(FK⁺) e o potássio excretado(EK⁺). $TK^+ = FK^+ - EK^+$, (uEq/g/min).

14)Percentual de Potássio Transportado(%TK⁺): resulta da divisão do produto potássio transportado(TK⁺) x 100 pelo potássio filtrado(FK⁺). $\%TK^+ = (TK^+ \times 100 / FK^+)$.

15)Clearance Osmolar(COsm): resulta do produto da relação osmolaridade urinária(UOsm)/osmolaridade do perfusato(POsm) pelo fluxo urinário(FU). $COsm = UOsm \times FU$, (ml/g/min).

16)Clearance de Água Livre(CH₂O): é dado pela diferença entre o fluxo urinário(FU) e o clearance osmolar(COsm). $CH_2O = FU - COsm$, (ml/g/min).

17)Transporte Distal de Sódio(dTNa⁺): é resultante do produto do clearance de água livre(CH₂O) pela concentração de sódio no perfusato(PNa⁺). $dTNa^+ = CH_2O \times PNa^+$, (uEq/g/min).

18)Aporte Distal de Sódio(AD): resulta da soma do transporte distal de sódio(dTNa⁺) com o sódio excretado(ENa⁺). $AD = dTNa^+ + ENa^+$,(uEq/g/min).

19)Percentual de Transporte Distal de Sódio(%dTNa⁺): resulta da divisão do produto transporte distal de sódio(dTNa⁺) x 100 pelo aporte distal de sódio(AD). $\%dTNa^+ = (dTNa^+ \times 100) / (AD)$.

20) Transporte Proximal de Sódio(pTNa⁺): representado pela diferença entre o sódio filtrado(FNa⁺) e o aporte distal de sódio(AD). $pTNa^+ = FNa^+ - AD$, (uEq/g/min).

21) Percentual de Transporte Proximal de Sódio(%pTNa⁺): é resultante da divisão do produto transporte proximal de sódio(pTNa⁺) x 100 pelo sódio filtrado. $(\%pTNa^+) = (pTNa^+ \times 100)/(FNa^+)$.

22) Glutation Filtrado(FGSH): é obtido pelo produto do RFG e da concentração de GSH no perfusato(PGSH). $FGSH = RFG \times PGSH$, (ug/g/min).

23) Glutation Excretado(EGSH): é o produto do fluxo urinário(FU) pela concentração de glutatión na urina(UGSH). $EGSH = FU \times UGSH$, (ug/g/min).

24) Glutation Transportado(TGSH): é obtido da diferença entre o glutatión filtrado(FGSH) e o glutatión excretado(EGSH). $TGSH = FGSH - EGSH$, (ug/g/min).

25) Percentual de Glutation transportado(%TGSH): é dado pela divisão do produto glutatión transportado(TGSH) x 100 pelo glutatión filtrado(FGSH). $\%TGSH = (TGSH \times 100)/(FGSH)$.

26) Clearance de Glutation: é calculado a partir da relação entre a concentração de glutatión na urina pela concentração de glutatión no perfusato multiplicado pelo fluxo urinário. $CGSH = (UGSH/PGSH) \times (FU)$, (ml/g/min).

27) Clearance de Glutation/Clearance de inulina: é calculado a partir da relação entre o clearance de glutatión e o clearance de inulina.

Também foram analisados os seguintes parâmetros:

Determinação da água tissular renal: Avaliada para ambos os rins em cada experimento, o rim direito é pesado após a nefrectomia e o rim esquerdo após a perfusão. Em seguida, os rins são colocados em vasilhames de platina, sendo dessecados em estufa a vácuo de 250 mmHg, durante 48 horas a 90°C, para determinação do peso seco. A diferença dos pesos seco e úmido permite a estimativa da água renal.

Composição tecidual de sódio e potássio: Depois de desidratados os rins são colocados em incinerador a 550°C e durante doze horas são mineralizados. Ao final desse período, 0,2 ml de HNO₃ são colocados sobre as cinzas, adicionando-se 1 ml de H₂O. A seguir a mistura é aquecida a 100°C por 2-3 minutos. Concluído esse processo, os conteúdos dos caldeirões são diluídos para um volume de 10 ml e a sua concentração de sódio e potássio determinadas por fotometria de chama.

ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As determinações de sódio(Na^+) e potássio(K^+) foram realizadas no perfusato e na urina por fotometria de chama, utilizando-se Lítio como padrão interno (Instrumentation Laboratory - modelo 343).

Na determinação de inulina no perfusato e na urina utilizou-se a forma alcalino-estável desse composto, e de acordo com o método de WALSER, DAVIDSON e ORLOFF(1955), modificado por GRUNOV(1980). Na metodologia deste estudo eliminou-se inteiramente a fase de desproteinização e embora os reagentes sejam os mesmos, a fase de aquecimento no clássico banho-maria é substituída por blocos metálicos. Pode-se assim pipetar diretamente na solução alcalina em que foi colocada a amostra a analisar, a solução de HCL, ácido acético e difenilamina, sendo a mistura previamente aquecida a 100°C , seguindo-se o resfriamento a $4-6^{\circ}\text{C}$. Tais modificações permitem a utilização de volumes até 10 vezes menores do material a analisar, bem como um menor tempo operacional. A osmolaridade das amostras de perfusato e de urina foi medida em osmômetro (Advanced Instruments Inc.). Para determinar os níveis de glutathione no perfusato e na urina foi usado o método de Tietze e cols.(1969). Era usado 2 ml da amostra de perfusato e urina e diluído em 8 ml de solução de tampão fosfato (0,3 M de Na_2HPO_4) e 1 ml de ácido 5'5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) preparada a 0,04% em tampão de citrato de sódio a 1%. A leitura era feita em 412 nm, em Espectrofotômetro do tipo Beckman DB ou UNICAN e as concentrações de GSH foram determinadas de uma curva padrão.

SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

Sais utilizados no preparo da solução de Krebs-Henseleit:

NaCl, KCl, KH_2PO_4 , $\text{SO}_4\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_7$, Uréia, $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})$, NaHCO_3 ,

Glicose - MERCK.

Penicilina G potássica - FONTOURA WYETH

Sais utilizados no preparo da Solução A:

NaCl, KCl, cloreto de cálcio dihidratado, sulfato de magnésio heptahidratado, bicarbonato de sódio e glicose.

Albumina bovina, fração V - SIGMA, rica em ácidos graxos

Substâncias adicionadas à solução de perfusão:

glutathione reduzido(GSH), inulina - SIGMA

penicilina G potássica - FONTOURA WYETH

Anestésicos:

uretano - MERCK

pentobarbital sódico - CLIN-MIDY

Anticoagulantes:

heparina - ROCHE

Removedor de radicais livres:

manitol - MERCK

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos a análise em computador Macintosh com o programa Statview. Os seguintes cálculos foram efetuados: média, desvio padrão, erro padrão da média, teste t não-pareado e ANOVA com nível de confiança de 95%.

O procedimento inicial objetivou a pesquisa de flutuações de parâmetros nas diversas populações de grupos experimentais. Procedeu-se também à confecção de tabelas e gráficos para análises comparativas de diversas variáveis.

RESULTADOS

PERFUSÃO RENAL COM SOLUÇÃO DE KREBS-HENSELEIT CONTENDO 4g% DE ALBUMINA BOVINA

Os primeiros resultados desta série de experimentos estão apresentados nas tabelas 1A e 1B. Vários parâmetros funcionais estão ali sumarizados.

Seis animais foram utilizados neste grupo, intitulado como grupo controle. Os rins destes animais eram perfundidos durante 90 minutos com Solução de Krebs-Henseleit contendo 4g% de albumina bovina, previamente dialisada.

A análise da tabela 1A revela que o fluxo de perfusato tende a crescer do tempo inicial até o final da experiência, aumentando em cerca de 25% ao final do último período. O oposto ocorreu em relação à resistência vascular, que diminuiu cerca de 20% ao final do último período.

Com relação ao fluxo urinário houve um aumento progressivo durante os primeiros 40 minutos e posteriormente uma queda também progressiva, mas o último valor não sendo inferior ao valor registrado nos primeiros 10 minutos de perfusão renal.

No tocante ao clearance de inulina houve um aumento progressivo nos primeiros 40 minutos e posteriormente diminuindo até a um valor inferior ao registrado nos primeiros 10 minutos. A reabsorção do sódio em termos absolutos cresceu até os 60 minutos iniciais e a reabsorção fracionária de sódio permaneceu aproximadamente estável, com ligeira tendência ao crescimento somente após 30 minutos do início da perfusão, mas declinando 40 minutos depois. A reabsorção de potássio em termos absolutos foi crescendo até os primeiros 40 minutos, decrescendo a partir deste momento até a um valor inferior

ao inicial. No que diz respeito a reabsorção fracionária de potássio, verifica-se uma tendência ao crescimento nos primeiros 40 minutos e posterior declinação até a um valor inferior ao inicial.

A análise dos resultados do clearance de água livre demonstra um aumento progressivo à medida que o tempo de perfusão continua e o clearance osmolar aumenta inicialmente até os primeiros 40 minutos para depois declinar até a um valor inferior ao registrado inicialmente. O aporte distal mostra um crescimento progressivo até os primeiros 40 minutos, quando a partir daí começa a cair, mas o valor registrado aos 90 minutos não é inferior ao conseguido aos 10 minutos de perfusão renal. A análise segmentar da fração reabsorvida de sódio mostrou uma tendência a estabilização do transporte proximal, havendo somente um decréscimo nos últimos 20 minutos e um aumento importante na fração distal durante os 90 minutos de perfusão chegando a triplicar no final da perfusão.

TABELA 1A - DINÂMICA DE PERFUSÃO DE RINS PERFUNDIDOS COM SOLUÇÃO DE KREBS-HENSELEIT CONTENDO 4G% DE ALBUMINA BOVINA.

TP	FP	R	FU	CIN	TNa+	%TNa+	TK+	%TK+
10	21,17±2,33	6,26±1,13	0,211±0,02	0,58±0,16	54,20±22,37	62,35±5,02	0,86±0,89	10,89±12,70
20	22,90±2,49	5,85±1,08	0,240±0,05	0,69±0,25	68,01±32,29	65,07±4,26	1,49±1,13	25,32±11,07
30	23,57±2,70	5,75±1,10	0,294±0,07	0,78±0,30	74,08±38,41	63,06±6,10	1,52±1,30	20,60±11,28
40	23,90±2,73	5,83±1,18	0,331±0,08	0,88±0,27	83,90±34,83	66,33±6,23	1,73±1,14	30,33± 9,03
50	24,72±2,95	5,56±1,26	0,307±0,07	0,84±0,28	83,91±38,84	66,55±6,15	1,67±1,29	26,46±11,09
60	24,86±3,00	5,45±1,30	0,299±0,07	0,84±0,29	85,36±40,02	65,96±4,90	1,63±1,25	22,97±11,78
70	25,61±3,08	5,39±1,31	0,265±0,06	0,78±0,27	81,46±37,50	67,15±5,18	1,44±1,10	24,37±10,77
80	26,21±3,37	5,15±1,28	0,248±0,07	0,69±0,22	70,33±32,72	65,33±5,96	1,10±0,93	18,93±12,13
90	26,64±3,48	5,27±1,31	0,227±0,06	0,53±0,14	51,68±20,85	60,96±6,29	0,58±0,59	7,15±14,29

(a) Os resultados são expressos em média ± e.p.m.

(b) Seis animais foram utilizados neste grupo.

(c) TP: Tempo(min); FP: Fluxo de Perfusato(ml/g/min); R: Resistência(mmHg/ml/g/min); FU: Fluxo Urinário(ml/g/min); CIN: Clearance de Inulina(ml/g/min); TNa+: Transporte de Sódio(uEq/g/min) e TK+: Transporte de Potássio(uEq/g/min).

TABELA 1B - AVALIAÇÃO FUNCIONAL DISTAL E SEGMENTAR DE RINS PERFUNDIDOS COM SOLUÇÃO DE KREBS-HENSELEIT CONTENDO 4G% DE ALBUMINA BOVINA.

TP	CH ₂ O	COSM	AD	PPTNa ⁺	PDTNa ⁺
10	0,013±0,004	0,20±0,02	25,34± 2,03	59,50±5,44	6,70±1,59
20	0,014±0,003	0,23±0,05	28,05± 4,88	62,11±4,53	7,61±1,65
30	0,023±0,004	0,27±0,07	35,39± 8,24	58,76±6,15	10,67±2,43
40	0,054±0,009	0,28±0,07	43,66±10,57	58,58±7,04	18,80±2,72
50	0,055±0,020	0,25±0,06	41,23±10,79	58,35±8,57	17,34±2,76
60	0,055±0,016	0,24±0,05	41,68±10,30	58,27±6,21	17,86±1,96
70	0,041±0,010	0,22±0,05	36,02± 8,09	61,27±5,57	15,93±2,14
80	0,056±0,024	0,19±0,04	36,97±11,35	57,26±8,11	18,02±2,67
90	0,052±0,020	0,17±0,04	33,27± 9,32	51,35±8,32	19,46±2,55

(a) Os resultados são expressos em média ± e.p.m.

(b) Seis animais foram incluídos neste grupo.

(c) TP: Tempo(min); CH₂O: Clearance de Água Livre(ml/g/min); COSM: Clearance Osmolar(ml/g/min); AD: Aporte Distal(uEq/g/min); PPTNa⁺: Transporte de Sódio proximal(%); PDTNa⁺: Transporte de Sódio Distal(%)

PERFUSÃO RENAL COM SOLUÇÃO DE KREBS-HENSELEIT CONTENDO 4g% DE ALBUMINA BOVINA E 2 mM DE GLUTATION

Seis animais foram utilizados neste grupo, denominado grupo GSH2. Os rins destes animais foram perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit contendo 4g% de albumina bovina e 2 mM de GSH durante 90 minutos. Os resultados da análise fisiológica estão apresentados nas tabelas 2A, 2B e 2C.

O fluxo de perfusato renal mostrou-se estável durante toda a experiência, alcançando uma média de 21,91 ml/g/min. Esses valores não são diferentes estatisticamente dos valores observados no grupo controle. Quanto à resistência vascular renal houve uma tendência ao crescimento ao longo dos 90 minutos de perfusão, observando-se no último valor um aumento final de 15%, estando a média acima do grupo controle, mas também não sendo diferente estatisticamente.

O fluxo urinário demonstrou uma certa tendência ao aumento, pelo menos, durante os primeiros 60 minutos para em seguida declinar, mas nunca para um valor inferior ao registrado nos primeiros 10 minutos, sendo a média inferior ao do grupo controle. O clearance de inulina cresce progressivamente até os 80 minutos iniciais da perfusão, decrescendo somente nos últimos 10 minutos, sendo inferior a média do grupo controle, mas não há diferença estatística. A reabsorção de sódio mostrou uma certa tendência ao crescimento, sendo inferior a média do grupo controle, mas a reabsorção fracional de sódio manteve-se estável com uma média de 67,11%, mantendo-se na mesma média do grupo controle. A reabsorção

de potássio mostra uma certa tendência à secreção calêmica, entretanto não havendo diferença estatística em relação ao grupo controle.

Os resultados da avaliação da função distal e segmentar são descritos na tabela 2B. O clearance de água livre cresce progressivamente até os 50 minutos do início da perfusão para posteriormente começar a cair até a um valor não inferior ao inicial, sendo inferior ao do grupo controle nos 60 minutos finais de perfusão renal, mas não representando diferença estatística ($p=0,26$). O clearance osmolar apresentou uma tendência ao crescimento e somente após 60 minutos de perfusão é que insinuou um leve decréscimo que se manteve estável até o final da perfusão, sendo inferior ao grupo controle nos 70 minutos de perfusão. O aporte distal mostra uma tendência para a estabilidade, variando de $24,14 \pm 6,17$ a $29,69 \pm 6,18$ com uma média de $27,88$ uEq/g/min. A reabsorção proximal de sódio mostrou uma tendência ao decréscimo e a reabsorção distal mostrou uma tendência ao aumento.

Os resultados da avaliação funcional da concentração do glutathione são descritos na tabela 2C. A reabsorção absoluta do glutathione mostrou um salto importante durante o intervalo dos primeiros 20 minutos e posteriormente apresentou um aumento progressivo nos últimos 70 minutos e correspondendo a um aumento de cerca de quatro vezes até o final dos 90 minutos. Com relação a reabsorção fracionária de GSH, a tabela mostra que houve um aumento progressivo e importante durante todo o experimento, chegando o último valor a representar um aumento de cerca de 50% em relação ao valor inicialmente medido. O clearance de GSH manteve-se estável durante o período de perfusão com uma média de $0,12$ ml/g/min. Já a relação entre o clearance de GSH e o clearance de inulina diminuiu à medida que o tempo passava, chegando a um valor final representado por 50% do valor registrado nos primeiros 10 minutos de perfusão, o que demonstra uma certa utilização renal do tripeptídeo.

TABELA 2A - DINÂMICA DE PERFUSÃO DE RINS PERFUNDIDOS COM SOLUÇÃO DE KREBS-HENSELEIT CONTENDO 4G% DE ALBUMINA BOVINA E 2 mM DE GSH.

TP	FP	R	FU	CIN	TNa+	%TNa+	TK+	%TK+
10	22,21±2,31	5,78±0,55	0,182±0,05	0,47±0,12	45,41±12,47	67,89±3,96	0,60±0,49	12,52±14,04
20	21,87±2,79	6,00±0,83	0,195±0,05	0,52±0,13	51,28±12,79	70,94±3,85	0,68±0,46	18,18±10,91
30	21,82±2,61	6,28±0,95	0,218±0,05	0,53±0,11	51,31± 9,94	68,68±4,10	0,42±0,38	9,02±10,98
40	21,87±2,70	6,14±1,12	0,212±0,04	0,49±0,09	46,27± 9,44	65,31±5,57	0,21±0,36	-1,95±15,90
50	21,50±2,94	6,40±1,35	0,210±0,04	0,52±0,10	50,36±10,97	66,05±5,87	0,29±0,39	-1,02±16,37
60	22,42±3,03	6,10±1,29	0,211±0,04	0,57±0,12	57,57±13,39	68,07±5,45	0,46±0,49	2,72±17,76
70	21,83±2,98	6,38±1,41	0,196±0,04	0,57±0,18	59,72±20,24	67,67±5,37	0,58±0,69	-3,00±21,72
80	22,11±2,78	6,34±1,26	0,204±0,04	0,61±0,20	64,05±23,27	66,83±5,02	0,71±0,77	-1,16±22,69
90	21,56±2,87	6,52±1,29	0,197±0,04	0,52±0,15	51,23±16,96	62,54±4,91	0,51±0,57	-3,31±24,12

(a) Os resultados são expressos em média ± e.p.m.

(b) Seis animais foram utilizados neste grupo.

(c) TP: Tempo(min); FP: Fluxo de Perfusato(ml/g/min); R: Resistência(mmHg/ml/g/min); FU: Fluxo Urinário(ml/g/min) (ml/g/min); CIN: Clearance de Inulina(ml/g/min); TNa+: Transporte de Sódio(uEq/g/min) e TK+: Transporte de Potássio(uEq/g/min).

**TABELA 2B - AVALIAÇÃO FUNCIONAL DISTAL E SEGMENTAR DE RINS PER-
FUNDIDOS COM SOLUÇÃO DE KREBS-HENSELEIT CONTENDO
4G% DE ALBUMINA E 2 mM DE GSH.**

TP	CH ₂ O	COSM	AD	PPTNa ⁺	PDTNa ⁺
10	0,028±0,010	0,15±0,04	24,14±6,17	60,22±4,55	13,57±2,81
20	0,032±0,011	0,16±0,04	25,64±6,47	60,67±4,87	16,89±1,68
30	0,035±0,011	0,18±0,04	28,69±6,67	56,87±5,45	17,42±2,10
40	0,032±0,008	0,18±0,04	28,12±6,04	56,14±5,88	16,55±1,40
50	0,035±0,007	0,18±0,04	28,65±6,00	56,38±5,77	18,67±1,19
60	0,034±0,006	0,18±0,04	29,10±5,92	59,86±5,68	17,45±1,31
70	0,030±0,004	0,17±0,04	27,47±5,32	59,95±6,09	16,93±1,29
80	0,030±0,008	0,17±0,03	29,46±6,35	61,41±5,54	14,67±1,85
90	0,031±0,007	0,17±0,04	29,69±6,18	56,12±5,99	15,51±1,46

(a) Os resultados são expressos em média ± e.p.m.

(b) Seis animais foram incluídos neste grupo.

(c) TP: Tempo(min); CH₂O: Clearance de Água Livre (ml/g/min); COSM: Clearance Osmolar (ml/g/min); AD: Aporte Distal(μEq/g/min); PPTNa⁺: Transporte de Sódio Proximal(%); PDTNa⁺: Transporte de Sódio Distal(%).

TABELA 2C - AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTATION EM RINS PERFUNDIDOS COM SOLUÇÃO DE KREBS-HENSELEIT CONTENDO 4G% DE ALBUMINA BOVINA E 2 mM DE GSH.

TP	TGSH	%TGSH	CGSH	CGSH/CIN
10	4,49±3,02	42,25±23,21	0,12±0,06	0,58±0,24
20	12,76±8,00	69,60±17,41	0,11±0,02	0,41±0,07
30	14,08±9,53	62,66±18,05	0,14±0,02	0,42±0,15
40	14,94±5,72	74,15± 7,77	0,13±0,01	0,33±0,02
50	15,73±3,61	78,20± 3,71	0,12±0,01	0,28±0,02
60	17,68±0,82	80,79± 0,92	0,12±0,01	0,26±0,06
70	15,37±0,29	81,04± 2,17	0,11±0,00	0,30±0,09
80	17,90±2,25	82,91± 0,87	0,12±0,01	0,27±0,09
90	16,95±1,06	81,19± 1,61	0,12±0,01	0,29±0,08

(a) Os resultados são expressos em média ± e.p.m.

(b) Seis animais foram incluídos neste grupo.

(c) TP:Tempo(min); TGSH:Transporte de GSH (ug/g/min); CGSH:Clearance de GSH(ml/g/min); C_{GSH}/C_{IN}:Clearance de GSH/Clearance de Inulina.

PERFUSÃO RENAL COM SOLUÇÃO DE KREBS-HENSELEIT CONTENDO 4g% DE ALBUMINA BOVINA E 4 mM DE GLUTATION

Seis animais foram utilizados neste grupo, chamado grupo GSH4. Os rins destes animais foram perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit contendo 4g% de albumina bovina adicionada de 4 mM de GSH durante 90 minutos. Os resultados deste grupo estão apresentados na tabela 3A, 3B e 3C.

O fluxo de perfusão renal deste grupo demonstrou uma certa estabilidade, mantendo uma média de 20,27 ml/g/min, sendo esta média inferior à do grupo controle e à do grupo GSH2. A resistência vascular renal mostrou-se também estável alcançando um valor médio de 6,20 mmHg/ml/g/min, sendo superior à do grupo controle.

Ao analisar-se o fluxo urinário, evidenciou-se um aumento progressivo e importante ao longo dos 60 minutos iniciais, vindo a cair somente a partir deste momento, mas com um valor final 90% maior que o valor registrado inicialmente, estando a média inferior à do grupo controle e GSH2. Com relação ao clearance de inulina, verificou-se uma certa tendência a um progressivo aumento, sendo o maior valor registrado, representando duas vezes o valor registrado inicialmente, sendo inferior à média dos grupos controle e GSH2. O transporte absoluto de sódio mostra uma tendência para o crescimento com o decorrer da perfusão, inferior aos grupos controle e GSH2, enquanto o transporte fracionário de sódio mostra uma estabilidade durante toda a perfusão, não sendo diferente dos grupos controle e GSH2. A atividade do transporte absoluto de potássio mostra uma certa

tendência ao crescimento progressivo, já a reabsorção fracionária do potássio mostra novamente uma secreção calêmica, mas de importância maior do que naquele grupo perfundido com 2 mM de GSH e apresentando uma média inferior à do grupo controle, sendo estatisticamente diferente, quando comparado os tempos 20, 30 e 40 minutos da perfusão renal ($p = 0,038$).

Analisando o clearance de água livre, observou-se que inicialmente há um aumento progressivo e importante durante os primeiros 50 minutos de perfusão, para posteriormente decrescer até um valor que representa cerca de 7 vezes o valor registrado aos 10 minutos. Esse parâmetro é inferior e estatisticamente diferente daquele encontrado no grupo controle nos tempos 40, 60, 70, 80 e 90 da perfusão renal ($p = 0,039$). O clearance osmolar mostra um crescimento até os primeiros 60 minutos de perfusão, quando a partir daí começa a cair para um valor não inferior ao inicial, sendo inferior ao grupo controle. Com referência ao aporte distal, evidenciou-se um claro aumento durante os primeiros 30 minutos, para depois chegar à estabilidade. A reabsorção proximal do sódio mostrou uma certa tendência à estabilidade com uma média de 56,18%, não sendo diferente dos grupos controle e GSH2. Já a reabsorção distal começa com um valor negativo, crescendo até os 40 minutos da perfusão e a partir daí tentando se equilibrar. A reabsorção distal deste grupo mostra-se inferior ao dos grupos controle e GSH2 e estatisticamente diferente quando comparado os tempos 60, 80 e 90 minutos do grupo controle ($p = 0,0005$), enquanto com o grupo GSH2 nos tempos 10, 20, 60 e 70 minutos de perfusão renal ($p = 0,0005$).

Na reabsorção absoluta do GSH verificou-se um importante aumento progressivo no decorrer da perfusão, somente havendo uma pequena queda no último tempo, mesmo assim representando cerca de 4 vezes o valor registrado aos 10 minutos do experimento, sendo superior à média do grupo GSH2. O transporte fracionário de GSH mostra uma tendência para o equilíbrio com uma

média de 65,03%, não chegando a apresentar diferença com o grupo GSH2. O clearance de glutathion evidencia um crescimento até os 40 minutos, quando então passa a se manter em equilíbrio. A relação entre o clearance de GSH e o clearance de inulina mostrou uma tendência para o equilíbrio. Nenhum dos dois parâmetros mostra diferença quando comparado com o grupo GSH2.

TABELA 3A - DINÂMICA DE PERFUSÃO DE RINS PERFUNDIDOS COM SOLUÇÃO DE KREBS-HENSELEIT CONTENDO 4G% DE ALBUMINA BOVINA E 4 mM DE GSH

TP	FP	R	FU	CIN	TNa+	%TNa+	TK+	%TK+
10	20,69±1,47	6,12±0,54	0,082±0,02	0,21±0,05	17,75± 5,02	62,98±3,87	-0,02±0,09	-11,58±10,66
20	20,09±1,09	6,28±0,46	0,107±0,02	0,30±0,09	27,66±11,18	62,97±5,66	0,19±0,33	10,27±16,88
30	19,83±1,15	6,53±0,50	0,144±0,02	0,37±0,09	33,80±11,51	63,81±3,85	0,26±0,34	1,68±13,95
40	19,82±1,34	6,47±0,53	0,164±0,02	0,40±0,10	35,87±12,07	63,00±3,41	0,27±0,34	0,15±12,30
50	19,87±1,33	6,28±0,53	0,176±0,02	0,39±0,07	36,74± 8,64	61,39±3,02	0,14±0,20	0,67±10,21
60	20,30±1,35	6,02±0,45	0,182±0,02	0,36±0,06	29,27± 6,37	57,78±2,72	0,05±0,15	6,74±10,78
70	21,02±1,54	5,86±0,54	0,176±0,02	0,40±0,10	34,56±12,31	58,93±3,72	0,22±0,36	3,42±14,15
80	20,64±1,53	6,05±0,60	0,167±0,02	0,42±0,13	38,69±16,24	60,49±4,82	0,39±0,47	3,58±13,62
90	20,13±1,83	6,15±0,74	0,154±0,02	0,38±0,10	34,64±11,93	60,48±5,43	0,33±0,37	5,31±15,34

(a) Os resultados são expressos em média ± e.p.m.

(b) Seis animais foram utilizados neste grupo.

(c) TP:Tempo(min); FP:Fluxo de Perfusato(ml/g/min); R:Resistência(mmHg/ml/g/min); FU:Fluxo Urinário(ml/g/min); CIN:Clearance de Inulina(ml/g/min); TNa+:Transporte de Sódio(uEq/g/min) e TK+:Transporte de Potássio (uEq/g/min).

TABELA 3B - AVALIAÇÃO FUNCIONAL DISTAL E SEGMENTAR DE RINS
 PERFUNDIDOS COM SOLUÇÃO DE KREBS-HENSELEIT
 CONTENDO 4G% DE ALBUMINA BOVINA E 4 mM DE GSH.

TP	CH ₂ O	COSM	AD	PPTNa+	PDTNa+
10	0,003±0,003	0,08±0,017	10,07±2,42	63,50±4,28	- 2,37±7,57
20	0,011±0,004	0,10±0,013	14,04±2,23	58,83±6,42	9,54±3,09
30	0,021±0,006	0,13±0,014	18,48±2,46	57,88±5,23	13,33±3,41
40	0,025±0,006	0,14±0,017	21,36±3,05	56,24±4,55	14,84±2,49
50	0,027±0,007	0,15±0,016	23,30±3,49	54,39±4,39	14,59±2,49
60	0,015±0,008	0,17±0,026	22,48±2,73	52,64±4,81	8,87±4,23
70	0,021±0,005	0,16±0,019	23,38±3,55	53,29±4,82	11,44±2,08
80	0,018±0,004	0,15±0,020	22,35±3,38	55,18±6,10	10,88±1,63
90	0,020±0,007	0,13±0,018	21,39±2,94	53,66±8,20	12,07±3,34

(a) Os resultados são expressos em média ± e.p.m.

(b) Seis animais foram incluídos neste grupo.

(c) TP:Tempo(min); CH₂O:Clearance de Água Livre(ml/g/min); COSM:Clearance Osmolar(ml/g/min); AD:Aporte Distal (uEq/g/min); PPTNa+:Transporte de Sódio Proximal (%); PDTNa+:Transporte de Sódio Distal(%).

TABELA 3C - AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTATION EM RINS PERFUNDIDOS COM SOLUÇÃO DE KREBS-HENSE-LEIT CONTENDO 4G% DE ALBUMINA BOVINA E 4 mM DE GSH.

TP	TGSH	%TGSH	CGSH	CGSH/CIN
10	13,80± 8,25	61,57±16,24	0,05±0,007	0,38±0,16
20	16,21± 9,21	60,06±15,35	0,09±0,015	0,40±0,15
30	28,30±20,03	66,68±11,41	0,09±0,012	0,34±0,11
40	33,80±26,56	63,90±12,88	0,11±0,016	0,38±0,13
50	31,02±23,39	67,99± 8,41	0,10±0,014	0,33±0,08
60	35,07±28,69	62,76±12,53	0,11±0,023	0,39±0,12
70	53,08±46,40	65,09±10,96	0,11±0,019	0,37±0,11
80	53,55±47,05	68,18± 9,73	0,11±0,015	0,34±0,09
90	47,11±41,58	69,07±11,78	0,09±0,022	0,34±0,11

(a)Os resultados são expressos em média ± e.p.m.

(b)Seis animais foram incluídos neste grupo.

(c)TP:Tempo(min); TGSH:Transporte de GSH(ug/g/min);CGSH:Clearance de GSH(ml/g/min); CGSH/CIN:Clearance de GSH/Clearance de Inulina.

PERFUSÃO RENAL COM SOLUÇÃO DE KREBS-HENSELEIT CONTENDO 4g% DE ALBUMINA BOVINA E 6 mM DE GLUTATION

Os resultados deste grupo estão apresentados nas tabelas 4A, 4B e 4C.

Os rins dos coelhos utilizados neste grupo foram submetidos durante 90 minutos a uma perfusão com Solução de Krebs-Henseleit contendo 4g% de albumina bovina e uma concentração de glutacion maior em relação aos grupos GSH2 e GSH4, ou seja, 6 mM. Foram usados 6 animais.

Foi observado uma tendência à estabilidade do fluxo de perfusato neste grupo mantendo uma média de 16,23 ml/g/min. Este grupo apresentou menores valores de fluxo de perfusato, estatisticamente diferente em todos os tempos, quando comparado com o grupo controle ($p = 0,049$) e até aos 40 minutos iniciais quando comparado ao grupo GSH2 ($p = 0,049$). A resistência vascular também se mostrou estável em todos os tempos, mantendo uma média de 8,49 mmHg/ml/g/min. Até aos 30 minutos iniciais e no tempo 60 existe uma diferença estatística entre o grupo controle e este grupo. E existe uma diferença estatística entre este grupo e o grupo GSH2 nos primeiros 20 minutos.

O fluxo urinário mostra um crescimento progressivo até os 40 minutos iniciais, quando então passa a decrescer, chegando aos 90 minutos de perfusão com um valor cerca de 60% superior ao valor registrado no tempo 10. A taxa de filtração glomerular cresce com o decorrer da perfusão, estabilizando aos 50 minutos e a partir daí começando a decrescer, sendo a média inferior à do grupo controle. A comparação com concentrações mais baixas de GSH denota um claro decréscimo no ritmo de filtração glomerular, nesta concentração ($p = 0,63$). A

quantidade de sódio reabsorvida cresce também com o decorrer da perfusão, chegando a um valor máximo aos 50 minutos e decrescendo progressivamente a partir deste momento, chegando a um valor superior ao valor inicial, sendo a média inferior à do grupo controle. Já a fração de sódio reabsorvida manteve-se aproximadamente constante com uma média de 62,98%, não sendo diferente dos grupos controle, GSH2 e GSH4 ($p = 0,12$). A quantidade de potássio absorvida começa com um valor negativo, mostrando com o passar da experiência um aumento progressivo até o tempo 50 e somente neste momento principia a cair até voltar a ser negativo. A fração de potássio reabsorvida mostra uma secreção de potássio que diminui ao longo do tempo, evidenciando uma diferença estatística entre o grupo controle nos tempos 10, 20, e 40 minutos ($p = 0,038$).

O clearance de água livre cresce até aos 40 minutos e a partir daí demonstra uma certa tendência à estabilidade com o menor valor registrado representando cerca de mais de duas vezes o valor medido no tempo 10, sendo a média inferior e diferente estatisticamente do grupo controle quando comparado com os tempos 40, 60 e 80 minutos ($p = 0,0032$). Houve também um crescimento progressivo com o clearance osmolar até aos 40 minutos, quando então se mantém constante até aos 60 minutos e a partir daí começa a cair, sendo a média um pouco inferior à do grupo controle. Avaliando-se o aporte distal, observa-se nos primeiros 40 minutos um aumento progressivo para depois começar a cair e tender para a estabilização, não sendo diferente dos grupos controle, GSH2 e GSH4 ($p = 0,86$). A reabsorção fracionária de sódio proximal começa inicialmente a cair, mas depois mantém-se com uma tendência para a estabilização e nos 20 minutos finais volta a cair. Já a reabsorção fracionária de sódio distal começa a elevar nos 30 minutos iniciais para depois cair e se manter estável por 40 minutos e cair novamente mais um pouco somente nos 20 minutos finais. Esta queda nos

vinte minutos finais é significativamente diferente quando comparado com o grupo controle ($p=0,0001$).

Ao avaliar-se a reabsorção do glutathione evidencia-se um aumento progressivo até os primeiros 50 minutos de perfusão, quando a partir deste momento começa a cair, sendo o valor registrado aos 90 minutos cerca de mais de 3 vezes o valor registrado no tempo 10, sendo a média inferior à do grupo GSH4 e superior à do grupo GSH2, não sendo estatisticamente diferentes ($p = 0,92$). A reabsorção fracional do glutathione mostrou uma certa tendência para um aumento nos primeiros 40 minutos para então alcançar a estabilidade, não sendo diferente dos grupos GSH2 e GSH4 ($p = 0,91$).

O clearance de glutathione cresce até a primeira hora de perfusão, quando então se mantém constante até o final da experiência. A relação entre o clearance de glutathione e o clearance de inulina inicialmente diminui para depois mostrar uma certa tendência para a estabilidade. Estes dois últimos parâmetros não mostram diferença quando comparados com os grupos GSH2 e GSH4.

TABELA 4A - DINÂMICA DE PERFUSÃO DE RINS PERFUNDIDOS COM SOLUÇÃO DE KREBS-HENSELEIT CONTENDO 4G% DE ALBUMINA BOVINA E 6 mM DE GSH.

TP	FP	R	FU	CIN	TNa+	%TNa+	TK+	%TK+
10	15,40±1,63	8,99±1,27	0,131±0,05	0,31±0,11	27,23± 9,36	65,37±4,17	-0,07±0,18	24,99±13,87
20	15,84±1,57	8,47±1,09	0,172±0,06	0,41±0,11	35,65± 8,80	66,06±4,10	0,02±0,16	-11,40±12,03
30	16,41±1,81	8,19±1,09	0,207±0,08	0,47±0,13	40,57±10,53	63,76±5,16	0,07±0,21	-12,51±17,37
40	15,92±1,51	8,35±1,11	0,232±0,08	0,54±0,14	46,55±13,06	64,46±5,53	0,16±0,33	- 1,05± 9,31
50	15,99±1,75	8,35±1,45	0,223±0,07	0,56±0,19	53,80±21,60	64,60±4,66	0,47±0,60	- 9,54±18,09
60	16,12±2,13	8,68±1,72	0,222±0,07	0,53±0,15	46,64±15,52	62,90±4,76	0,13±0,44	2,73±15,15
70	16,54±2,20	8,45±1,58	0,213±0,06	0,50±0,14	43,15±12,78	63,18±4,05	0,08±0,32	- 0,76±11,79
80	17,24±2,22	7,99±1,60	0,205±0,05	0,44±0,09	35,19± 6,86	60,35±4,13	-0,08±0,20	-11,74±10,89
90	16,62±2,49	8,98±2,36	0,200±0,05	0,39±0,08	29,52± 6,35	56,14±4,06	-0,12±0,16	7,28±12,27

(a) Os resultados são expressos em média ± e.p.m.

(b) Seis animais foram utilizados neste grupo.

(c) TP:Tempo(min); FP:Fluxo de Perfusato(ml/g/min); R:Resistência(mmHg/ml/g/min); FU:Fluxo Urinário(ml/g/min); CIN:Clearance de Inulina(ml/g/min); TNa+:Transporte de Sódio(uEq/g/min) e TK+:Transporte de Potássio (uEq/g/min).

TABELA 4B - AVALIAÇÃO FUNCIONAL DISTAL E SEGMENTAR DE RINS PERFUNDIDOS COM SOLUÇÃO DE KREBS-HENSELEIT CONTENDO 4G% DE ALBUMINA BOVINA E 6 mM DE GSH.

TP	CH ₂ O	COSM	AD	PPTNa ⁺	PDTNa ⁺
10	0,008±0,005	0,12±0,05	16,47± 6,63	62,89±4,21	7,17±2,20
20	0,018±0,009	0,15±0,06	22,71± 8,91	61,88±4,36	11,25±2,38
30	0,027±0,010	0,18±0,07	28,23±10,86	57,98±5,74	14,17±2,15
40	0,029±0,010	0,20±0,07	31,60±11,41	59,17±5,91	13,56±2,43
50	0,022±0,005	0,20±0,07	26,91± 6,74	59,43±5,02	13,17±2,59
60	0,019±0,003	0,20±0,06	29,55± 8,51	58,05±4,82	11,92±2,56
70	0,027±0,010	0,19±0,05	30,74± 9,45	57,54±4,33	13,60±2,95
80	0,020±0,006	0,18±0,04	28,71± 7,47	55,58±4,38	11,02±2,33
90	0,023±0,007	0,18±0,04	28,14± 7,05	50,56±4,51	11,41±1,69

(a)Os resultados são expressos em média ± e.p.m.

(b)Seis animais foram incluídos neste grupo.

(c)TP:Tempo(min); CH₂O:Clearance de Água Livre(ml/g/min); COSM:Clearance Osmolar(ml/g/min); AD:Aporte Distal (uEq/g/min); PPTNa⁺: Transporte de Sódio Proximal(%); PDTNa⁺:Transporte de Sódio Proximal(%)

TABELA 4C - AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTATION
EM RINS PERFUNDIDOS COM SOLUÇÃO DE KREBS-HENSELEIT
CONTENDO 4G% DE ALBUMINA BOVINA E 6 mM DE GSH.

TP	TGSH	%TGSH	CGSH	CGSH/CIN
10	5,93± 1,85	62,11±8,80	0,06±0,03	0,38±0,09
20	14,04± 8,51	65,06±9,36	0,09±0,03	0,35±0,09
30	20,12±13,83	66,46±8,45	0,09±0,02	0,34±0,09
40	27,85±19,13	69,68±9,21	0,10±0,03	0,30±0,09
50	33,41±27,06	67,36±9,29	0,10±0,03	0,33±0,09
60	28,58±19,46	69,74±8,19	0,12±0,04	0,31±0,08
70	27,22±18,48	71,76±7,13	0,11±0,03	0,28±0,07
80	22,04±12,69	68,84±8,05	0,12±0,04	0,31±0,08
90	16,95±10,28	62,83±8,12	0,12±0,04	0,36±0,08

(a) Os resultados são expressos em média ± e.p.m.

(b) Seis animais foram incluídos neste grupo.

(c) TP: Tempo(min); TGSH: Transporte de GSH(ug/g/min); CGSH: Clearance de GSH(ml/g/min); CGSH/CIN: Clearance de GSH/Clearance de Inulina.

PERFUSÃO RENAL COM SOLUÇÃO A CONTENDO 4g% DE ALBUMINA BOVINA

Os resultados deste grupo estão apresentados nas tabelas 5A e 5B.

Foram incluídos 5 animais neste grupo. Os rins destes coelhos foram perfundidos durante 90 minutos com Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

Na avaliação da dinâmica de perfusão encontrou-se um fluxo plasmático que mantém uma tendência para o crescimento durante todo o experimento, chegando a um valor no tempo 90 cerca de 25% superior ao valor registrado no tempo 10. Existem diferenças significativas entre este grupo e o grupo GSH2 nos 70 minutos finais da perfusão e entre este grupo e o GSH4 quando analisado os 80 minutos finais ($p < 0,04$). Existe também diferença estatística quando comparado com o grupo GSH6 durante todo o período de perfusão ($p < 0,05$). No tocante da análise da resistência vascular encontrou-se uma diminuição progressiva durante todo o experimento, chegando a um valor final cerca de 30% menor que o valor inicial. Este parâmetro quando comparado com o grupo GSH6 mostra-se estatisticamente diferente durante todo o período de perfusão ($p < 0,05$).

O fluxo urinário cresce até os primeiros 20 minutos para depois começar a cair progressivamente até a um valor inferior ao registrado aos 10 minutos de perfusão. O mesmo ocorreu com o clearance de inulina, sendo a média destes 2 parâmetros, principalmente a do clearance de inulina inferior a do grupo controle. Existe uma diferença significativa comprovada com o teste de Fisher, quando comparado com o clearance de inulina do grupo controle nos tempos 40 e 60

minutos de perfusão. Com relação à reabsorção de sódio inicialmente há um ligeiro aumento para em seguida começar a decrescer e se manter estável por 40 minutos e voltar a cair para um valor final inferior ao medido nos primeiros 10 minutos de perfusão. Quando comparado com o grupo controle existe uma diferença estatística evidenciado pelo teste de Fisher nos tempos 40, 50, 60 e 70 minutos, sendo a média muito inferior à do grupo controle. Ao avaliar-se a reabsorção fracional de sódio observou-se inicialmente nos 30 minutos uma queda para então depois insinuar uma recuperação, mas o maior valor não chegando a ser superior a 41%. Este grupo é estatisticamente diferente dos grupos GSH0, GSH2 e GSH4 durante toda a perfusão ($p < 0,02$) e nos 80 minutos iniciais da perfusão quando comparado com o grupo GSH6 ($p < 0,02$), sendo a média inferior à dos grupos comparados. Na análise do potássio reabsorvido, notou-se uma certa tendência para a estabilidade com uma média de 2,84 uEq/g/min. Há uma diferença estatística nos tempos 60 e 90 minutos quando comparado com os grupos GSH4 e GSH6 ($p = 0,0001$), sendo a média superior. Com relação a fração de potássio reabsorvida, observou-se uma variação que vai de 10,51 a 21,50%, sendo a média superior à dos grupos GSH2, GSH4 e GSH6.

Na análise do clearance de água livre verificou-se uma diminuição até os primeiros 30 minutos, quando posteriormente começa a subir. Este grupo quando comparado com o grupo controle, mostra uma diferença estatística nos 70 minutos finais de perfusão ($p < 0,05$), sendo a média muito inferior à do grupo controle. Quando comparado com o grupo GSH2, há uma diferença estatística nos tempos 20, 30, 40 e 70 minutos ($p < 0,05$), com o grupo GSH4 nos tempos 30 e 40 minutos ($p < 0,008$) e com o grupo GSH6 nos tempos 30, 40 e 70 minutos ($p < 0,008$), sendo a média também inferior à dos grupos comparados. No tocante ao clearance osmolar há um crescimento até os primeiros 30 minutos, quando a partir daí começa a declinar, não sendo diferente do grupo controle. O aporte

distal mostra um aumento nos primeiros 50 minutos, quando neste momento começa a declinar e se manter estável. Com relação à reabsorção proximal de sódio evidencia-se uma certa tendência para a estabilidade com uma média de 34,43%. Quando comparados os valores com os do grupo controle, verificou-se diferença estatística nos primeiros 70 minutos de perfusão ($p < 0,04$). Quando comparado com o grupo GSH2, verificou-se diferenças estatísticas nos primeiros 80 minutos de experiência ($p < 0,04$). Comparando-se com o grupo GSH4, evidenciou-se diferenças nos primeiros 60 minutos ($p < 0,04$). Já a comparação com o grupo GSH6, viu-se diferenças nos primeiros 70 minutos de perfusão renal ($p < 0,04$). A média em todos estes grupos mostrou-se superior à média deste grupo. A reabsorção distal de sódio mostra um decréscimo nos trinta minutos iniciais para então tornar-se estável. Ao compararmos estes valores com os do grupo controle e do grupo GSH2 pode-se ver diferença estatisticamente importante nos 80 minutos finais ($p = 0,0005$). Ao comparar-se com o grupo GSH4, viu-se diferença nos tempos 20, 30, 40, 50, 70, 80 e 90 minutos ($p = 0,0001$). Comparando-se com o grupo GSH6, pode-se notar diferença nos tempos 20, 30, 40, 50, 70 e 80 minutos ($p = 0,0001$). Em todos estes grupos há uma média superior à média deste grupo.

**TABELA 5A - DINÂMICA DE PERFUSÃO DE RINS PERFUNDIDOS COM SOLUÇÃO A
CONTENDO 4G% DE DE ALBUMINA BOVINA.**

TP	FP	R	FU	CIN	TNa+	%TNa+	TK+	%TK+
10	24,99±2,67	5,12±0,86	0,209±0,053	0,36±0,11	20,81±8,55	38,14±7,50	3,21±2,01	17,22± 9,59
20	27,56±2,67	4,55±0,77	0,287±0,051	0,47±0,10	23,00±9,58	32,65±8,75	3,81±2,44	17,25±10,02
30	28,86±2,26	4,10±0,52	0,270±0,060	0,40±0,10	17,33±7,87	26,81±7,86	2,50±1,78	10,51± 9,03
40	28,69±2,24	4,07±0,53	0,254±0,047	0,38±0,10	20,22±8,71	33,03±5,64	3,34±1,79	19,46± 5,64
50	28,86±2,26	4,05±0,54	0,243±0,042	0,40±0,10	20,22±6,68	32,57±5,32	2,59±1,01	16,03± 4,72
60	29,75±2,09	3,83±0,46	0,224±0,037	0,34±0,07	20,20±6,07	37,25±6,85	3,03±0,91	21,50± 4,84
70	29,79±1,89	3,79±0,39	0,203±0,040	0,33±0,09	20,42±6,25	40,55±6,48	2,91±1,32	20,63± 5,20
80	29,96±1,87	3,79±0,40	0,188±0,045	0,28±0,08	14,72±3,95	36,93±4,47	1,78±0,88	13,39± 6,26
90	30,45±1,81	3,70±0,36	0,180±0,044	0,29±0,08	16,06±5,05	39,18±7,14	2,41±1,26	18,56± 6,50

(a)Os resultados são expressos em média ± e.p.m.

(b)Cinco animais foram utilizados neste grupo.

(c)TP:Tempo(min); FP:Fluxo de Perfusato(ml/g/min); R:Resistência(mmHg/ml/g/min); FU:Fluxo Urinário(ml/g/min);

CiN:Clearance de Inulina(ml/g/min); TNa+:Transporte de Sódio(uEq/g/min) e TK+:Transporte de Potássio(uEq/g/min).

TABELA 5B - AVALIAÇÃO FUNCIONAL DISTAL E SEGMENTAR DE RINS PERFUNDIDOS COM SOLUÇÃO A CONTENDO 4G% DE ALBUMINA BOVINA.

TP	CH ₂ O	COSM	AD	PPTNa ⁺	PDTNa ⁺
10	0,0058±0,005	0,20±0,05	28,04±7,81	35,85±8,57	2,48±2,25
20	0,0034±0,008	0,28±0,05	40,24±9,61	33,01±9,60	-1,33±3,73
30	-0,0030±0,006	0,27±0,05	36,65±9,35	29,02±7,76	-3,35±2,53
40	0,0010±0,003	0,25±0,05	32,84±5,90	32,91±6,19	0,62±1,22
50	0,0004±0,003	0,24±0,04	36,51±8,45	32,78±4,93	-0,19±1,05
60	0,0090±0,006	0,21±0,04	29,40±4,12	34,37±6,36	4,85±2,75
70	0,0062±0,001	0,20±0,04	26,17±4,87	38,59±6,44	3,34±0,48
80	-0,0010±0,005	0,19±0,04	24,31±5,88	37,92±3,83	-1,46±2,96
90	0,0124±0,007	0,17±0,04	25,23±6,33	35,46±8,19	5,12±2,42

(a) Os resultados são expressos em média ± e.p.m.

(b) Cinco animais foram incluídos neste grupo.

(c) TP: Tempo(min); CH₂O: Clearance de Água Livre(ml/g/min); COSM: Clearance Osmolar(ml/g/min);

AD: Aporte Distal(μEq/g/min); PPTNa⁺: Transporte de Sódio Proximal(%); PDTNa⁺: Transporte de Sódio Distal(%).

PERFUSÃO RENAL COM SOLUÇÃO A CONTENDO 4g% DE ALBUMINA BOVINA E 4 mM de GSH.

Resolveu-se constituir um novo grupo em que fosse adicionado uma concentração média de glutathione (4 mM) à solução de composição intracelular (Solução A) em relação às concentrações adicionadas à Solução de Krebs-Henseleit.

Os resultados deste grupo estão sumarizados nas tabelas 6A, 6B e 6C.

Os rins dos coelhos foram perfundidos durante 90 minutos com Solução A contendo 4g% de albumina bovina e 4 mM de glutathione com o número total de seis animais.

Ao analisar-se o fluxo de perfusão renal nota-se um aumento nos primeiros 70 minutos para depois começar a cair. Existe uma diferença entre este grupo e o grupo GSH6 nos 70 minutos iniciais da perfusão renal ($p < 0,05$), sendo a média superior à do grupo GSH6. Com relação à análise da resistência vascular observou-se uma queda lenta e progressiva até aos 70 minutos iniciais, sendo diferente estatisticamente do grupo GSH6 ($p < 0,05$), sendo a média inferior à do grupo GSH6. O fluxo urinário é deprimido progressivamente à medida que a perfusão transcorre, chegando o último valor registrado a representar cerca da metade do valor inicial, sendo estatisticamente diferente com o grupo controle nos tempos 10 e 20 minutos ($p = 0,0014$), até aos 70 minutos iniciais, evidenciado pelos testes de Fisher e Scheffe, quando comparado com o grupo GSH2 e GSH4, até aos 60 minutos iniciais, dado também pelos testes de Fisher e de Scheffe,

quando comparado com o grupo GSH6, e nos tempos 10, 20, 50 e 60 minutos, dado pelo teste de Fisher, quando comparado com o grupo perfundido somente com Solução A, sendo esta média considerada superior à média destes grupos analisados. O clearance de inulina diminui à medida que progride a perfusão, chegando o último valor medido a representar cerca de menos da metade do valor inicialmente registrado, mantendo uma média superior à dos grupos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit contendo 4 mM de GSH e com perfusato de composição intracelular(Solução A), embora não apresente diferença estatística. Na avaliação da carga de sódio reabsorvida, observou-se uma queda no transcorrer do experimento, variando de $83,31 \pm 27,84$ a $31,18 \pm 4,37$, sendo a média superior à do grupo perfundido com Solução A na ausência de GSH e inferior à do grupo controle. A fração de sódio reabsorvida manteve-se estável durante todo o experimento alcançando uma média de 50,99%. Existem diferenças quando comparado com os grupos GSH0, GSH2 e GSH6 nos tempos 20, 30, 40 e 60 minutos($p < 0,001$), sendo a média inferior e com o grupo perfundido com Solução A nos tempos 10, 30, 40 e 50 minutos($p < 0,002$), sendo a média considerada superior. A adição de GSH à Solução A aumentou significativamente a fração de sódio reabsorvida(%TNa⁺). À medida que a perfusão progride, o potássio reabsorvido diminui chegando a um valor final 3 vezes menor, sendo esse grupo significativamente diferente de todos os outros grupos durante todo o período de perfusão($p < 0,003$), sendo a média superior. A fração de potássio reabsorvida mantém uma tendência para a diminuição, sendo diferente estatisticamente do grupo GSH6 evidenciado pelo teste de Fisher em quase toda a perfusão, do grupo GSH4 nos tempos 10, 20, 40, 50, 60 e 70, evidenciado também pelo teste de Fisher e do grupo GSH2 nos tempos 40, 50, 70, 80 e 90 minutos, novamente evidenciado pelo teste de Fisher, sendo a média superior.

O clearance de água livre varia de $0,024 \pm 0,02$ a $-0,005 \pm 0,002$ ml/g/min, valores estes estatisticamente significantes quando comparado com o do grupo controle nos tempos 40, 60, 70, 80 e 90 minutos ($p < 0,04$), com o grupo GSH2 em quase todo o experimento, mostrado pelo teste de Fisher, com o grupo GSH4 nos tempos 40 e 70 minutos ($p = 0,0007$) e com o grupo GSH6 nos tempos 30, 40 e 70 minutos ($p = 0,008$), valores estes inferiores aos demais grupos experimentais. O clearance osmolar diminuiu com o passar da perfusão variando de $0,48 \pm 0,09$ a $0,23 \pm 0,05$ ml/g/min, estando a média superior e sendo diferente quando comparado com os grupos GSH2, GSH4 e GSH6 nos 70 minutos iniciais ($p < 0,05$) e com o grupo perfundido com Solução A nos tempos 10, 20, 50, 60 e 70 minutos ($p < 0,05$). O aporte distal sofreu uma queda importante no decorrer da perfusão, chegando o valor registrado aos 90 minutos finais do experimento a representar cerca de 50% do valor medido nos 10 minutos iniciais. Existe uma diferença estatisticamente importante entre este grupo e o grupo GSH4, visto pelos testes de Fisher e de Scheffe, quando avaliado os primeiros 60 minutos. Avaliando-se a fração reabsorvida de sódio proximal, pode-se observar que nos 30 minutos iniciais há uma queda para depois insinuar uma tendência para a estabilidade, estando os 70 minutos iniciais da perfusão deste grupo abaixo dos grupos GSH0, GSH2, GSH4 e GSH6, não sendo diferente estatisticamente e superior ao grupo perfundido com Solução A durante os tempos 10 e 50 minutos da perfusão ($p < 0,04$). Já a fração reabsorvida distal de sódio mostra um crescimento progressivo até os 50 minutos iniciais para depois decrescer, sendo inferior quando comparada com os grupos GSH0, GSH2, GSH4 e GSH6 quando avaliado todos os tempos de perfusão e diferente estatisticamente ($p < 0,005$).

O glutatión reabsorvido diminui à medida que prossegue a perfusão renal, chegando o valor registrado aos 90 minutos de perfusão a representar cerca de

30% do valor registrado aos 10 minutos, sendo inferior após os 30 minutos iniciais aos grupos GSH2 e GSH4. Já a fração de GSH reabsorvida cai durante os primeiros 30 minutos para em seguida elevar um pouco e manter uma tendência para a estabilidade, não mostrando diferenças entre os outros grupos. Avaliando-se o clearance de GSH, viu-se que há uma tendência para a estabilidade perfazendo uma média de 0,33 ml/g/min, sendo a média superior e diferente estatisticamente durante toda a perfusão nos grupos GSH4 e GSH6 ($p < 0,05$) e nos primeiros 70 minutos no grupo GSH2 ($p < 0,006$). A relação entre o clearance de glutathione e o clearance de inulina começa a aumentar com o progredir do experimento com um aumento de 30% no valor medido aos 90 minutos comparado com o tempo inicial da perfusão renal, ficando superior aos demais grupos estudados.

**TABELA 6A - DINAMICA DE PERFUSAO DE RINS PERFUNDIDOS COM SOLUÇÃO A
CONTENDO 4G% DE ALBUMINA BOVINA E 4 mM DE GSH.**

TP	FP	R	FU	CIN	TNa+	%TNa+	TK+	%TK+
10	21,85±0,95	5,59±0,43	0,464±0,099	1,08±0,36	83,31±27,84	56,98±2,70	17,72±7,03	42,95±5,18
20	23,92±1,05	4,92±0,38	0,488±0,092	0,80±0,25	66,04±20,26	48,13±5,02	14,41±4,63	38,35±5,93
30	23,70±1,06	4,89±0,45	0,411±0,080	0,77±0,19	48,60±15,12	43,94±5,55	9,19±3,31	27,98±8,47
40	23,49±1,31	4,76±0,48	0,411±0,056	0,77±0,12	48,31± 7,31	48,76±2,60	9,72±2,05	35,99±4,58
50	24,18±1,21	4,70±0,55	0,408±0,051	0,64±0,14	53,62± 8,89	52,62±4,29	10,30±2,83	38,24±8,03
60	24,35±1,35	4,60±0,53	0,382±0,051	0,72±0,08	41,81± 4,91	47,20±4,31	7,14±1,57	31,29±5,58
70	24,14±1,33	4,63±0,57	0,330±0,046	0,69±0,10	47,41± 8,05	53,71±5,72	8,74±1,76	39,25±6,17
80	22,54±2,92	6,48±1,94	0,281±0,048	0,60±0,11	45,68±12,66	53,20±9,01	8,65±2,43	40,59±8,03
90	22,69±2,97	5,95±1,51	0,232±0,053	0,45±0,04	31,18± 4,37	54,36±7,51	5,53±0,64	39,61±5,81

(a) Os resultados são expressos em média ± e.p.m.

(b) Seis animais foram utilizados neste grupo.

(c) TP: Tempo(min); FP: Fluxo de Perfusato(ml/g/min); R: Resistência(mmHg/ml/g/min); FU: Fluxo Urinário(ml/g/min);

CIN: Clearance de Inulina(ml/g/min); TNa+: Transporte de Sódio(uEq/g/min) e TK+: Transporte de Potássio(uEq/g/min).

TABELA 6B - AVALIAÇÃO FUNCIONAL DISTAL E SEGMENTAR DE RINS PERFUNDIDOS COM SOLUÇÃO A CONTENDO 4G% DE ALBUMINA BOVINA E 4mM DE GSH.

TP	CH2O	COSM	AD	PPTNa+	PDTNa+
10	0,0040±0,014	0,46±0,10	55,62±11,32	56,68±3,18	0,08±3,55
20	0,0037±0,005	0,48±0,09	61,16±10,66	47,92±4,89	0,48±0,93
30	0,0048±0,002	0,41±0,08	50,18± 8,71	42,64±5,97	1,85±0,93
40	0,0003±0,002	0,41±0,06	49,36± 6,08	49,02±2,63	0,16±0,56
50	0,0237±0,022	0,38±0,04	49,33± 5,64	50,21±3,85	4,83±4,14
60	0,0033±0,007	0,38±0,06	47,66± 5,42	46,37±3,91	1,85±2,07
70	-0,0030±0,003	0,33±0,05	38,84± 5,23	54,22±5,49	0,98±0,87
80	-0,0055±0,003	0,29±0,05	32,34± 5,84	54,12±8,80	-0,39±1,71
90	0,0050±0,002	0,23±0,05	27,89± 6,54	53,92±7,64	0,95±0,93

(a) Os resultados são expressos em média ± e.p.m.

(b) Seis animais foram incluídos neste grupo.

(c) TP: Tempo(min); CH2O: Clearance de Água Livre(ml/g/min); COSM: Clearance Osmolar Osmolar(ml/g/min); AD: Aporte Distal (uEq/g/min); PPTNa+: Transporte de Sódio Proximal(%); PDTNa+: Transporte de Sódio Distal(%)

TABELA 6C - AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTATION EM RINS PERFUNDIDOS COM SOLUÇÃO A CONTENDO 4G% DE ALBUMINA BOVINA E 4 mM DE GSH

TP	TGSH	%TGSH	CGSH	CGSH/CIN
10	33,80±13,10	63,92± 4,50	0,34±0,07	0,36±0,05
20	26,07± 7,76	57,88± 3,98	0,37±0,07	0,42±0,04
30	18,64± 5,95	52,77± 4,94	0,33±0,06	0,43±0,04
40	18,39± 3,99	55,45± 4,60	0,33±0,05	0,45±0,05
50	19,25± 3,94	56,40± 5,09	0,34±0,05	0,44±0,05
60	16,11± 2,57	54,60± 5,09	0,33±0,05	0,46±0,05
70	16,28± 4,35	54,98± 7,74	0,29±0,04	0,45±0,08
80	14,33± 4,86	50,83±10,98	0,25±0,05	0,49±0,11
90	9,50± 1,85	53,81± 8,48	0,40±0,11	0,46±0,08

(a) Os resultados são expressos em média ± e.p.m.

(b) Seis animais foram incluídos neste grupo.

(c) TP: Tempo(min); TGSH: Transporte de GSH(ug/g/min); CGSH: Clearance de GSH(ml/g/min); CGSH/CIN: Clearance de GSH/ Clearance de Inulina.

ASPECTOS COMPARATIVOS DA DINÂMICA DE PERFUSÃO RENAL ENTRE OS DIVERSOS GRUPOS

A seguir demonstra-se numa série de gráficos, aspectos mais relevantes dos principais achados desta pesquisa.

Na Figura 2A comparou-se em intervalos de tempos fixos(10 minutos), as variações do fluxo de perfusato, observando-se que, no grupo perfundido com 6 mM de GSH houve acentuada diminuição deste parâmetro, embora o mesmo mantenha-se constante. Na Figura 2B demonstra-se uma mesma observação de maneira mais simplificada. Em oposição a esse resultado, o maior fluxo foi observado no grupo perfundido com Solução A, que também diminuiu com a adição de GSH.

Nas Figuras 3A e 3B, analisou-se estas variações no tocante a resistência. Aqui se verifica maiores valores no grupo perfundido com 6 mM de GSH, tendo nos rins perfundidos com Solução A os que apresentaram menos resistência, novamente a Figura 3B simplifica esta comparação.

Na Figura 4A comparou-se o clearance de inulina durante os 90 minutos de perfusão em intervalos fixos de 10 minutos, observando-se que o grupo que manteve valores de clearance bem acima dos grupos comparados foi o grupo controle, exceto pelo grupo perfundido com Solução A contendo 4 mM de GSH que até os primeiros 20 minutos apresentou valores de clearance de inulina acima daqueles observados no grupo controle. Pode-se comprovar esta mesma observação, ao analisar-se a Figura 4B. Os grupos que apresentaram menores clearances de inulina foram os grupos perfundidos com Krebs-Henseleit contendo

4 mM de GSH e aquele com Solução A, sendo que até os 30 minutos de perfusão, o grupo perfundido com Solução A tem um clearance um pouco acima, enquanto nos 30 minutos finais o fenômeno oposto acontece com o grupo perfundido com Krebs-Henseleit contendo 4 mM de GSH.

Na Figura 5A comparou-se as variações na carga de sódio transportada. Aqui verifica-se que o grupo controle novamente se sobressai, mantendo-se níveis bem acima dos outros grupos em estudo, exceto nos primeiros 10 minutos em que o grupo perfundido com Solução A contendo 4 mM de GSH tem uma carga de sódio transportada mais alta. Já o grupo perfundido com Solução A, apresentou menor carga de sódio transportada, mantendo-se constante durante todo o experimento. As mesmas observações, agora de maneira mais simplificada são vistas na Figura 5B.

Na Figura 6A comparou-se as variações na fração de sódio reabsorvida sofridas nos 90 minutos de perfusão. Naquela figura observa-se um fato interessante em que os grupos perfundidos com Krebs-Henseleit sem adição de GSH e com a adição crescente de GSH nas concentrações de 2, 4 e 6 mM mantêm valores semelhantes de %TNa⁺, ficando acima dos grupos perfundidos com Solução A contendo 4 mM de GSH e com somente Solução A, estando este último bem abaixo tanto daqueles grupos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit como da própria Solução A contendo 4 mM de GSH. Estas mesmas observações podem ser evidenciadas, analisando-se a Figura 6B.

Na Figura 7A comparou-se as alterações sofridas pela carga de potássio reabsorvida durante os 90 minutos de perfusão. No grupo perfundido com Solução A contendo 4 mM de GSH, observou-se níveis bem acima dos demais grupos estudados, enquanto níveis menores são observados nos grupos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit contendo glutathione nas 3

concentrações aqui estudadas. O mesmo fenômeno de maneira mais simplificada é visto na Figura 7B.

Na Figura 8A comparou-se as variações observadas na fração de potássio reabsorvida durante os 90 minutos de perfusão. Novamente observa-se que o grupo perfundido com Solução A contendo 4 mM de GSH apresenta maior fração de potássio reabsorvida, enquanto o grupo perfundido com Krebs-Henseleit contendo 6 mM de GSH apresenta a menor fração reabsorvida de potássio. Observa-se este mesmo fato, ao analisar-se a Figura 8B.

Na Figura 9A comparou-se as variações encontradas no clearance osmolar, observadas durante os 90 minutos de perfusão. O grupo perfundido com Solução A contendo 4 mM de GSH apresenta valores de clearance osmolar muito acima dos demais grupos, enquanto o menor valor foi encontrado no grupo perfundido com Krebs-Henseleit contendo 4 mM de GSH. A Figura 9B demonstra uma mesma observação de maneira mais simplificada.

Nas Figuras 10A e 10B comparou-se as variações observadas em intervalos de tempos fixos(10 minutos) no clearance de água livre. O grupo controle apresenta maior clearance de água livre, exceto até os primeiros 30 minutos em que o grupo perfundido com Krebs-Henseleit contendo 2 mM de GSH apresenta maior clearance de água livre em relação ao grupo controle. Já o grupo que apresenta menor valor de clearance de água livre é o grupo perfundido com Solução A, estando muito abaixo do grupo controle.

Na Figura 11A comparou-se as variações observadas em intervalos fixos(10 minutos) na carga de glutathion reabsorvida. O grupo perfundido com Krebs-Henseleit contendo 4 mM de GSH apresentou maiores cargas de glutathion reabsorvidas, exceto até os primeiros 20 minutos em que o grupo perfundido com Solução A contendo 4 mM de GSH mantém maior valor da carga de GSH

reabsorvida. O grupo perfundido com Krebs-Henseleit contendo 2 mM apresenta o menor valor. Pode-se observar os mesmos resultados na Figura 11B.

Na Figura 12A comparou-se as variações sofridas pelo clearance de GSH observadas em intervalos fixos de 10 minutos. O grupo perfundido com Solução A contendo 4 mM de GSH apresenta valor muito acima dos demais grupos aqui analisados. Em oposição a esse resultado, o menor clearance de GSH foi observado nos grupos perfundidos com Krebs-Henseleit contendo tanto 4 como 6 mM de GSH. As mesmas observações, mas de maneira mais simplificada foram evidenciadas na Figura 12B.

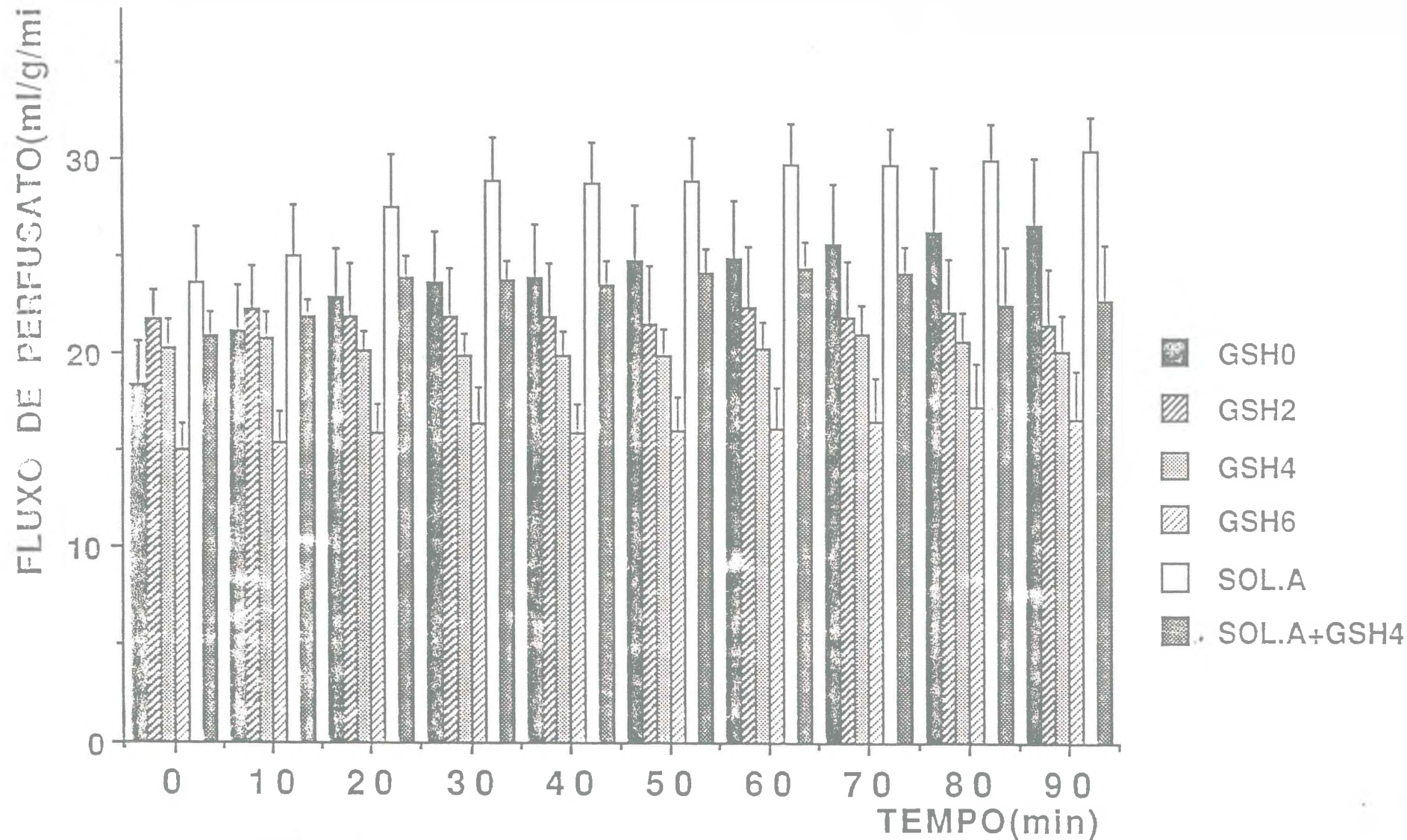


Figura 2A. Cinética do fluxo plasmático de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

a) GSH0 é o grupo controle.

b) GSH2, GSH4 e GSH6 correspondem a adição de GSH em concentrações expressas em mM.

c) SOL.A é o grupo perfundido com Solução A.

d) SOL.A+GSH4 corresponde a adição de GSH.

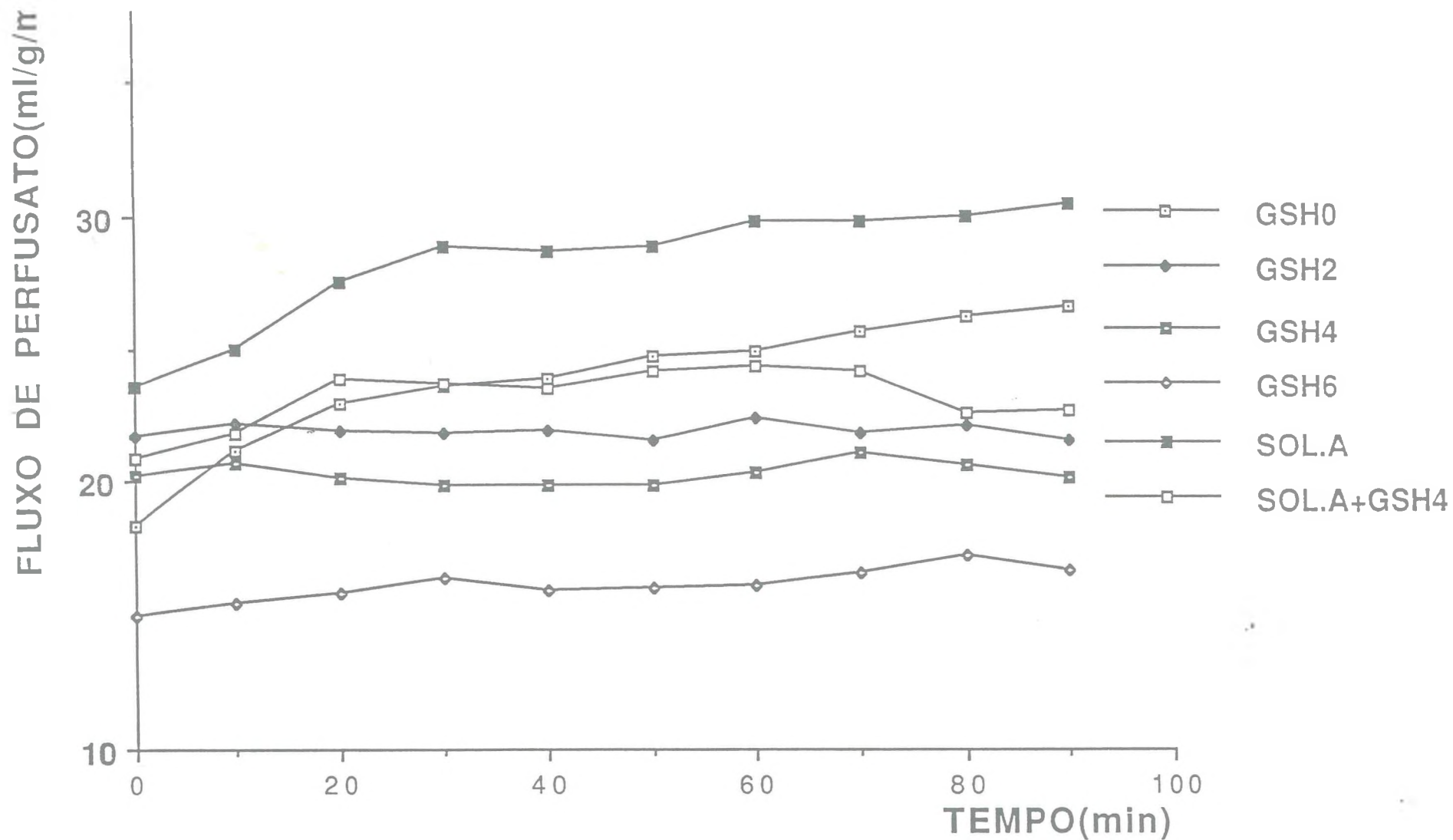


Figura 2B. Fluxo plasmático de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

a)GSH0 é o grupo controle.

b)GSH2, GSH4 e GSH6 correspondem a adição de GSH em concentrações expressas em mM.

c)SOL.A é o grupo perfundido com Solução A.

d)SOL.A+GSH4 corresponde a adição de GSH.

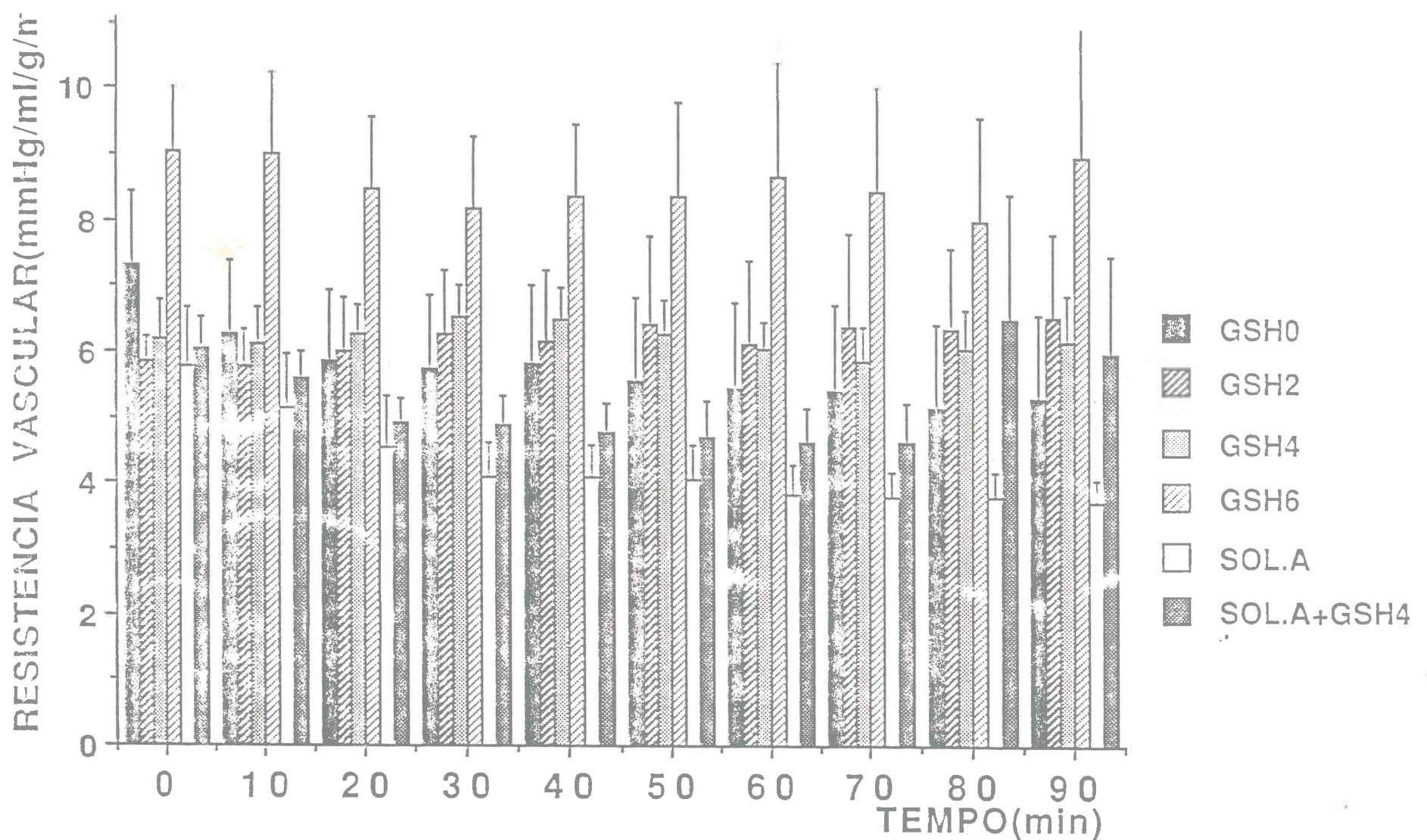


Figura 3A. Cinética da resistência vascular de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.
a) GSH0 é o grupo controle.
b) GSH2, GSH4 e GSH5 correspondem a adição de GSH em concentrações expressas em mM.
c) SOL.A é o grupo perfundido com Solução A.
d) SOL.A+GSH4 corresponde a adição de GSH.

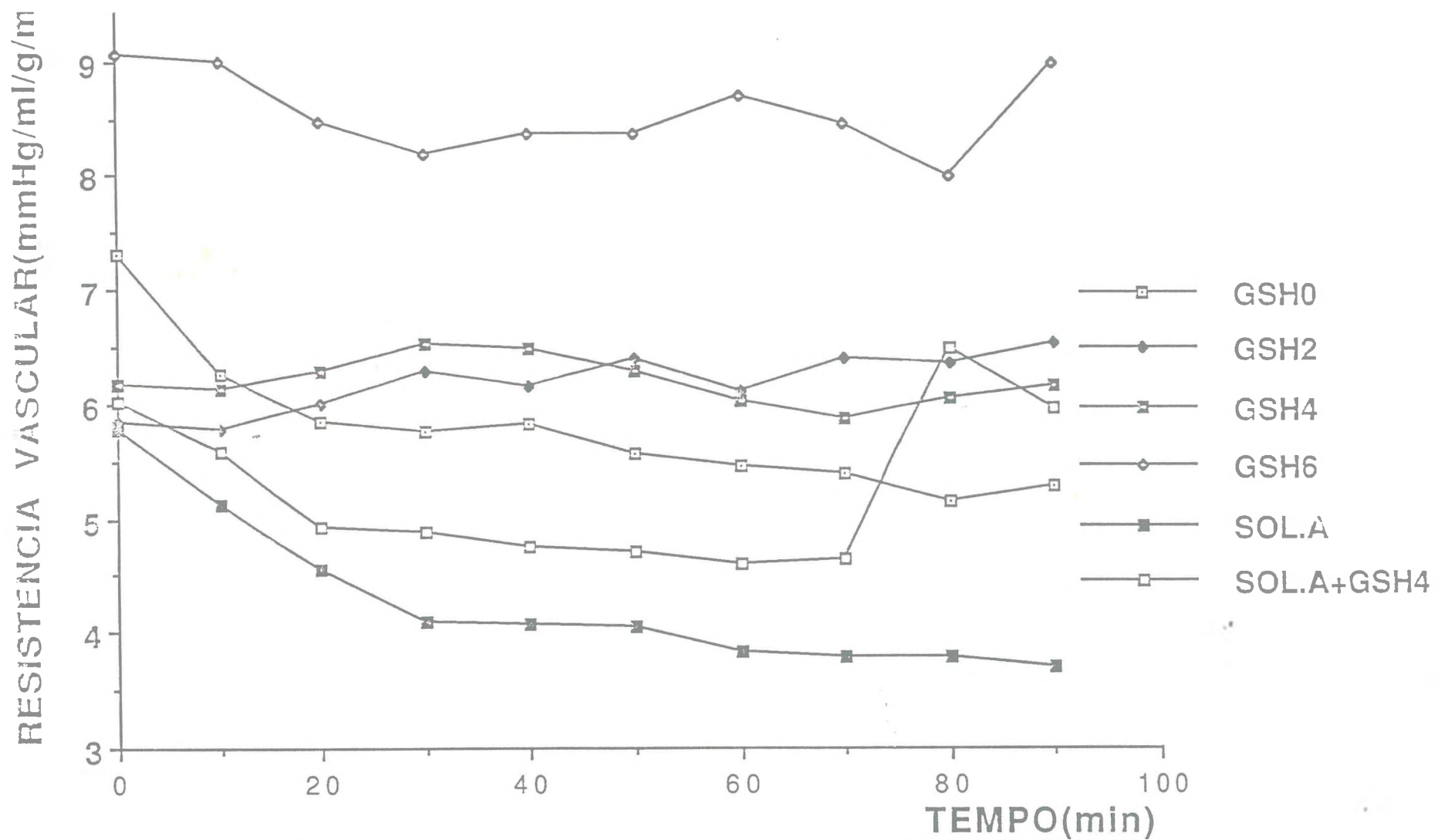


Figura 3D. Resistência vascular de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

a)GSH0 é o grupo controle.

b)GSH2, GSH4 e GSH6 correspondem a adição de GSH em concentrações expressas em mM.

c)SOL.A é o grupo perfundido com Solução A.

d)SOL.A+GSH4 corresponde a adição de GSH.

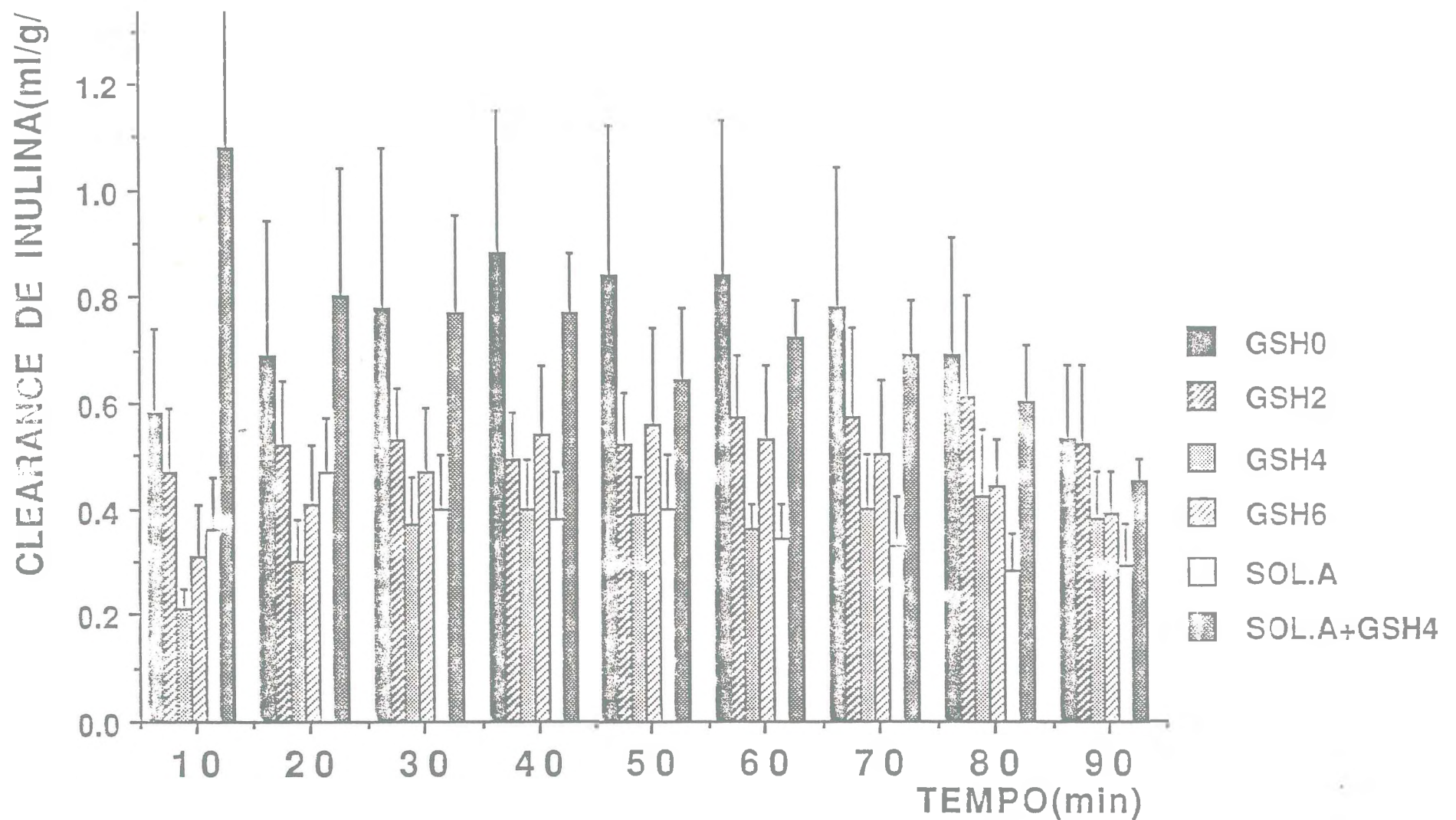


Figura 4A. Cinética do clearance de inulina de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

a)GSH0 é o grupo controle.

b)GSH2, GSH4 e GSH6 correspondem a adição de GSH em concentrações expressas em mM.

c)SOL.A é o grupo perfundido com Solução A.

d)SOL.A+GSH4 corresponde a adição de GSH.

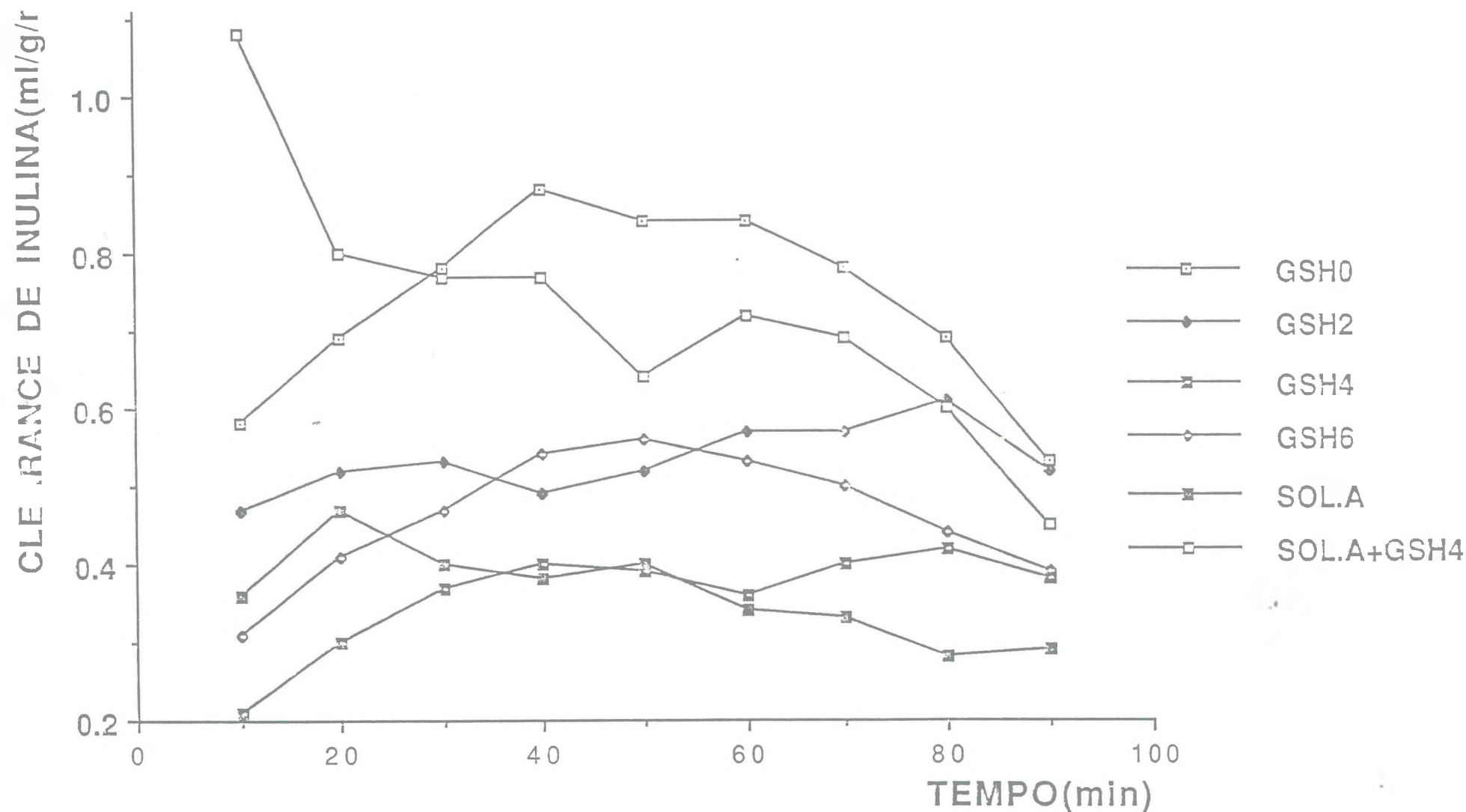


Figura 4B. Clearance de inulina de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

a) GSH0 é o grupo controle.

b) GSH2, GSH4 e GSH6 correspondem a adição de GSH em concentrações expressas em mM.

c) SOL.A é o grupo perfundido com Solução A.

d) SOL.A+GSH4 corresponde a adição de GSH.

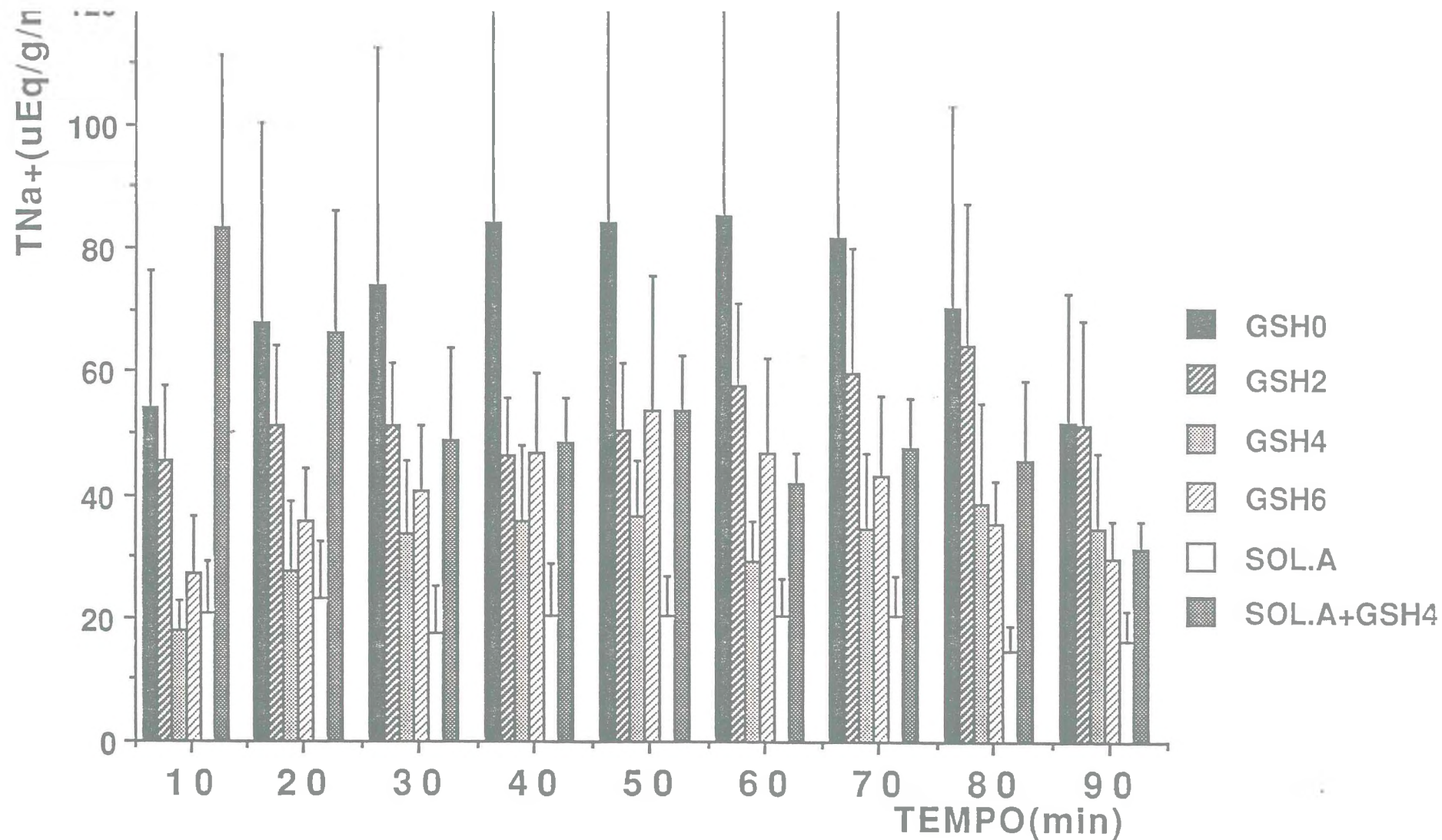


Figura 5A. Cinética da carga de sódio reabsorvida de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

a) GSH0 é o grupo controle.

b) GSH2, GSH4 e GSH6 correspondem a adição de GSH em concentrações expressas em mM.

c) SOL.A é o grupo perfundido com Solução A.

d) SOL.A+GSH4 corresponde a adição de GSH.

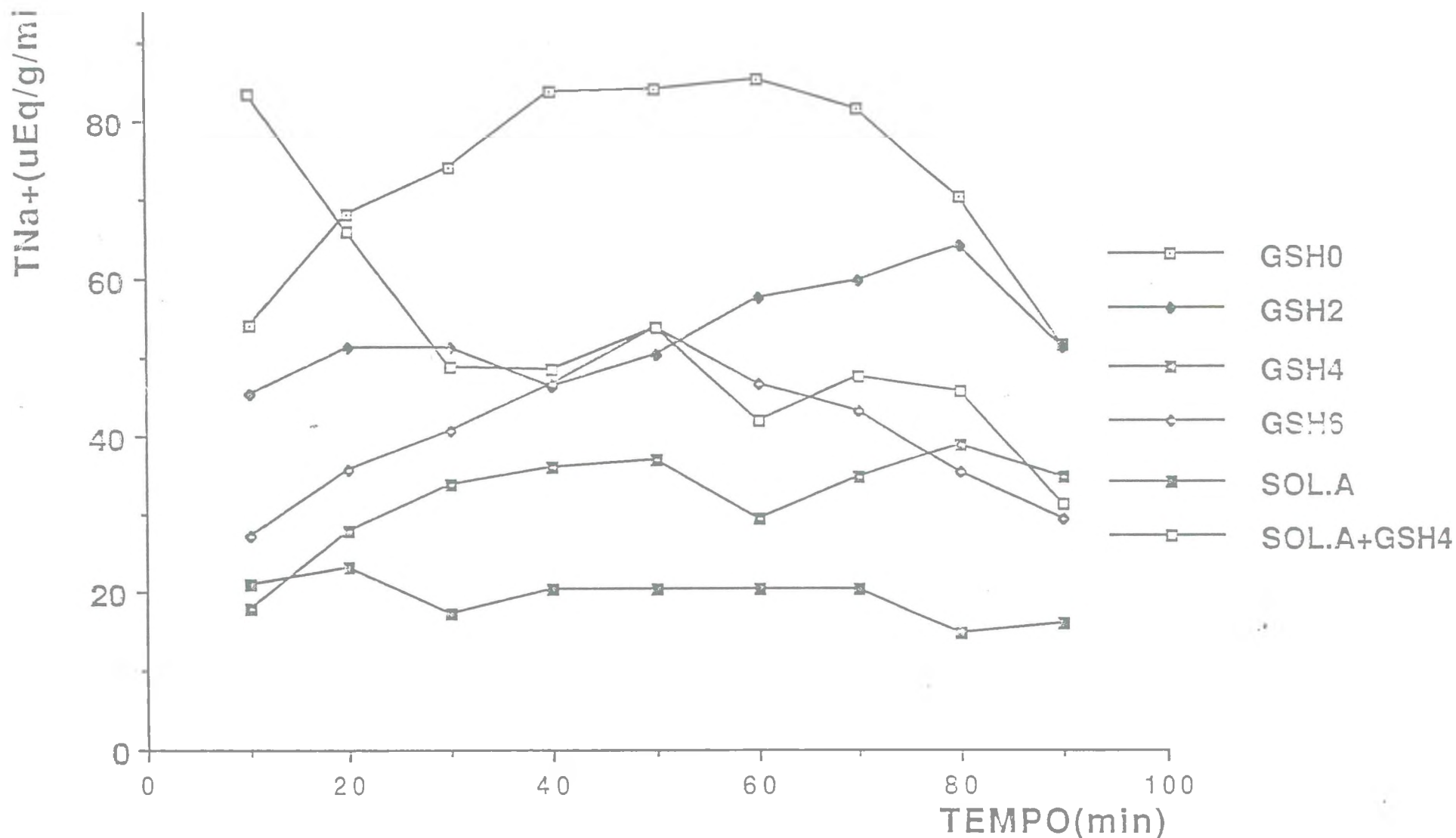


Figura 5B. Carga de sódio reabsorvida de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

a) GSH0 é o grupo controle.

b) GSH2, GSH4 e GSH6 correspondem a adição de GSH em concentrações expressas em mM.

c) SOL.A é o grupo perfundido com Solução A.

d) SOL.A+GSH4 corresponde a adição de GSH.

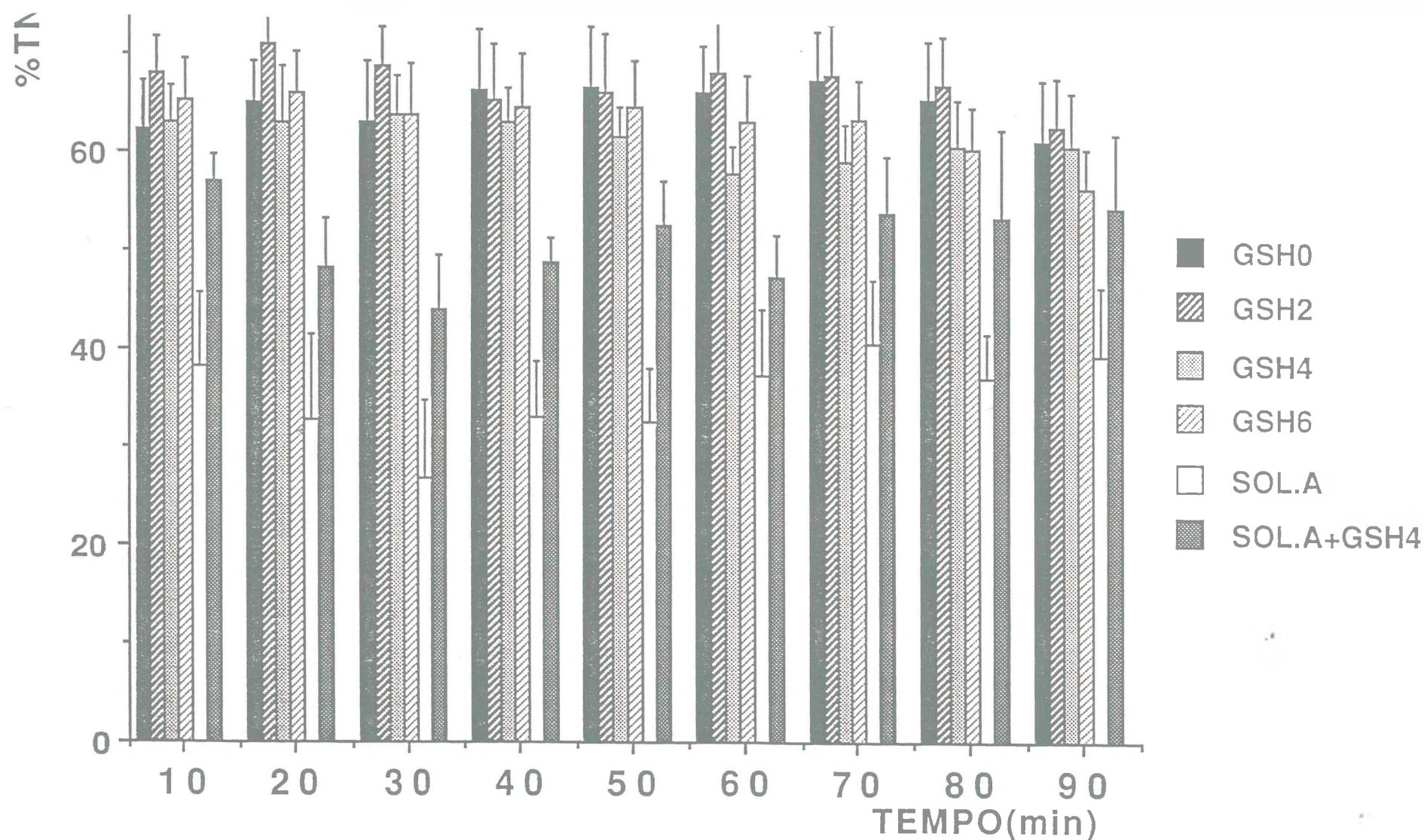


Figura 6A. Cinética da fração de sódio reabsorvida de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.
 a) GSH0 é o grupo controle.
 b) GSH2, GSH4 e GSH6 correspondem a adição de GSH em concentrações expressas em mM.
 c) SOL.A é o grupo perfundido com Solução A.
 d) SOL.A+GSH4 corresponde a adição de GSH.

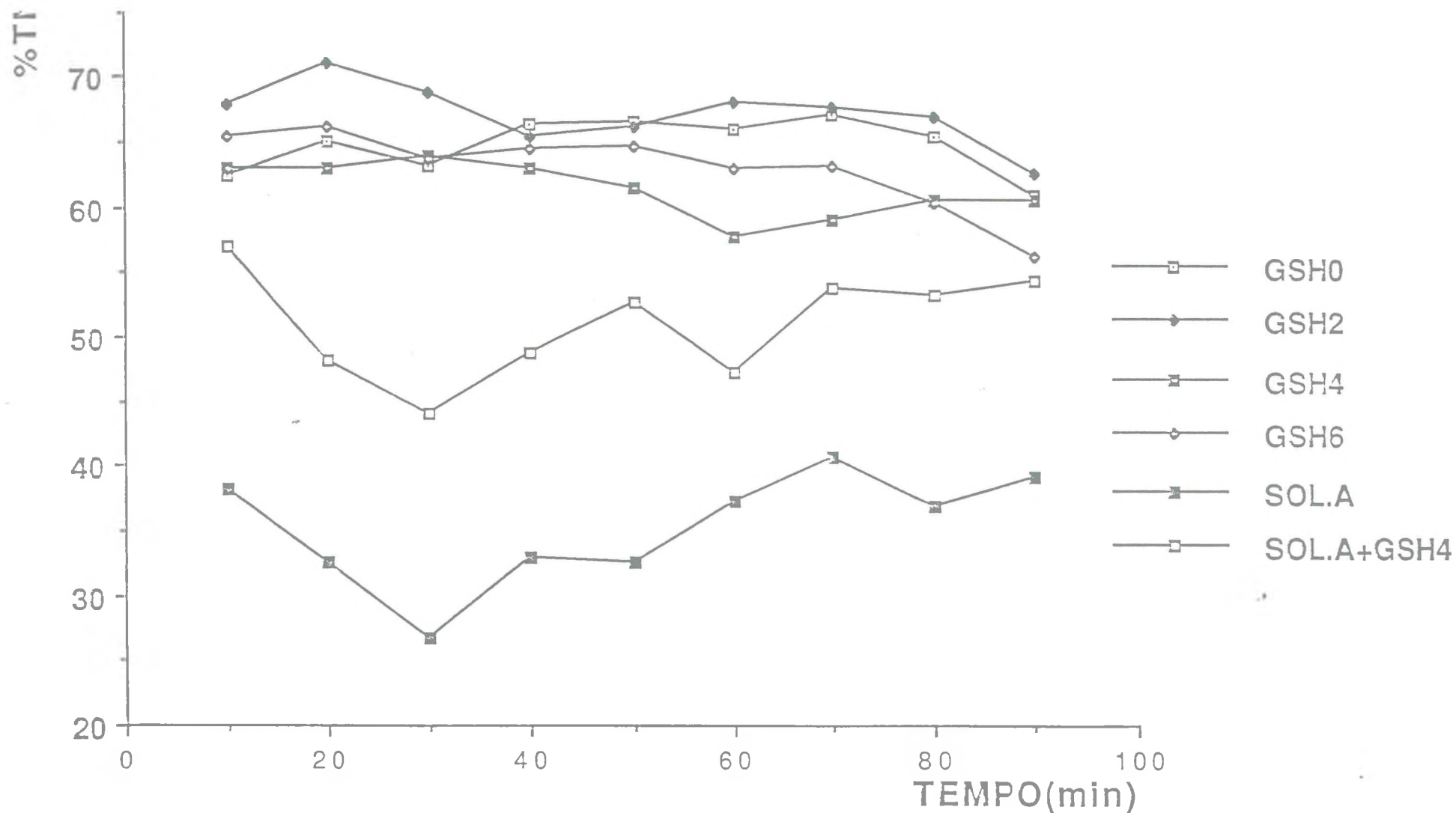


Figura 6B. Fração de sódio reabsorvida de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

a) GSH0 é o grupo controle.

b) GSH2, GSH4 e GSH6 correspondem a adição de GSH em concentrações expressas em mM.

c) SOL.A é o grupo perfundido com Solução A.

d) SOL.A+GSH4 corresponde a adição de GSH.

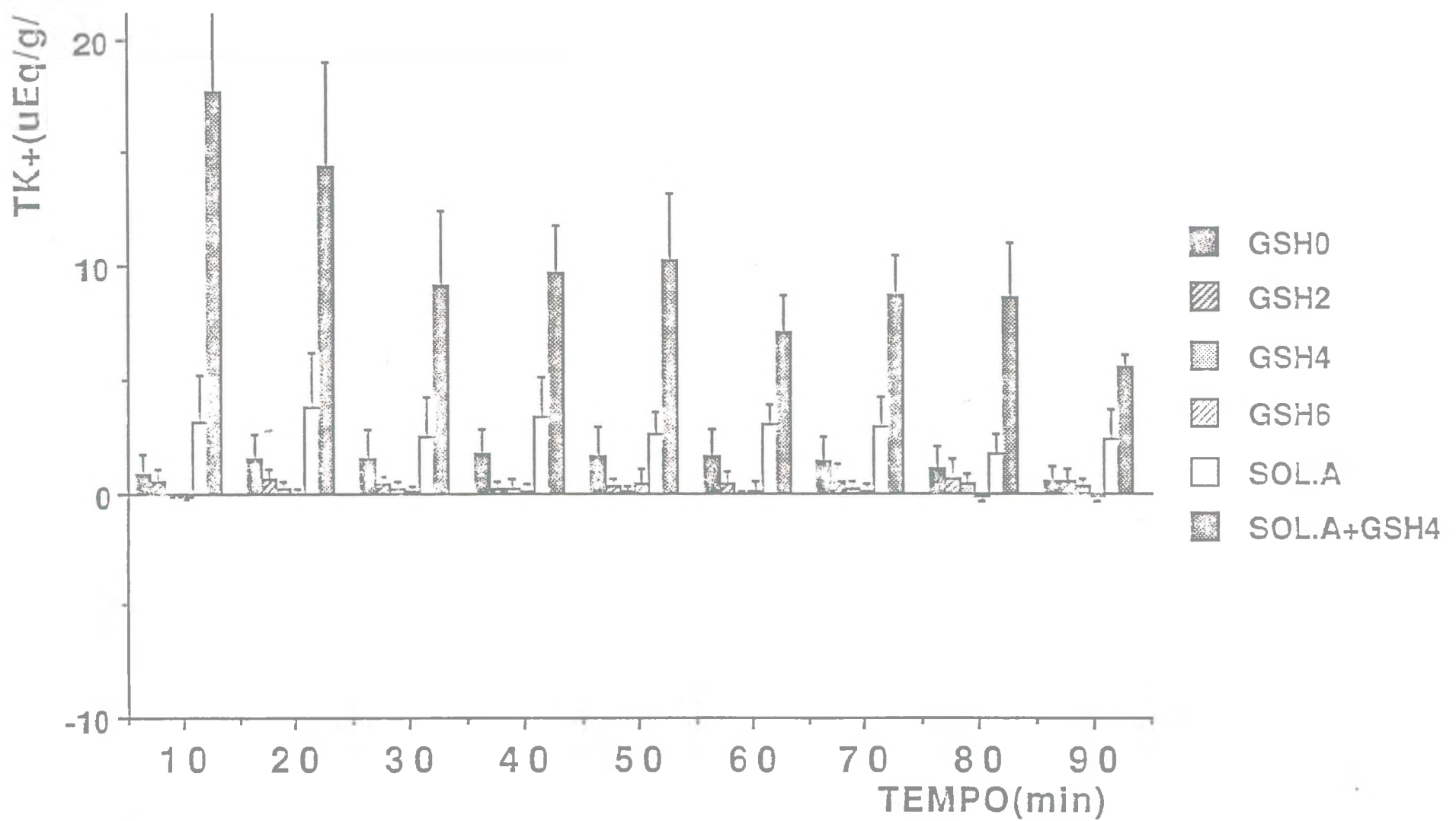


Figura 7A. Cinética da carga de potássio reabsorvida de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

a)GSH0 é o grupo controle.

b)GSH2, GSH4 e GSH6 correspondem a adição de GSH em concentrações expressas em mM.

c)SOL.A é o grupo perfundido com Solução A.

d)SOL.A+GSH4 corresponde a adição de GSH.

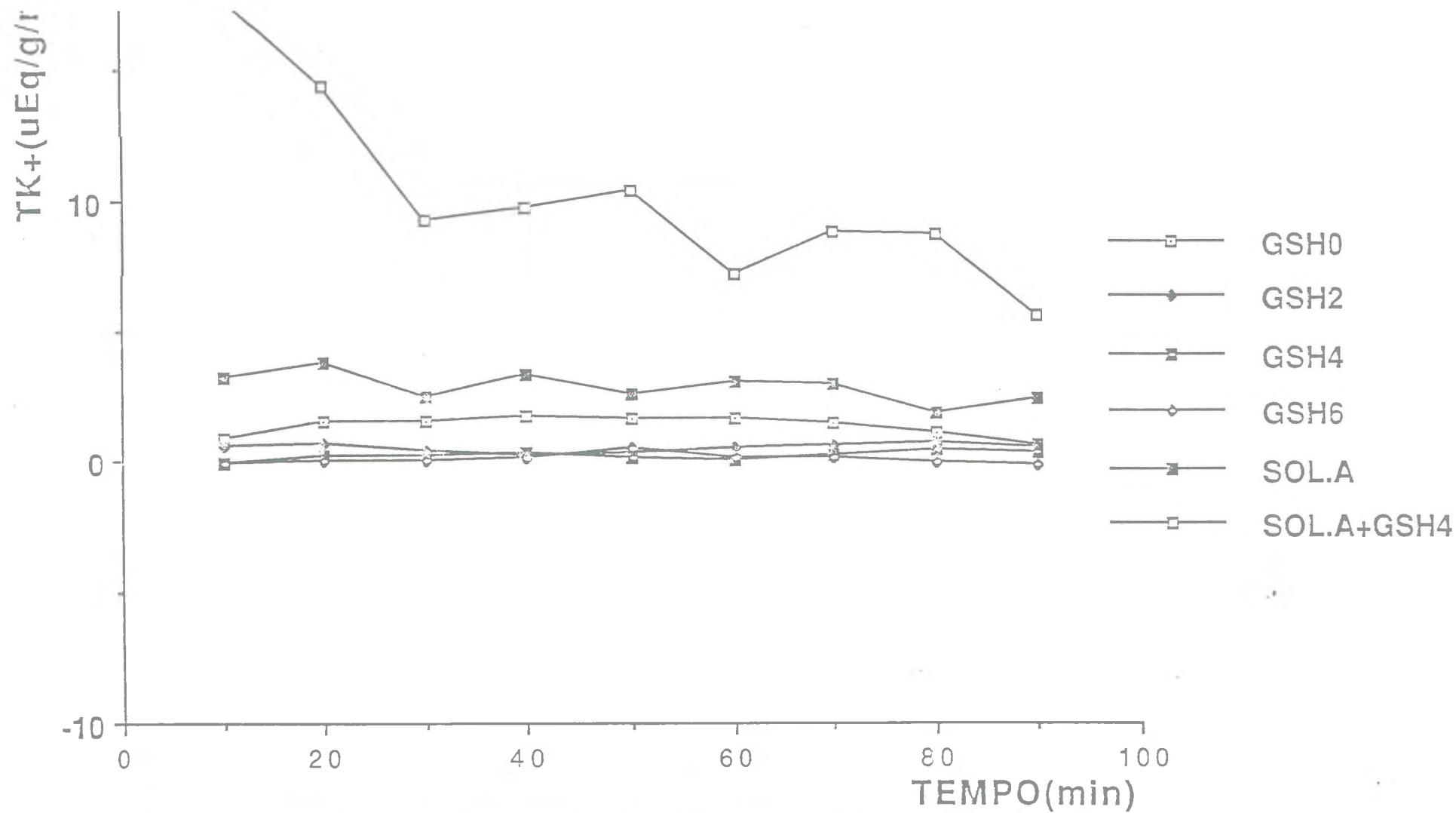


Figura 7B. Carga de potássio reabsorvida de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.
 a)GSH0 é o grupo controle.
 b)GSH2, GSH4 e GSH6 correspondem a adição de GSH em concentrações expressas em mM.
 c)SOL.A é o grupo perfundido com Solução A.
 d)SOL.A+GSH4 corresponde a adição de GSH.

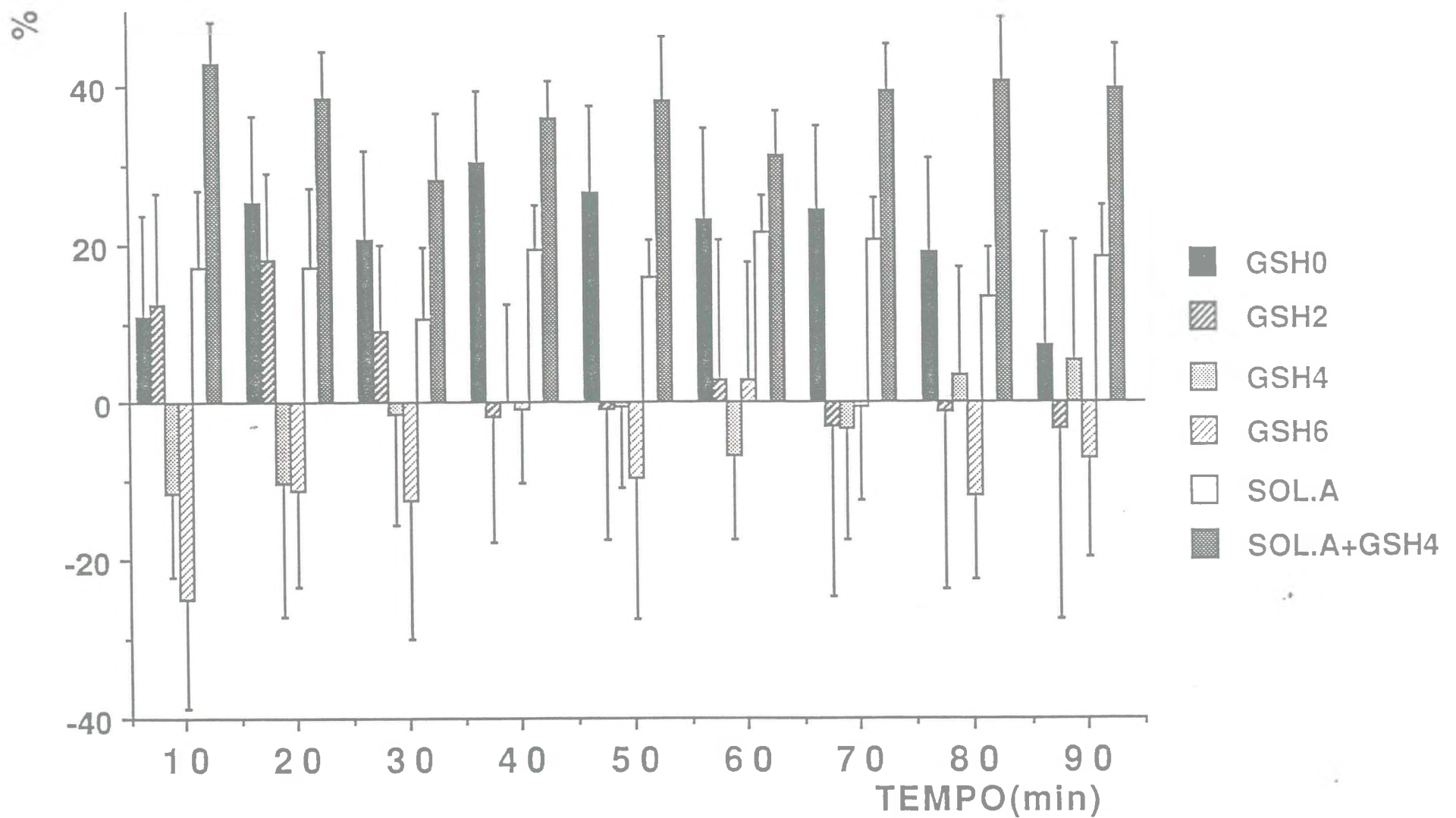


Figura 8A. Cinética da fração de potássio reabsorvida de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.
 a) GSH0 é o grupo controle.
 b) GSH2, GSH4 e GSH6 correspondem a adição de GSH em concentrações expressas em mM.
 c) SOL.A é o grupo perfundido com Solução A.
 d) SOL.A+GSH4 corresponde a adição de GSH.

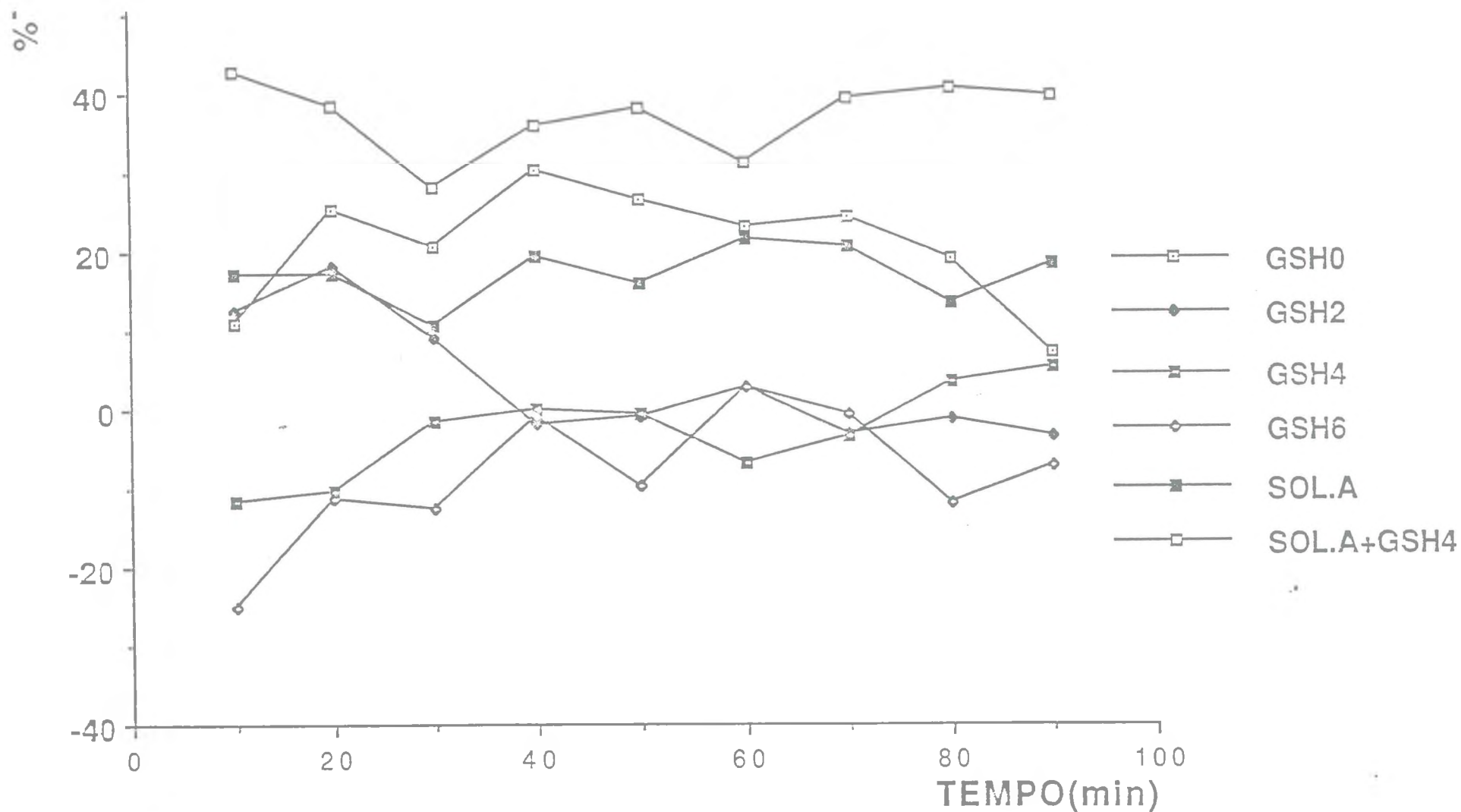


Figura 8B. Fração de potássio reabsorvida de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.
 a) GSH0 é o grupo controle.
 b) GSH2, GSH4 e GSH6 correspondem a adição de GSH em concentrações expressas em mM.
 c) SOL.A é o grupo perfundido com Solução A.
 d) SOL.A+GSH4 corresponde a adição de GSH.

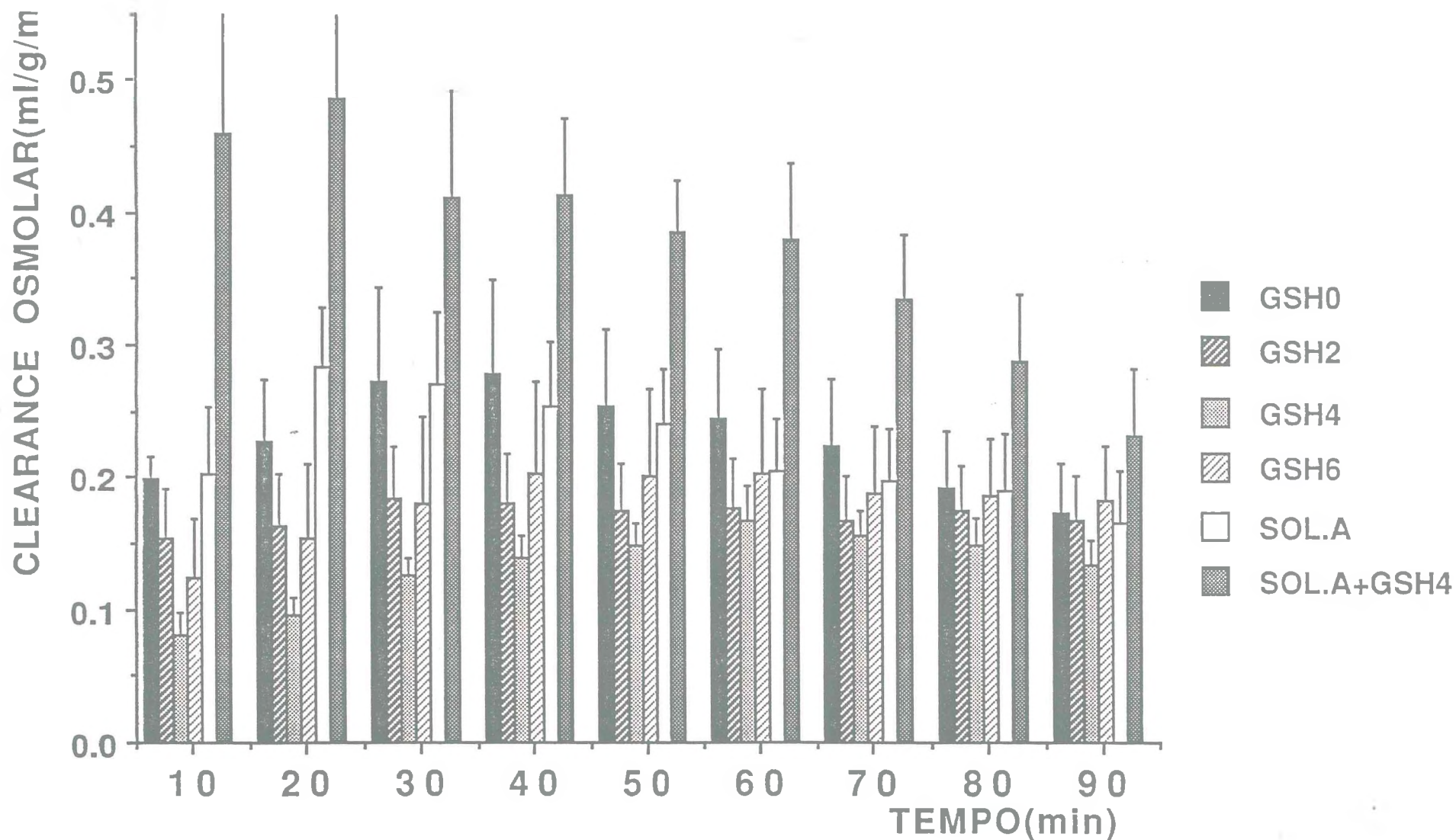


Figura 9A. Cinética do clearance osmolar de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.
a)GSH0 é o grupo controle.
b)GSH2, GSH4 e GSH6 correspondem a adição de GSH em concentrações expressas em mM
c)SOL.A é o grupo perfundido com Solução A.
d)SOL.A+GSH4 corresponde a adição de GSH.

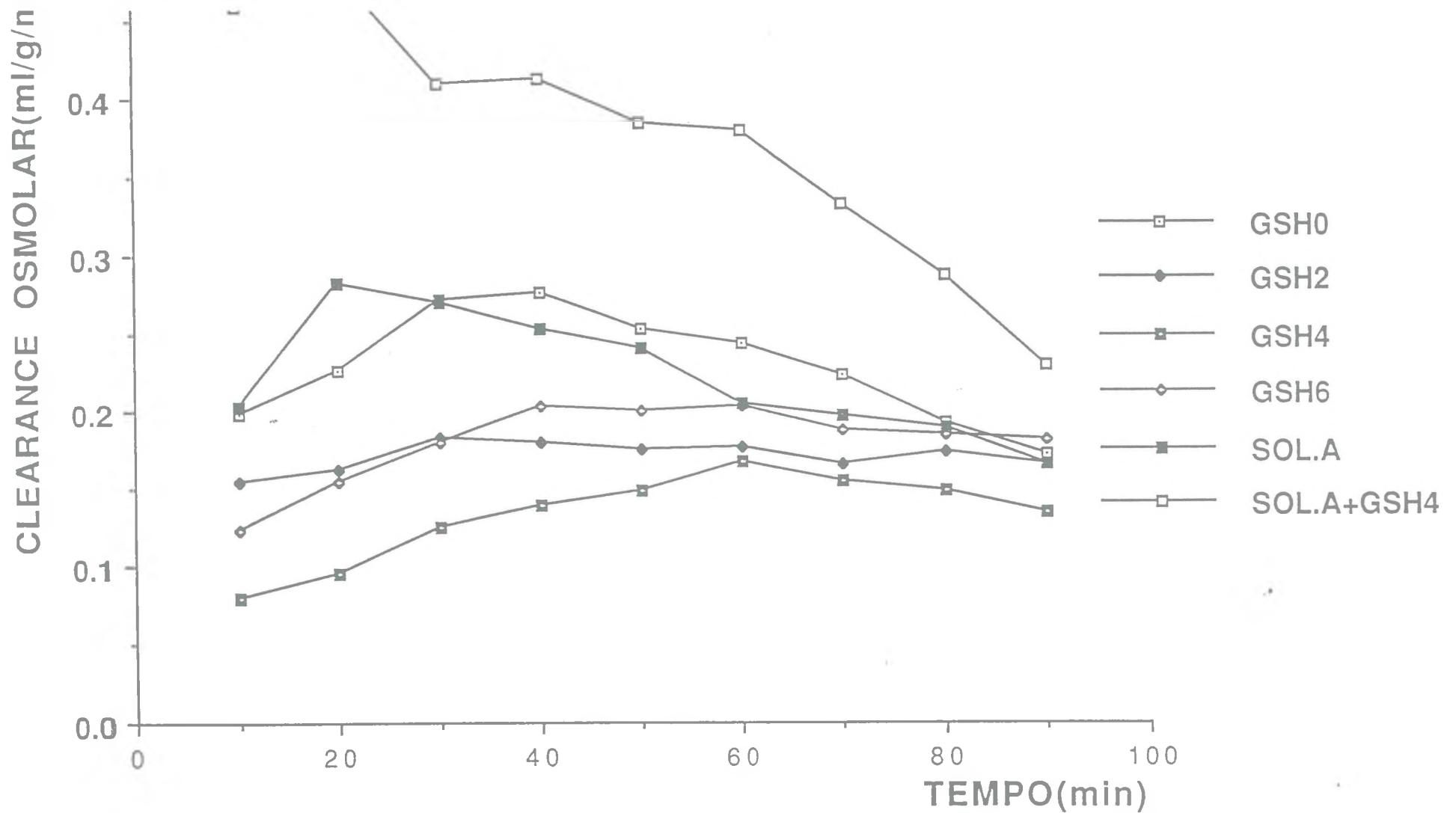


Figura 9B. Clearance osmolar de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

a) GSH0 é o grupo controle.

b) GSH2, GSH4 e GSH6 correspondem a adição de GSH em concentrações expressas em mM.

c) SOL.A é o grupo perfundido com Solução A.

d) SOL.A+GSH4 corresponde a adição de GSH.

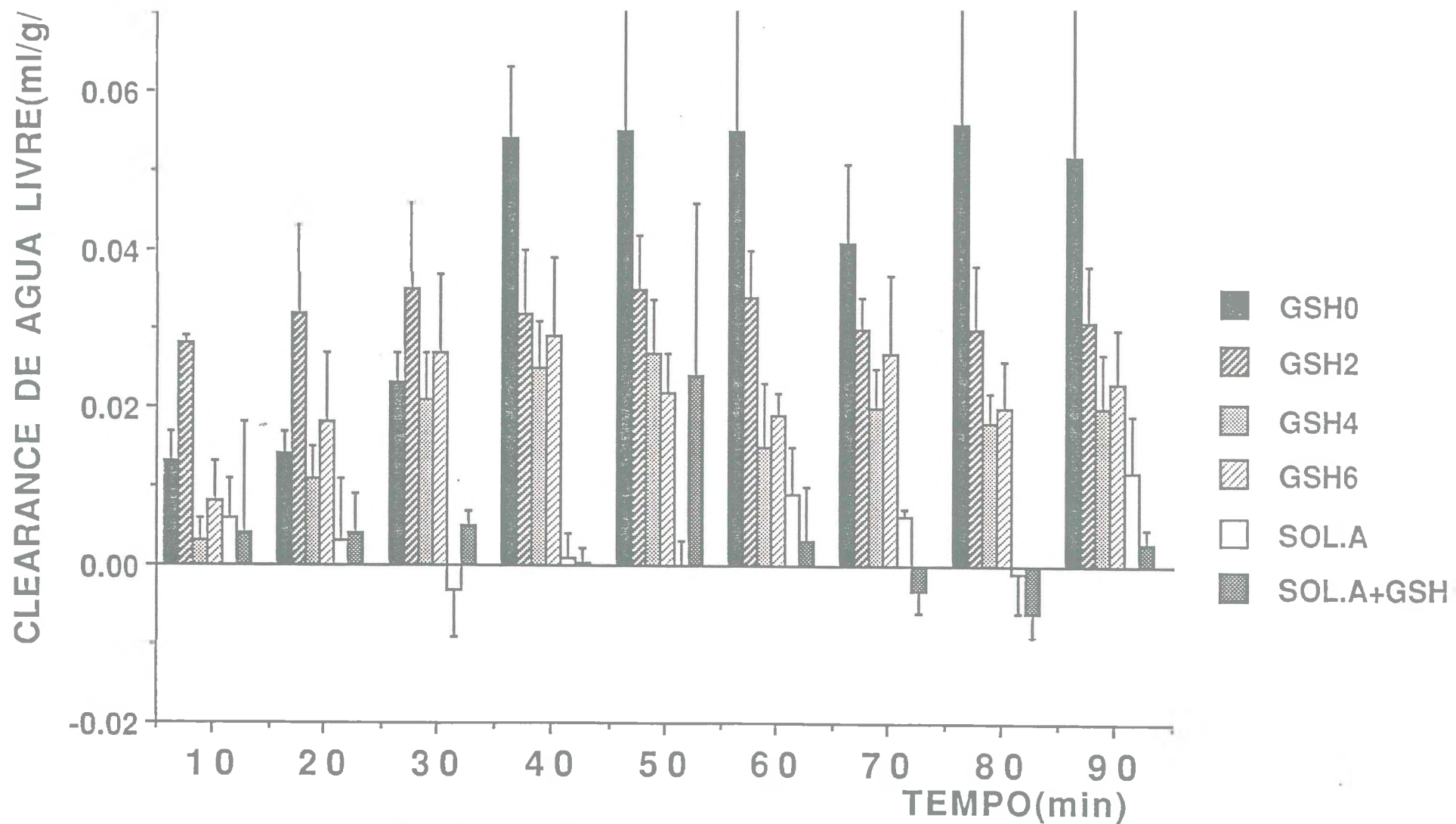


Figura 10A. Cinética do clearance de água livre de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

a)GSH0 é o grupo controle.

b)GSH2, GSH4 e GSH6 correspondem a adição de GSH em concentrações expressas em mM.

c)SOL.A é o grupo perfundido com Solução A.

d)SOL.A+GSH4 corresponde a adição de GSH.

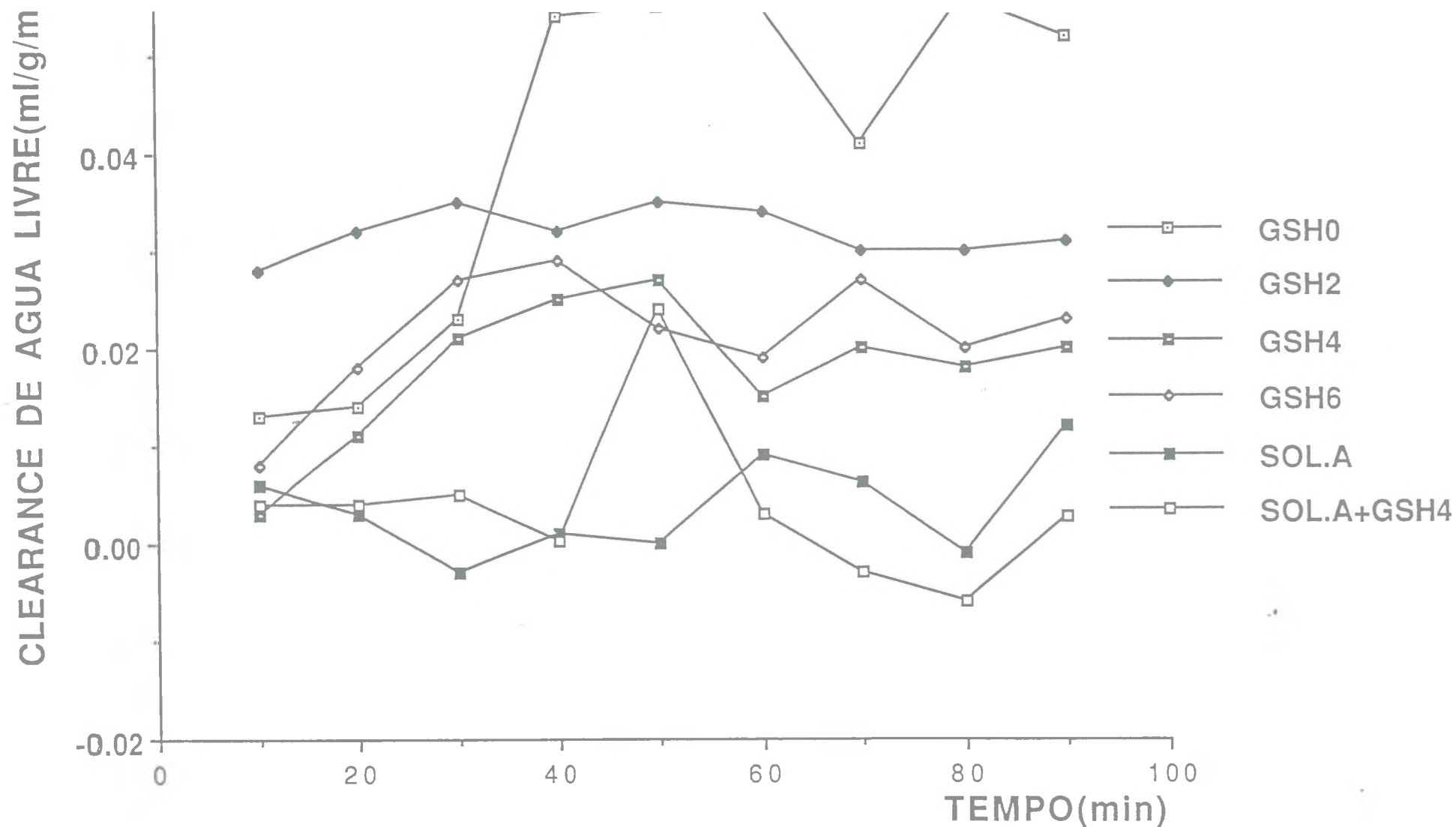


Figura 10B. Clearance de água livre de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

a) GSH0 é o grupo controle.

b) GSH2, GSH4 e GSH6 correspondem a adição de GSH em concentrações expressas em mM.

c) SOL.A é o grupo perfundido com Solução A.

d) SOL.A+GSH4 corresponde a adição de GSH.

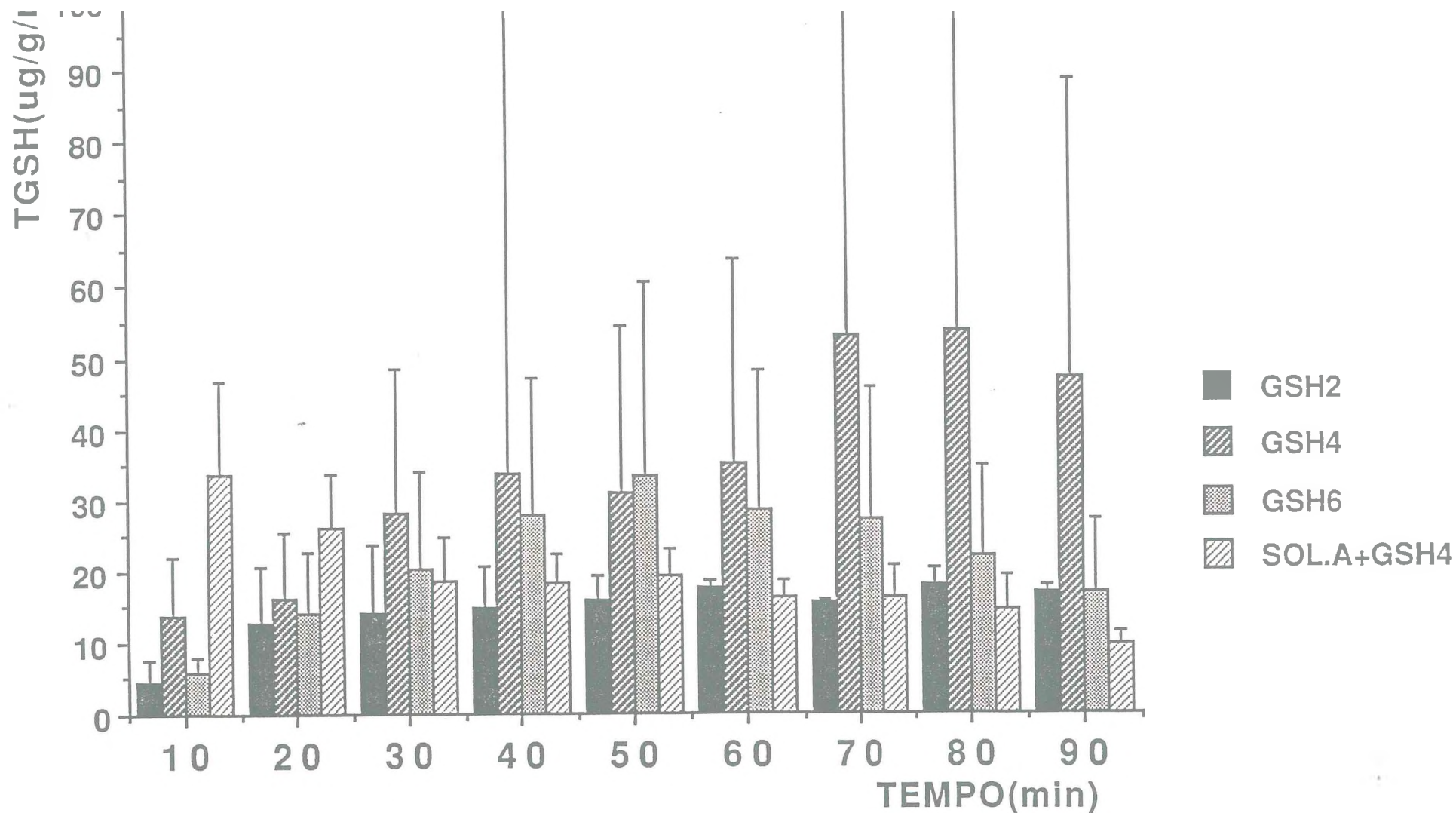


Figura 11A. Cinética da carga de glutation reabsorvida de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.
 a)GSH0 é o grupo controle.
 b)GSH2, GSH4 e GSH6 correspondem a adição de GSH em concentrações expressas em mM.
 c)SOL.A é o grupo perfundido com Solução A.
 d)SOL.A+GSH4 corresponde a adição de GSH.

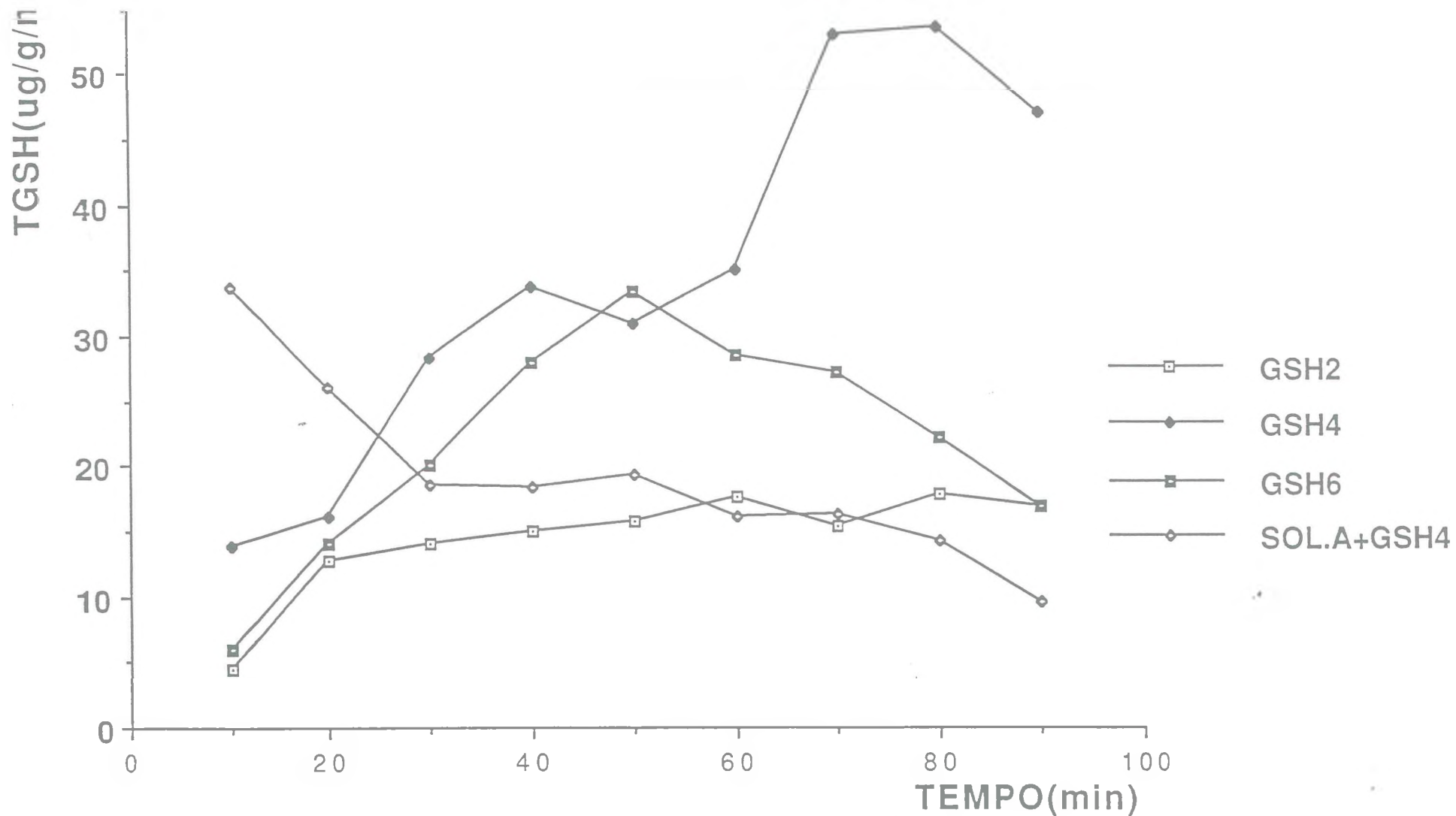


Figura 11B. Carga de glutation reabsorvida de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

a)GSH0 é o grupo controle.

b)GSH2, GSH4 e GSH6 correspondem a adição de GSH em concentrações expressas em mM.

c)SOL.A é o grupo perfundido com Solução A.

d)SOL.A+GSH4 corresponde a adição de GSH.

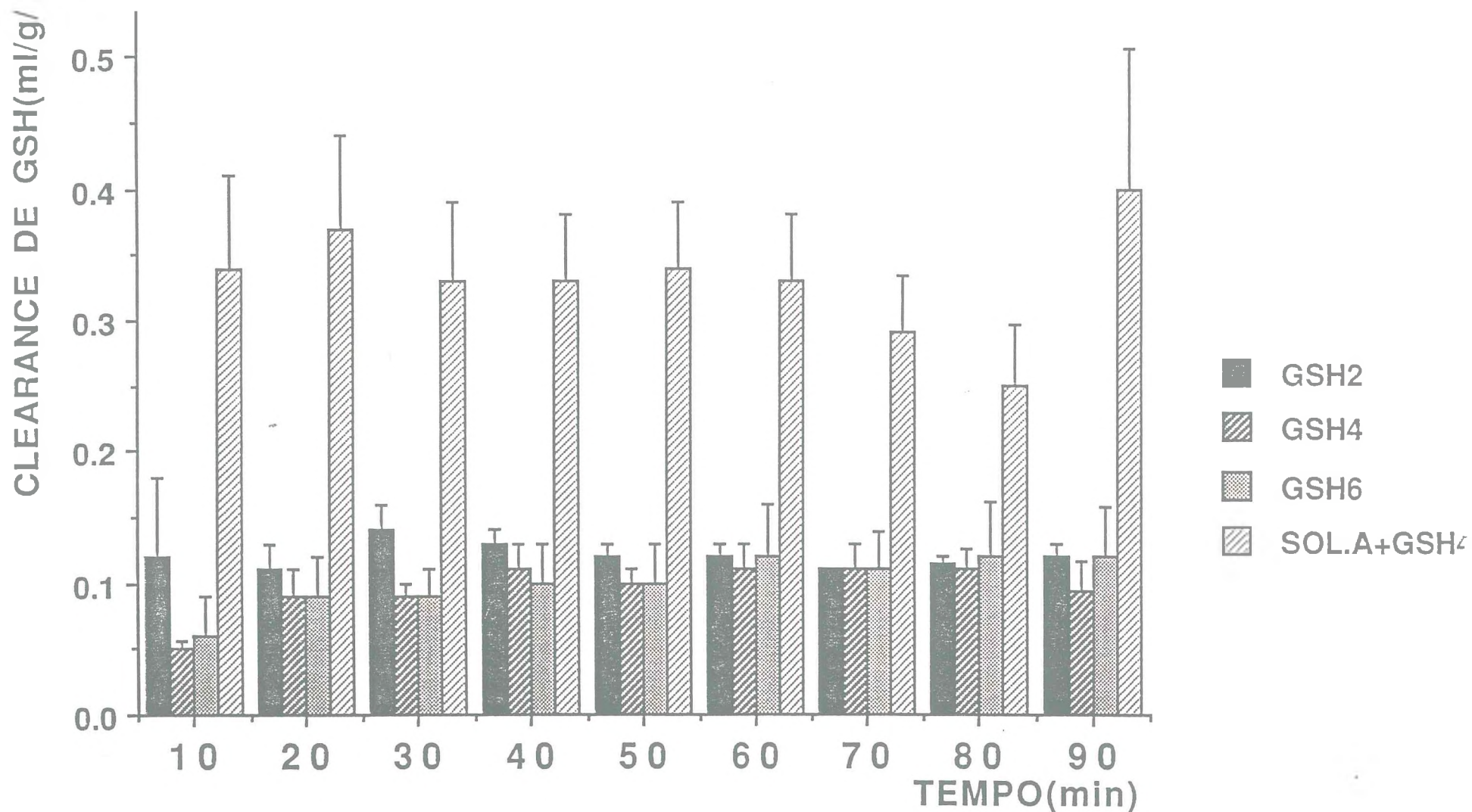


Figura 12A. Cinética do clearance de glutation de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

a) GSH0 é o grupo controle.

b) GSH2, GSH4 e GSH6 correspondem a adição de GSH em concentrações expressas em mM.

c) SOL.A é o grupo perfundido com Solução A.

d) SOL.A+GSH4 corresponde a adição de GSH.

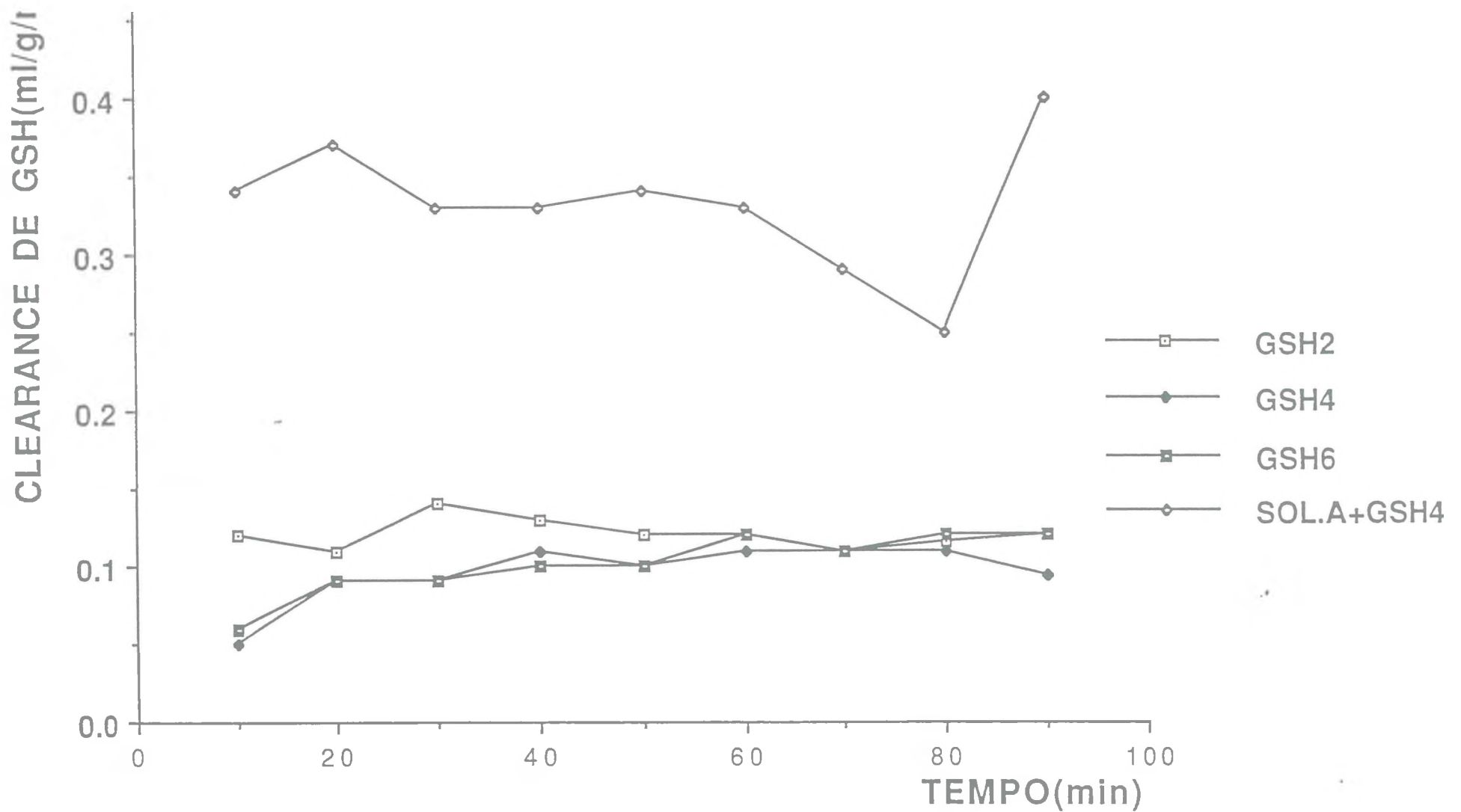


Figura 12B. Clearance de glutation de coelhos perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

a) GSH0 é o grupo controle.

b) GSH2, GSH4 e GSH6 correspondem a adição de GSH em concentrações expressas em mM.

c) SOL.A é o grupo perfundido com Solução A.

d) SOL.A+GSH4 corresponde a adição de GSH.

DETERMINAÇÃO DE ELETRÓLITOS INTRATISSULARES RENAIIS

Foram avaliadas as composições intratissulares dos rins direito e esquerdo, como meio de apreciar os efeitos induzidos na composição celular pelos dois tipos de soluções de preservação utilizadas e pelas variações da concentração de glutathion. Os rins direitos foram sempre usados como controle dos rins perfundidos.

Como pode ser visto na Figura 13, analisando o sódio intratissular renal, todos os rins perfundidos, exceto o grupo perfundido com Solução A(G5), apresentaram valores intratissulares de sódio ligeiramente maiores. Isto certamente reflete o edema desenvolvido pela perfusão. O grupo perfundido com Solução A(G5) é mostrado ser diferente pelo teste de Fisher do grupo perfundido com Solução de Krebs-Henseleit contendo 4 mM de GSH(G4) e do grupo perfundido com Solução A contendo 4 mM de GSH(G6).

Ao observar-se a Figura 14, pode-se comprovar que todos os rins perfundidos apresentaram uma tendência para a perda de potássio durante a perfusão, exceto o grupo perfundido com Solução A contendo 4 mM de glutathion(G6). Este grupo mostrou ser diferente estatisticamente dos outros grupos analisados($p = 0,007$).

Os valores percentuais de sódio do rim controle em relação ao perfundido encontram-se representados na Figura 15. É observado que o grupo perfundido com Solução A contendo 4 mM de GSH apresenta um ganho de sódio em relação aos outros grupos, sendo diferente pelo teste de Fisher do grupo perfundido com Solução A.

Os valores percentuais de potássio do rim controle em relação ao perfundido encontram-se representados na Figura 16. Pode-se comprovar que o grupo perfundido com Solução A contendo 4 mM de GSH apresenta um ganho de potássio importante em relação aos outros grupos estudados, sendo estatisticamente diferente dos outros grupos ($p = 0,001$).

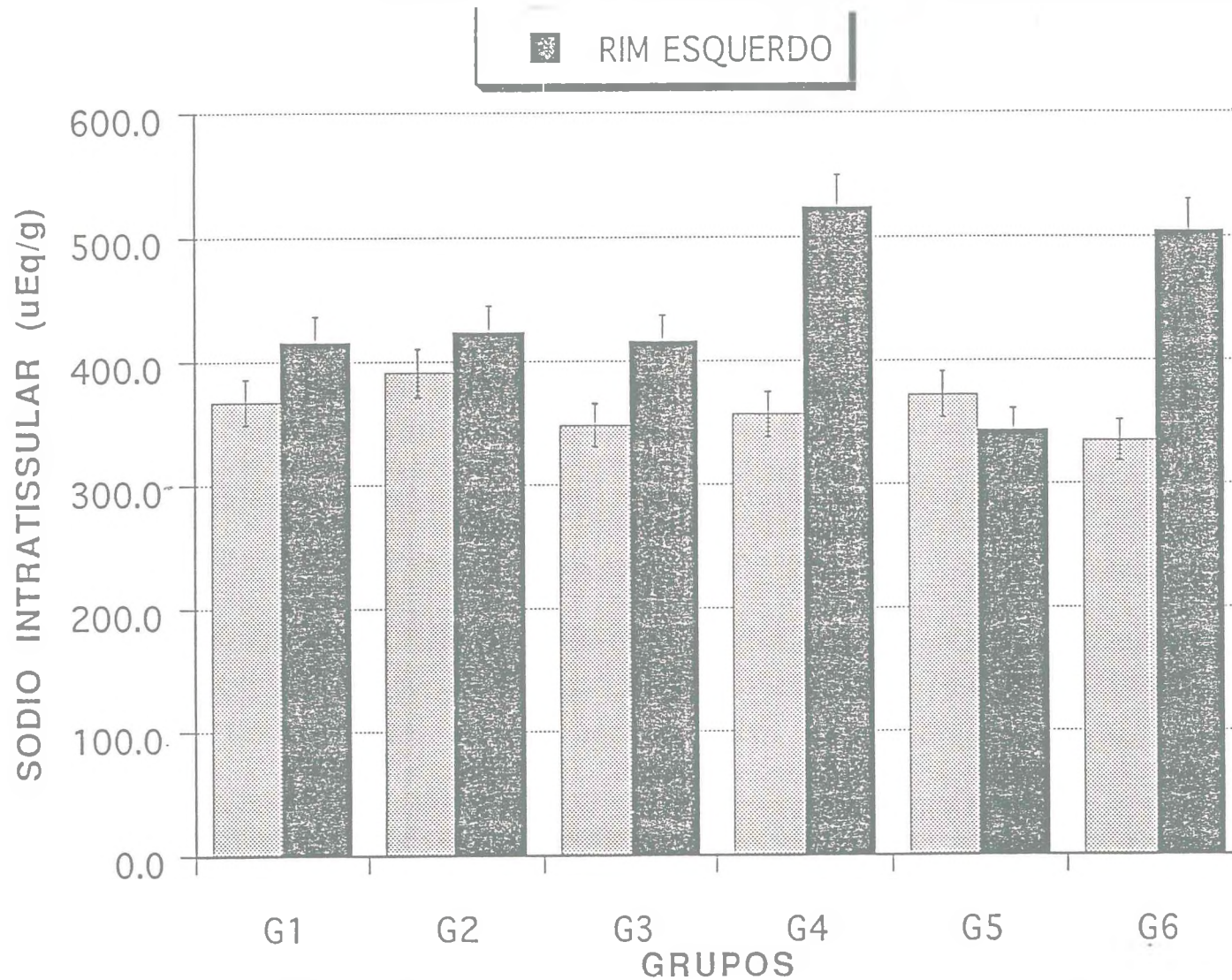


Figura 13. Composição de sódio intratissular de rins perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4% de albumina bovina.

a) G1 é o grupo controle.

b) G2, G3 e G4 correspondem a adição de GSH em concentrações de 2, 4 e 6 mM, respectivamente.

c) G5 é o grupo perfundido com Solução A.

d) G6 é o grupo que corresponde a adição de 4 mM de GSH.

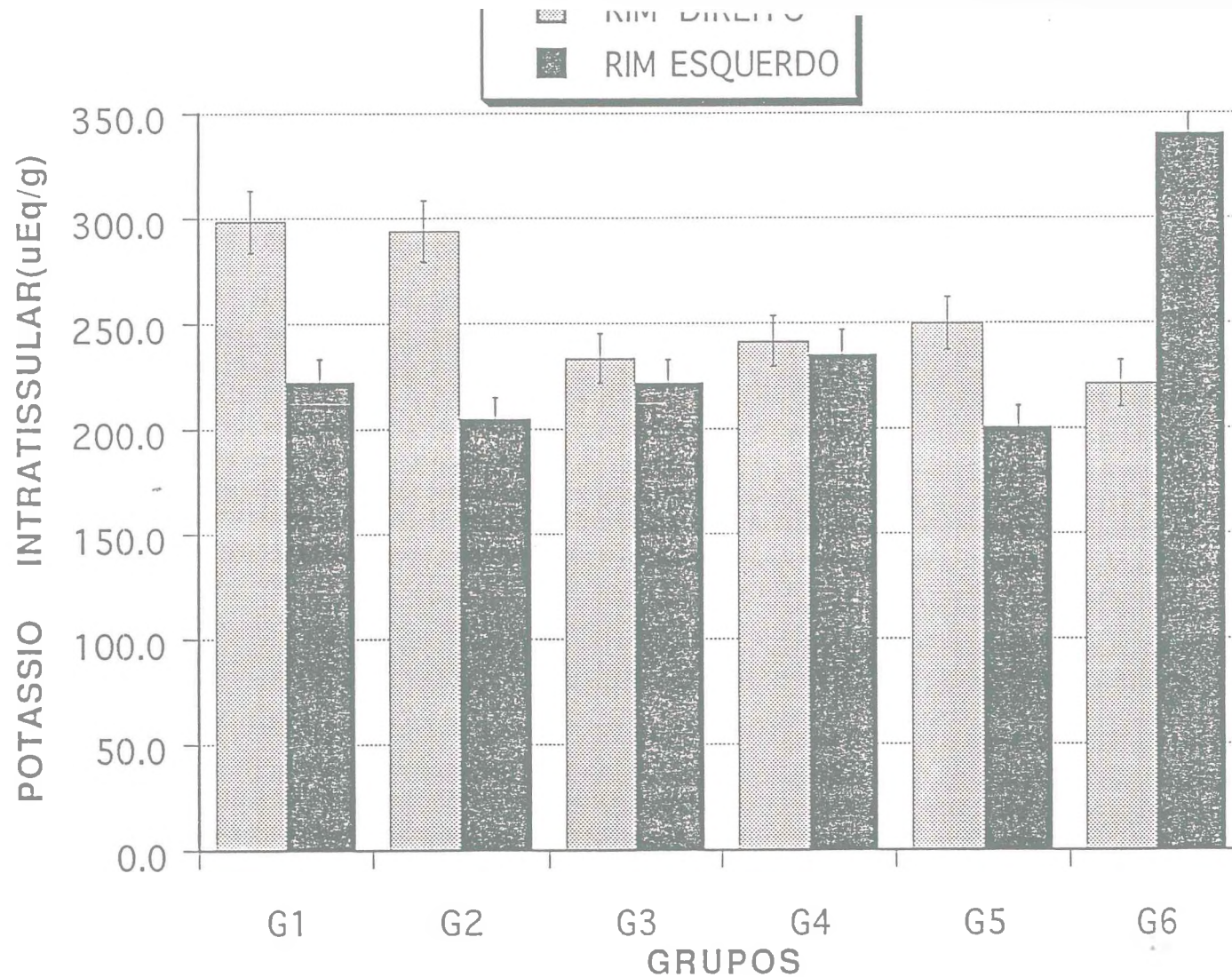


Figura 14. Composição de potássio intratissular de rins perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

a)G1 é o grupo controle.

b)G2, G3 e G4 correspondem a adição de GSH em concentrações de 2, 4 e 6 mM, respectivamente.

c)G5 é o grupo perfundido com Solução A.

d)G6 é o grupo que corresponde a adição de 4 mM de GSH.

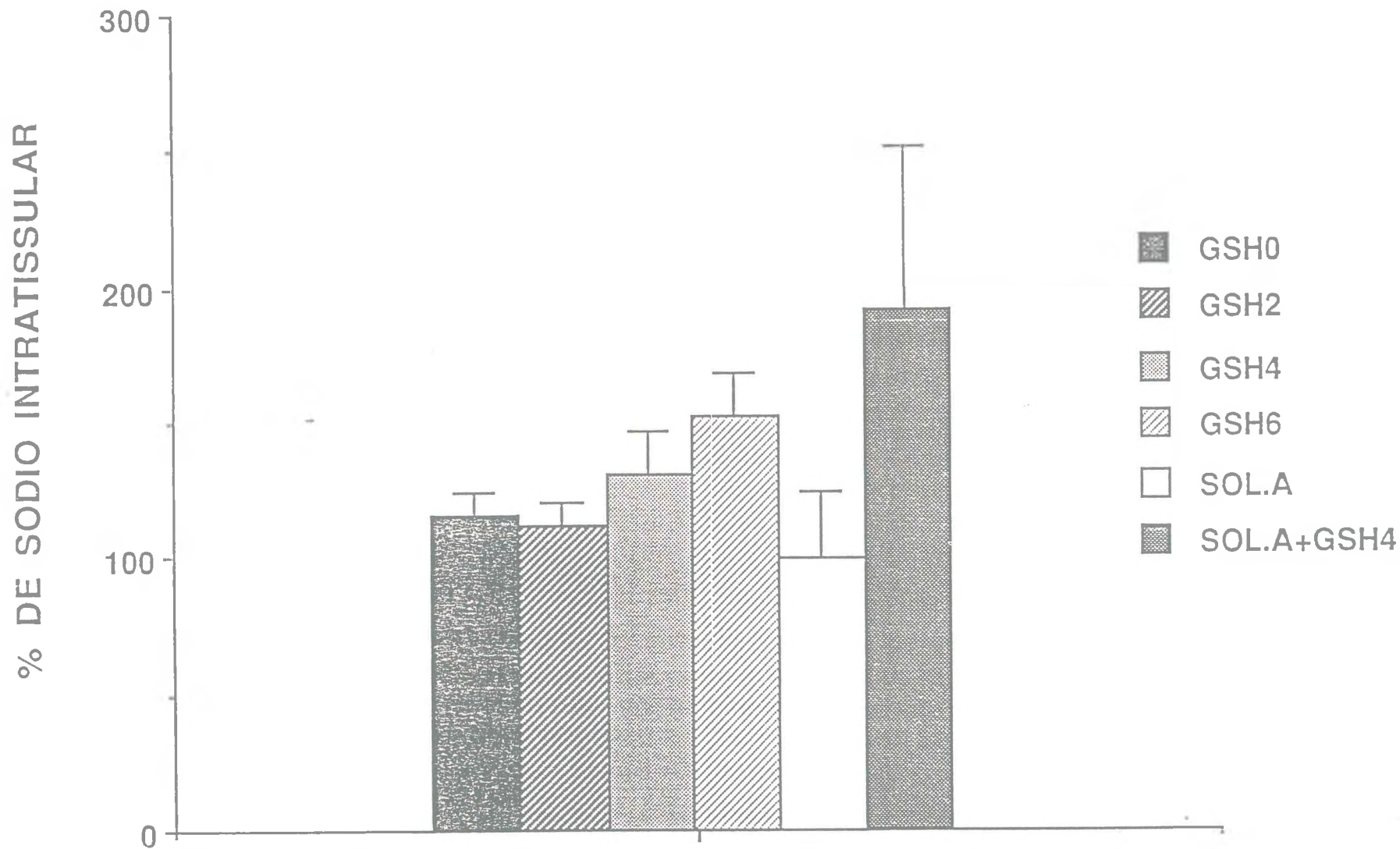


Figura 15. Percentuais de sódio de rins perfundidos em relação aos controles com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.
a)GSH0 é o grupo controle.
b)GSH2, GSH4 e GSH6 correspondem a adição de GSH em concentrações expressas em mM.
c)SOL.A é o grupo perfundido com Solução A.
d)SOL.A+GSH4 corresponde a adição de GSH.

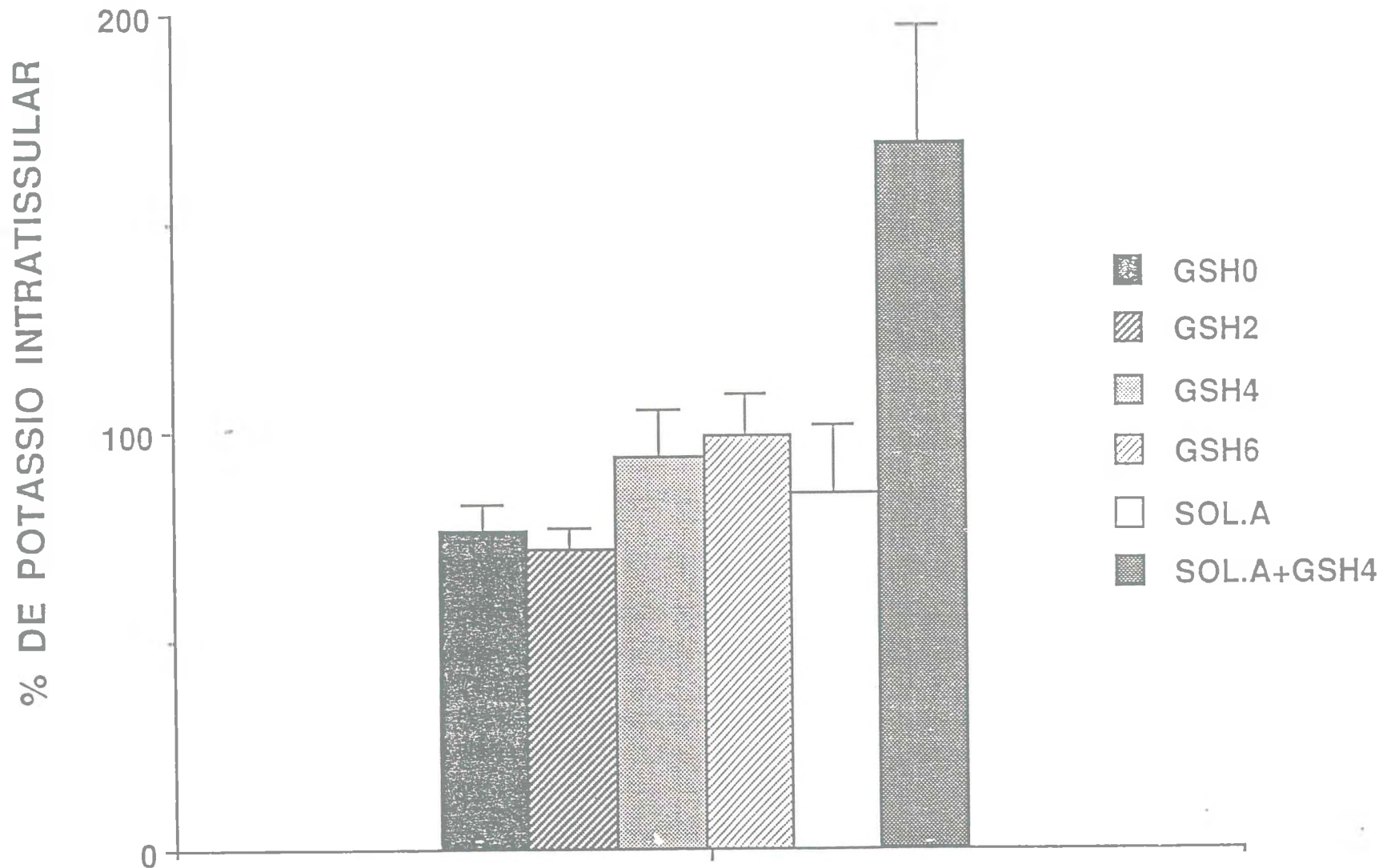


Figura 16. Percentuais de potássio de rins perfundidos em relação aos controles com Solução de Krebs-Henseleit e/ou Solução A contendo 4g% de albumina bovina.
a) GSH0 é o grupo controle.
b) GSH2, GSH4 e GSH6 correspondem a adição de GSH em concentrações expressas em mM.
c) SOL.A é o grupo perfundido com Solução A.
d) SOL.A+GSH4 corresponde a adição de GSH.

BALANÇO GLOMÉRULO-TUBULAR

Na Figura 17 está expressa a regressão linear de $(\text{TNa}^+) \times (\text{C}_{\text{IN}})$ do grupo perfundido somente com Solução de Krebs-Henseleit. Pode-se observar nesta figura que existe uma distribuição de pontos ao longo da reta formada, indicando um alto grau de correlação(0,95). A reta se aproxima da origem, cortando pela abscissa.

Na Figura 18 está expressa a regressão linear de $(\text{TNa}^+) \times (\text{C}_{\text{IN}})$ do grupo perfundido com Solução de Krebs-Henseleit contendo 2 mM de GSH. Pode-se observar nesta figura que existe uma distribuição de pontos ao longo da reta formada, indicando um alto grau de correlação(0,97). A reta se afasta da origem, cortando pela abscissa.

Na Figura 19 está expressa a regressão linear de $(\text{TNa}^+) \times (\text{C}_{\text{IN}})$ do grupo perfundido com Solução de Krebs-Henseleit contendo 4 mM de GSH. Pode-se observar nesta figura que existe uma distribuição de pontos ao longo da reta formada, indicando um alto grau de correlação(0,95). A reta se mantém afastada da origem, cortando pela ordenada.

Na Figura 20 está expressa a regressão linear de $(\text{TNa}^+) \times (\text{C}_{\text{IN}})$ do grupo perfundido com Solução de Krebs-Henseleit contendo 6 mM de GSH. Pode-se observar nesta figura que existe um alto grau de correlação linear(0,93). A reta se aproxima da origem, cortando pela ordenada.

Na Figura 21 está expressa a regressão linear de $(\text{TNa}^+) \times (\text{C}_{\text{IN}})$ do grupo perfundido com Solução A. Pode-se observar nesta figura que existe um baixo grau de correlação linear(0,55), embora a reta se aproxime muito da origem.

Na Figura 22 está expressa a regressão linear de $(TNa^+) \times (C_{IN})$ do grupo perfundido com Solução A contendo 4 mM de GSH. Pode-se observar nesta figura que com a adição do glutathione houve uma melhora do grau de correlação linear (0,80). A reta se aproxima da origem, cortando o eixo da abscissa.

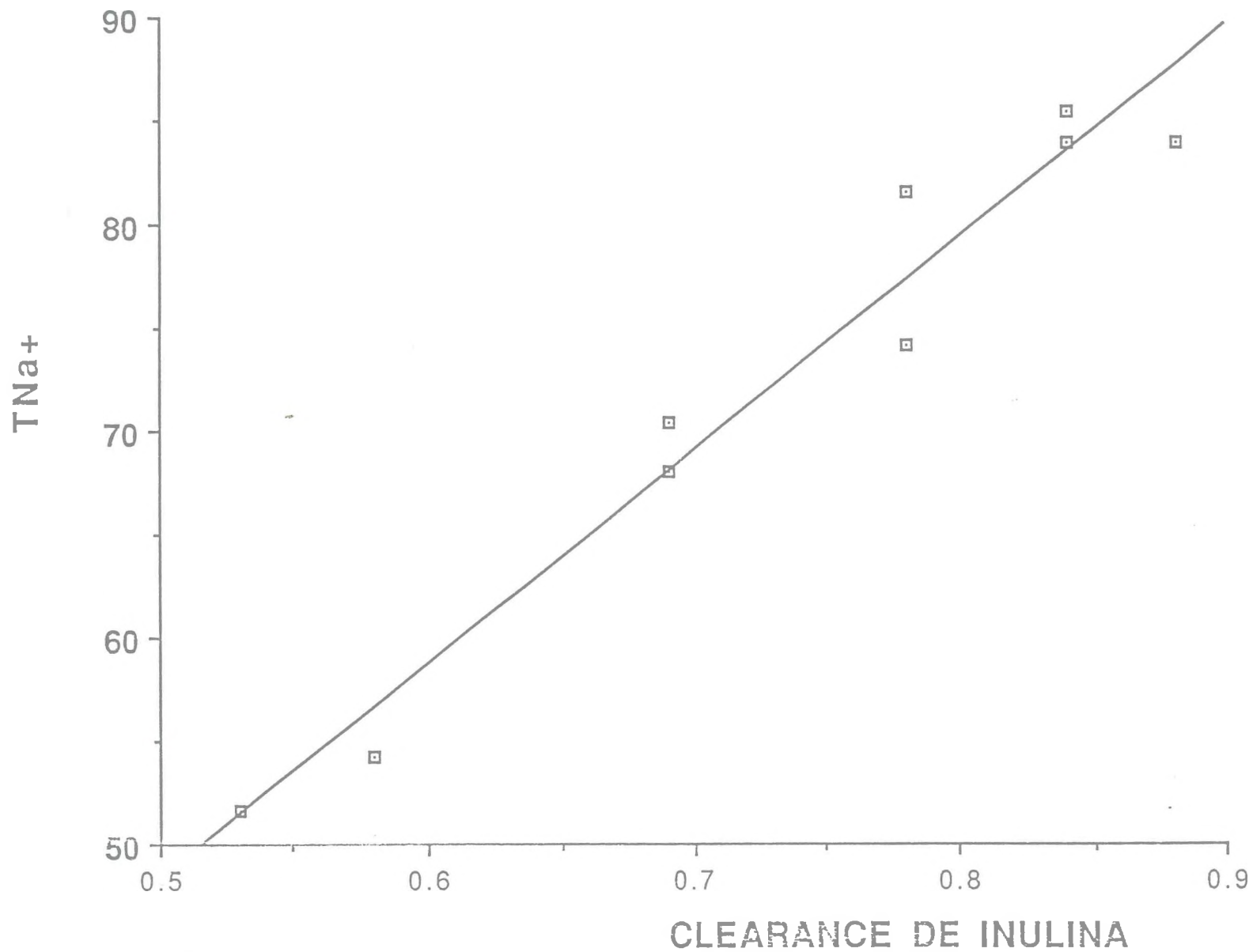


Figura 17. Regressão linear mostrando balanço glomerulo-tubular de rins perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit contendo somente 4g% de albumina bovina.

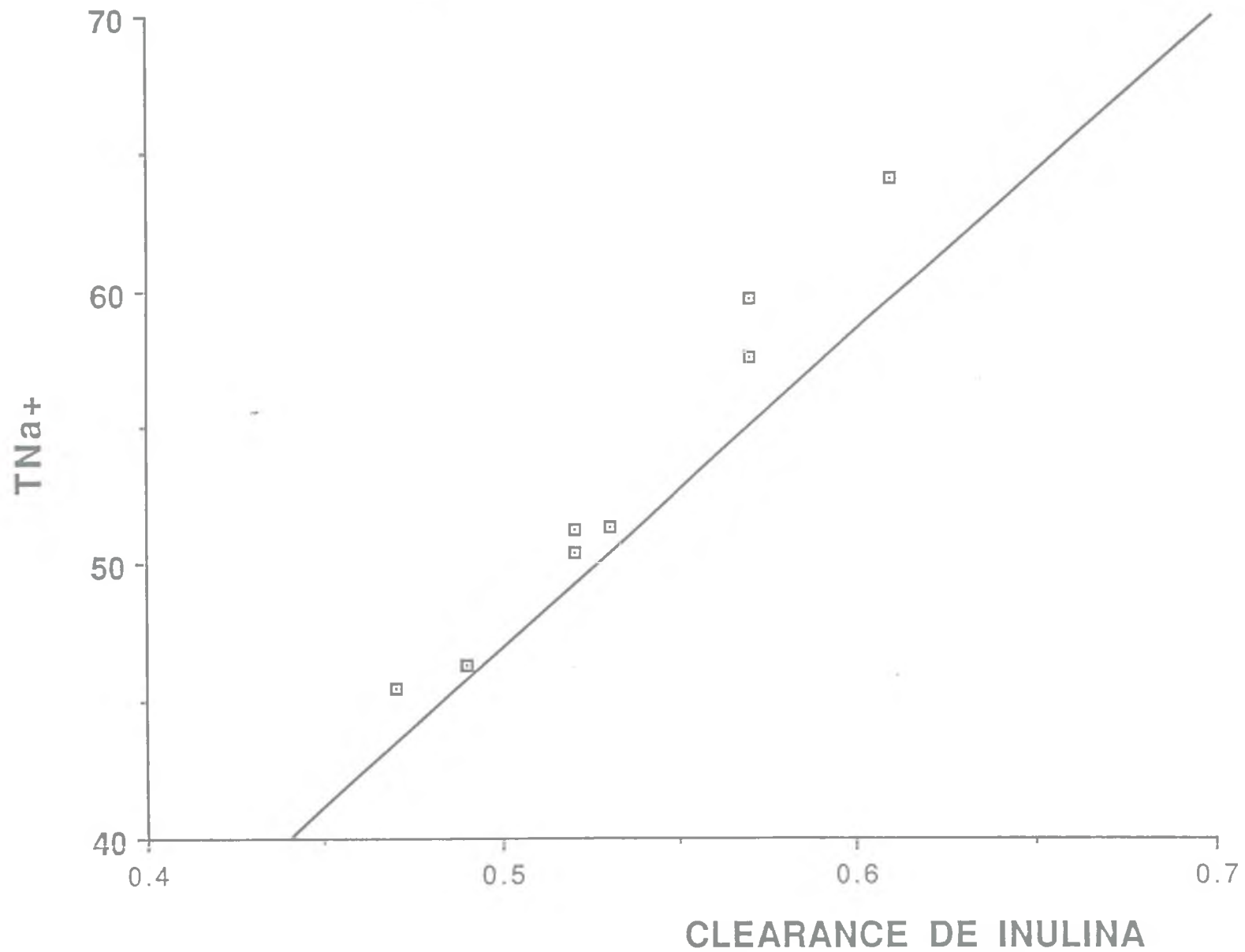


Figura 18. Regressão linear mostrando balanço glomerulo-tubular de rins perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit contendo 4g% de albumina bovina e 2 mM de GSH.

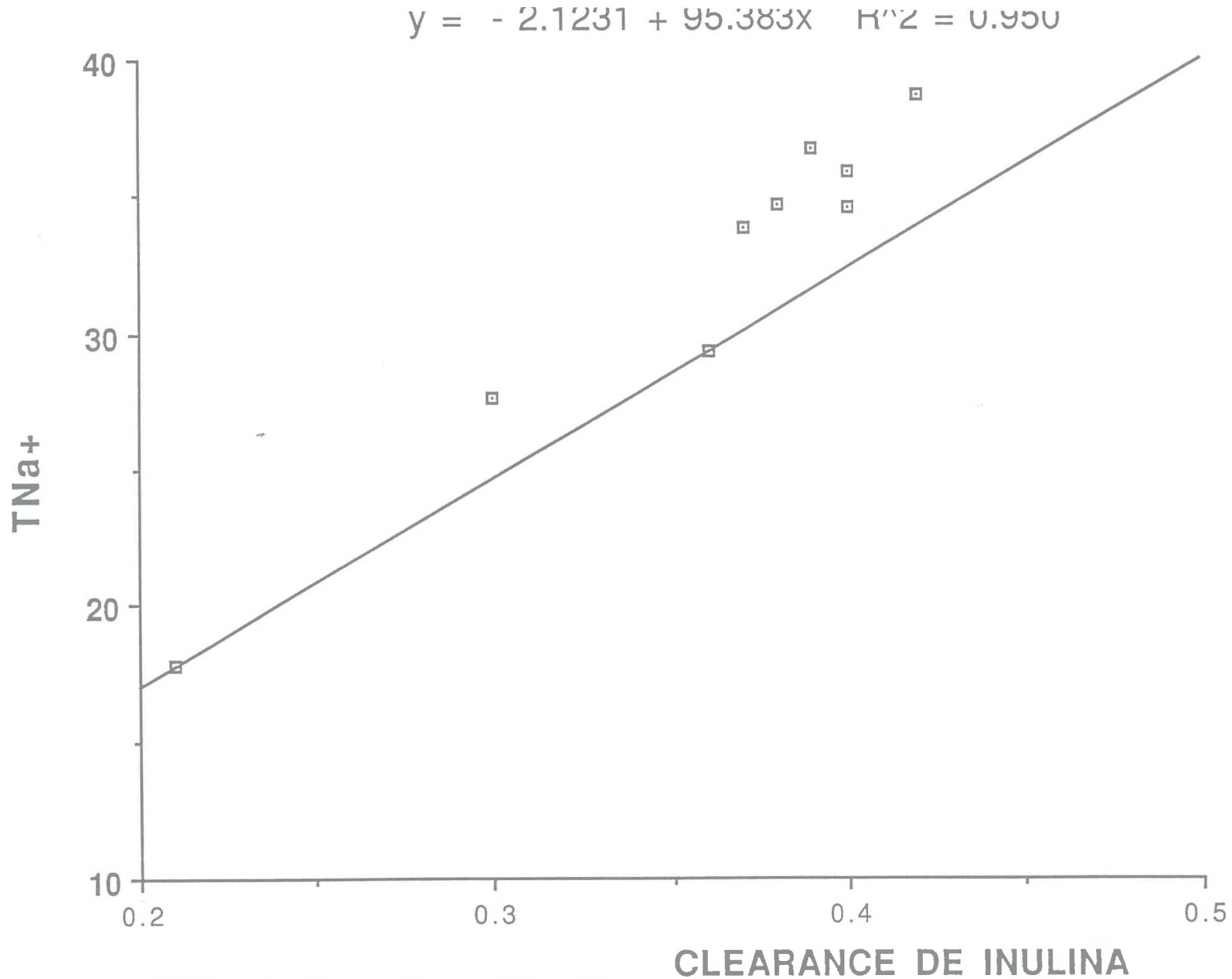


Figura 19. Regressão linear mostrando balanço glomerulo-tubular de rins perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit contendo 4g% de albumina bovina e 4 mM de GSH.

$$y = -7.4794 + 102.56x \quad R^2 = 0.931$$

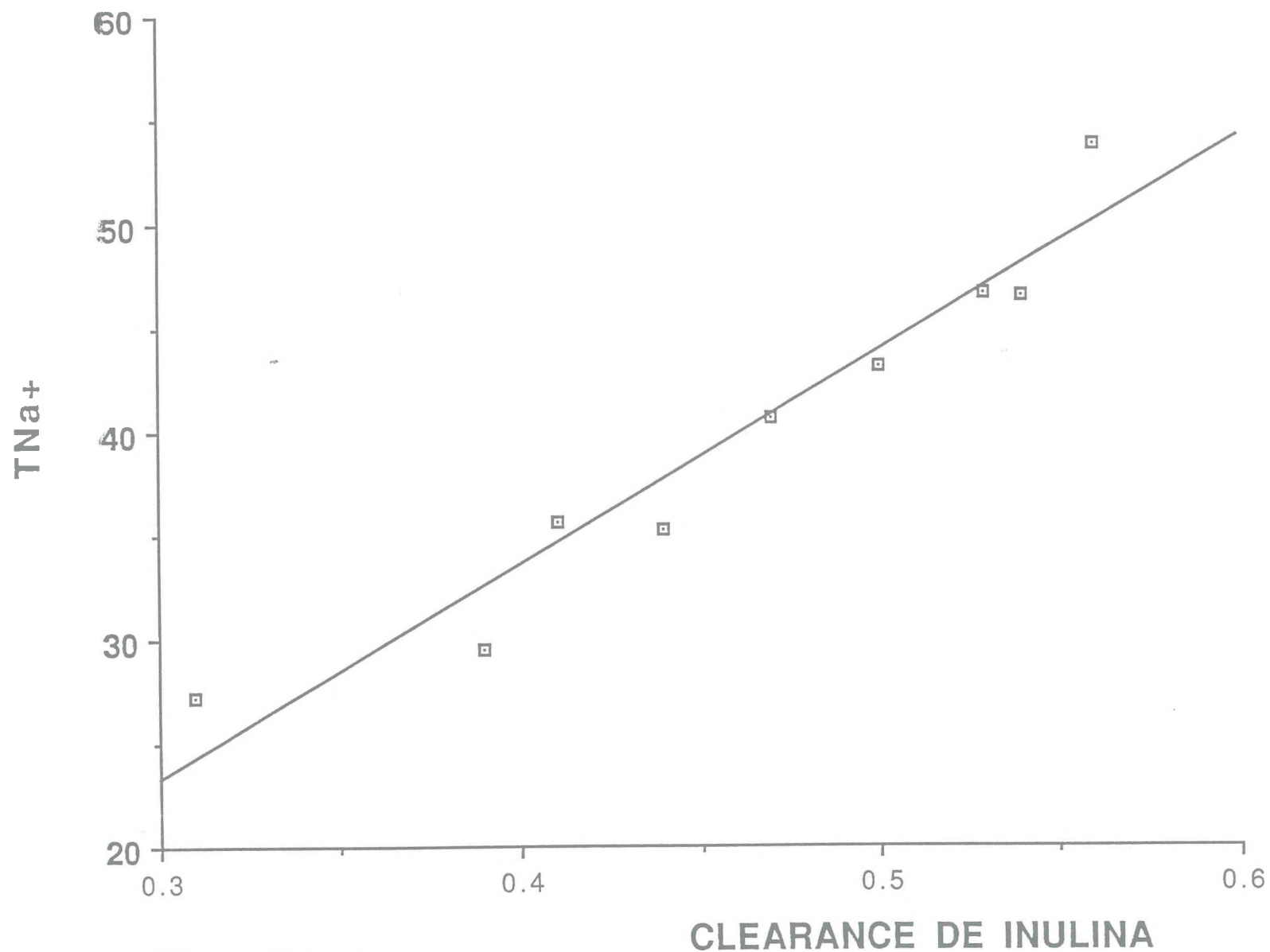


Figura 20. Regressão linear mostrando balanço glomerulo-tubular de rins perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit contendo 4g% de albumina bovina e 6 mM de GSH.

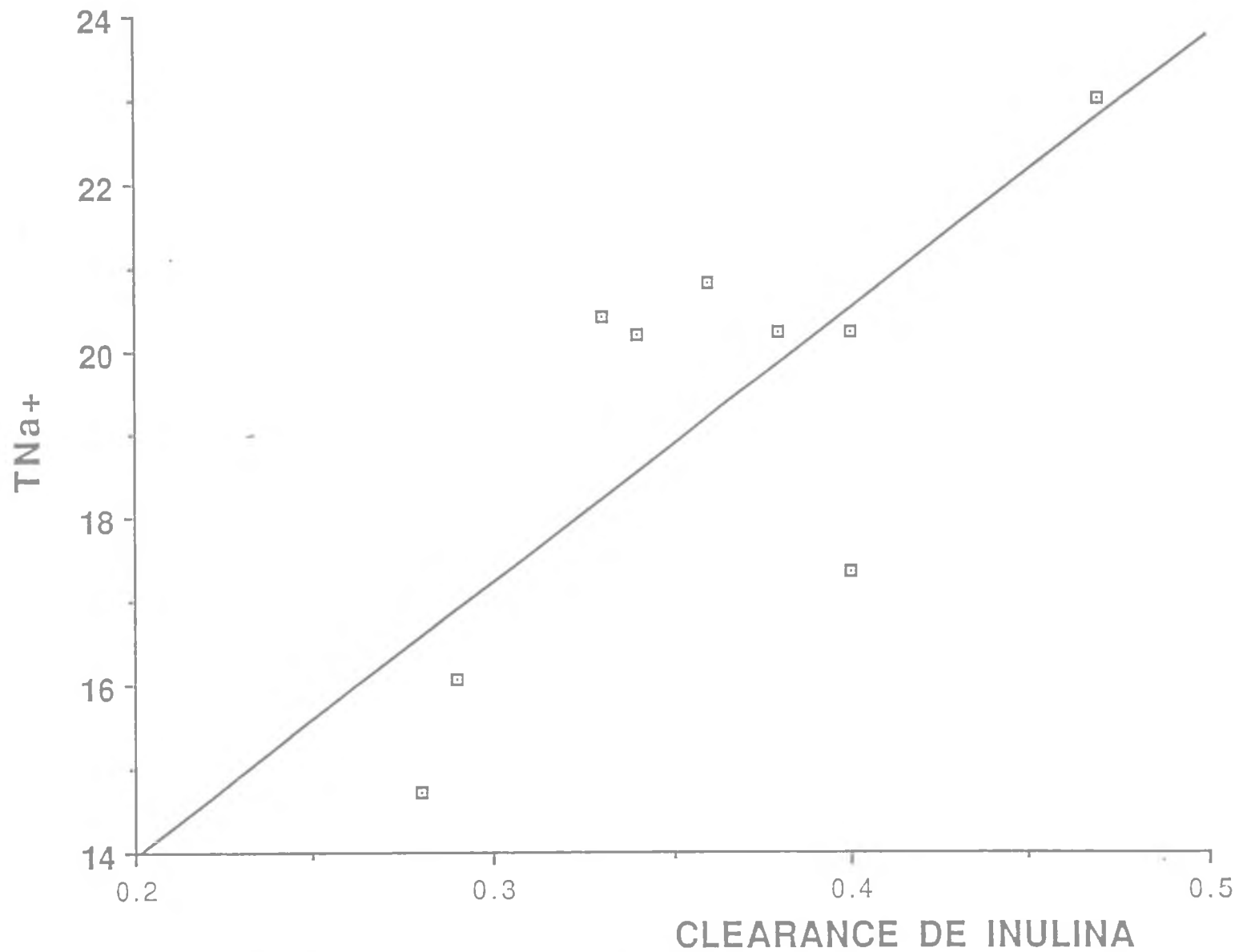


Figura 21. Regressão linear mostrando balanço glomerulo-tubular de rins perfundidos com Solução A contendo 4g% de albumina bovina.

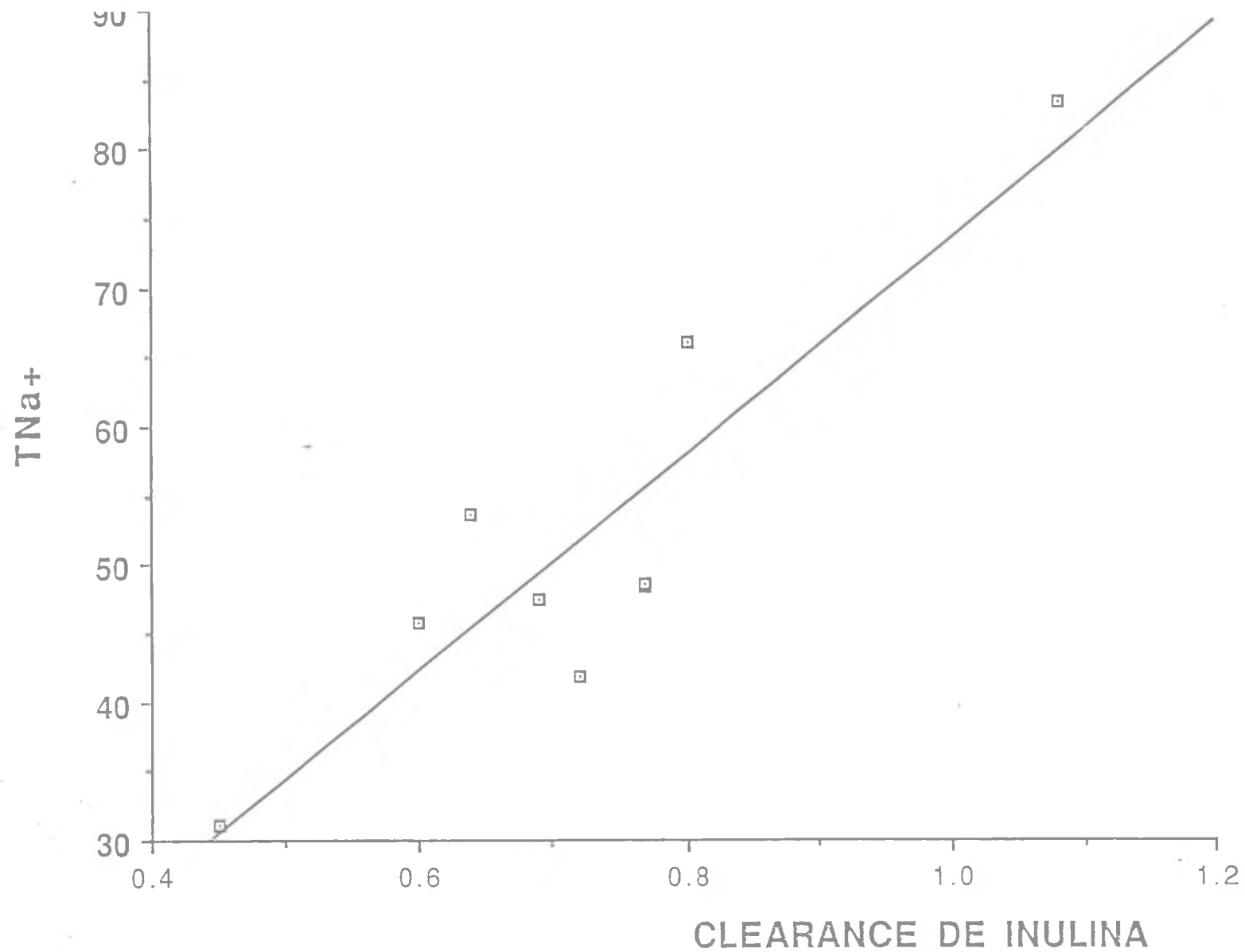


Figura 22. Regressão linear mostrando balanço glomerulo-tubular de rins perfundidos com Solução A contendo 4g% de albumina bovina e 4 mM de GSH.

DISCUSSÃO

O uso de soluções de preservação de composição intracelular tornou-se nos últimos anos uma regra, desde a proposta da solução de Collins e cols.(1972). Em 1973, Fonteles e cols. propuseram uma solução desta natureza, denominada Solução A. No presente trabalho, procurou-se comparar os efeitos de duas soluções de composição extra e intracelular, avaliando-se igualmente a participação de um adjuvante às propriedades destes perfusatos, no caso, o glutatión.

Inicialmente, testou-se os efeitos fisiológicos dos dois perfusatos, na tentativa de se avaliar os aspectos comparativos das duas soluções, uma vez que os únicos dados existentes na literatura, dizem respeito às observações de Fonteles e cols.(1973) e Jeske e cols.(1973) em que foram usados nessas investigações perfusão a baixo fluxo, e num deles, na ausência de colóide. As experiências aqui discutidas foram desenhadas com alto fluxo plasmático renal e na presença de 4g% de albumina bovina como colóide, previamente dialisada para eliminação de impurezas.

Observações com soluções do tipo Krebs foram desenvolvidas por vários autores, sobretudo no rim de rato(Nishiitsutsuji-Uwo e cols.,1967; Little e Cohen, 1974; Fonteles e cols., 1983). Por outro lado, o modelo do rim perfundido foi também usado por Marshall e cols. em 1978 para testes de isquemia renal com soluções de preservação, levando esses autores a concluir que o modelo era exequível para avaliação destas soluções. Esses autores mediram em rim de rato, os efeitos deletérios dos processos isquêmicos no transporte de sódio.

Na presente pesquisa, resolveu-se de maneira sistemática fazer uma avaliação funcional da Solução A(rica em potássio e magnésio), comparada à clássica Solução de Krebs, reconhecidamente de composição extracelular. Os dados fisiológicos obtidos na presente investigação com Solução de Krebs convalidam as observações de Moraes(1984), quando foram perfundidos rins de

coelhos com Solução de Krebs-Henseleit com diferentes concentrações de albumina.

Nesta pesquisa, utilizou-se a concentração de 4g% do colóide por permitir ao órgão um maior aporte renal de natureza distal, que se sobressai, principalmente, durante a primeira hora de perfusão, contendo valores maiores que os dados obtidos usando albumina a 6 e 8g%(Moraes, 1984). É evidente que outros colóides poderiam ter sido usados, a exemplo daquilo que foi observado por Fonteles e cols. em 1978, quando da perfusão e transplante de rins de cães com soluções contendo Dextran 70 e Haemaccel como colóide e Solução A como agente preservador.

Entretanto, a discussão do uso de Solução de Krebs em parâmetros funcionais se tornou importante nesta tese, sobretudo, quando se compara esses dados com os da Solução A. A este respeito, saliente-se que este perfusato(Solução A) apresentou maior fluxo renal do que aqueles dos rins perfundidos com Krebs. Isso leva a acreditar-se que o potássio ou o magnésio produzem uma vasodilatação renal, tornando-se desnecessário o uso de vasodilatadores preconizados por vários autores(Collins e cols., 1969; Pegg, 1971; Fonteles e cols., 1973; Pegg e cols., 1973; Sacks e cols., 1973; Collins e Halasz, 1977). Torna-se redundante o uso de agentes vasoativos num perfusato que por si mesmo já é vasodilatador. Entretanto, Fonteles e cols.(1973) verificaram que o isoxsuprine não produziu vasodilatação na presença de Solução A. Obviamente que isso levou a uma menor resistência no grupo perfundido com esta solução quando comparado com a de Krebs. Por outro lado, um efeito inverso, no ritmo de filtração glomerular foi demonstrado com Solução A, em que este parâmetro caiu visivelmente em relação ao grupo perfundido com Krebs. Isso naturalmente leva a uma menor taxa de reabsorção de sódio por representar uma diminuição da carga iônica filtrada.

Para reforçar estes achados, estudos anteriores mostraram o efeito da hipermagnesemia na reabsorção tubular proximal de sódio e água. DiBona em 1971 mostrou que a hipermagnesemia resultava em uma redução na reabsorção fracional e absoluta no túbulo proximal do rato. Um aumento na excreção fracional e absoluta de sódio, determinando, portanto, natriurese, foi vista somente quando o íon sulfato era utilizado. O efeito da hipermagnesemia não causou alterações no RFG do rato, embora esteja associado com queda de RFG no homem e no cão.

Não se verificou, entretanto, na presente pesquisa diferenças significativas entre as duas soluções no tocante à composição dos eletrólitos intra-tissulares renais. Isso significa que provavelmente esses rins estão metabolicamente balanceados, já que não houve perda parenquimatosa deste íon. De acordo com Merkens e cols. em 1978, a depleção potássica por perfusão ocorre sobretudo durante a ausência de substratos, sejam ácidos graxos ou lactato. A este propósito, Fonteles e cols. demonstraram que ácidos graxos do próprio tecido renal são capazes de manter as funções durante a perfusão, sem contudo controlarem a perda de potássio tecidual. Esses autores demonstraram também que a administração de lactato ou alfa-cetoglutarato ao perfusato era capaz de manter este íon de predominância intracelular dentro dos padrões de normalidade, ou seja, corrigindo assim a perda de 20-30% induzida pela ausência de substrato.

Outro ponto importante deste trabalho foi a tentativa de avaliação dos efeitos do GSH quando usado em perfusatos de composição intra e extracelular. Literatura anterior do grupo de Fonteles(Leibach e cols., 1974), demonstrou que durante a perfusão renal havia uma depleção de GSH do tecido renal. Em trabalho posterior que constituiu tese de livre docência(Fonteles, 1978), este autor demonstra que a administração de GSH ao perfusato corrige esta perda. Em publicação de 1976, desse mesmo grupo(Fonteles e cols., 1976) demonstrou-se

que o GSH era extraído do perfusato renal com grande eficiência. Entretanto, neste trabalho esses autores não fizeram uma avaliação de concentrações variadas do tripeptídeo, tendo sido utilizado uma concentração única de 3 mM em sistema aberto.

No nosso trabalho, diferimos, não só pela natureza das concentrações de GSH utilizadas, como também pelo sistema fechado aqui empregado. Daí se observam que diferentes concentrações de GSH correspondem a diferentes respostas fisiológicas, tanto no grupo tratado pela Solução de Krebs quanto naquele utilizando-se Solução A. Daí ter sido extremamente importante para o maior conhecimento dos efeitos do GSH, o teste sob essas condições experimentais, já que em todos os grupos comparados com a Solução A houve diferença estatística. Entretanto, um dos pontos mais importantes observados foi a diferença no fluxo plasmático renal em que o GSH produziu uma diminuição deste parâmetro. Saliente-se que Fonteles e cols., no seu trabalho anterior não puderam detectar este fato por terem usado uma dose de GSH fixa.

Nos resultados desta tese, o aumento crescente na concentração de GSH adicionado ao perfusato causou um aumento da resistência vascular renal, com conseqüente diminuição do fluxo plasmático. Estes achados são compatíveis com o fato de que o glutathione tem um papel na inativação de um número de drogas e no processo metabólico de certos compostos endógenos, tais como estrógenos, prostaglandinas e leucotrienos, levando a uma síntese diminuída de PGE₂ e leucotrieno C naqueles casos onde ocorre depleção deste tripeptídeo (Meister, 1981, 1983 e 1984; Meister e Anderson, 1983).

Sabe-se que a PGE₂ tem ação vasodilatadora e o leucotrieno C tem ação vasoconstrictora e possivelmente nos grupos aqui perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit com concentrações crescentes de GSH e mesmo no grupo perfundido com perfusato de composição intracelular onde foi adicionado 4 mM

de GSH deve ter havido uma predominância da ação vasoconstrictora do leucotrieno C e por este motivo ocorreu um aumento na resistência vascular renal que aumentou à medida que a concentração de GSH adicionada foi sendo aumentada, determinando também um efeito responsivo no fluxo plasmático renal. Ademais, Brezis e cols.(1983) confirmaram que a depleção de GSH no rim perfundido do rato tratado por d-l-buthionina-SR-sulfoxamina, um inibidor específico da gamaglutamilcisteína sintetase, promove uma queda substancial da capacidade renal de reabsorção de sódio. Já nos nossos resultados não detectamos maiores efeitos na fração reabsorvida de sódio com aumento da concentração do GSH, mas, por outro lado, também não fizemos estudos sob depleção.

Já no tocante ao ritmo de filtração glomerular, a adição do GSH à Solução de Krebs-Henseleit, embora aparentemente tenha causado uma queda da filtração glomerular, à medida que o GSH aumentava no perfusato, a análise estatística por estudo da variância demonstrou, entretanto, que nenhuma das concentrações alteraram este parâmetro. Daí ter-se escolhido a dose média de GSH, ou seja, 4 mM para teste no grupo perfundido com Solução A. Estes rins, talvez pela própria composição do perfusato que é rico em potássio e magnésio e pobre em sódio, apresentaram níveis de transporte de sódio, significativamente mais baixos que os dos rins perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit. Deste modo, a adição de 4 mM de GSH ao perfusato(Solução A) melhorou consideravelmente a capacidade de transporte tubular, fato não observado anteriormente por Fonteles e cols.(1976), ao perfundirem rins de coelhos na ausência de colóide. Certamente que a omissão da albumina deve ter sido a maior responsável por este achado naquela publicação, já que o transporte de sódio aqui observado é diferente de todos os rins perfundidos com Solução de Krebs, com e sem glutathion.

A necessidade de GSH no meio de incubação de células renais frescas, com o propósito de torná-las viáveis bioquimicamente, constituiu-se uma das observações de Ormstad e cols.(1980). Os autores também concluem da importância deste fator para o funcionamento do ciclo do gama glutamato em células renais. O ciclo do gama glutamato é um fator importante no transporte de aminoácidos pelos rins(Meister, 1982), funcionando o tripeptídeo também como um forte fator antioxidante. Por conseguinte, sendo o rim perfundido um sistema de alta relevância para o transporte de diversos aminoácidos e pequenos peptídios, é extremamente importante o uso deste composto nesta preparação.

O uso do GSH exógeno protege também as células endoteliais contra a toxidez de vários compostos do tipo xenobióticos(Rankin e cols., 1985). Portanto, a idéia de empregar GSH como aditivo aos dois perfusatos tem fundamentação fisiológica e biológica. A este propósito, o grupo de Belzer (Vreugdenhil e cols., 1990) recentemente confirmou os dados de Fonteles e cols. sobre a depleção de GSH em órgãos submetidos a tratamento preservador e nesta publicação é recomendado o uso de GSH nestas soluções. A adição de GSH também apresentou significantes mudanças no transporte de potássio, tornando-o mais eficiente do que os controles perfundidos com Solução A. Igualmente, enquanto o GSH não apresentou efeitos na fração reabsorvida de sódio, quando da perfusão dos rins com Solução de Krebs, o peptídeo promoveu depressão do transporte de potássio reabsorvido neste grupo; já os rins perfundidos com Solução A, melhoraram a taxa de reabsorção tanto do sódio como do potássio. Isso pode se dever em parte à maior formação de substratos de interesse para a economia renal. A este propósito, Fonteles e Leibach, demonstraram em 1982 a formação de glicose no rim perfundido do rato quando esses autores usaram GSH como único substrato. Portanto, é possível que o próprio GSH através dos seus aminoácidos componentes produza substratos endógenos importantes como

geradores de ATP para a função de transporte, por interconversão metabólica. Assim o GSH poderia melhorar o transporte em relação à Solução A. Mas, como justificar a sua ausência de efeitos na solução de composição extracelular. Uma hipótese poderia ser constituída a partir do fato de que os 40 mM de potássio da solução contribuiriam para a desestabilização elétrica do túbulo renal que por sua vez prejudicaria o transporte de sódio. Este mecanismo envolveria o consumo de energia que seria subtraído daquilo que foi expendido pela troca de sódio e potássio através da bomba. O emprego do GSH tenderia a repetir esse processo por ser um doador de substrato energético para o transporte; isso seria mais visível no túbulo despolarizado aonde o transporte é menor e há, portanto, espaço para crescer. Sabemos que a concentração luminal de potássio relaciona-se também ao fluxo(Wright, 1981).

Quanto às regressões lineares entre TNa^+ e C_{IN} de ambos os grupos, percebemos claramente que o glutathion interfere com o balanço glomérulo-tubular, sobretudo nos rins perfundidos com Solução A, aonde nitidamente o néfron está fora de balanço que é recuperado pela adição do GSH.

CONCLUSÕES

Utilizando-se um modelo de perfusão de rim isolado de coelhos, analisou-se dois modelos de Solução de preservação renal, uma de composição intracelular, rica em potássio e magnésio(Solução A) e outra de composição semelhante ao plasma(Solução de Krebs-Henseleit). Nestes perfusatos, os efeitos do GSH nas concentrações de 2, 4 e 6 mM na Solução de Krebs-Henseleit e uma concentração média de GSH(4 mM) na Solução A permitiram concluir os seguintes achados:

A)Os rins perfundidos com Solução de Krebs-Henseleit apresentaram menores fluxos de perfusão renal em relação aos perfundidos com Solução A. Já o inverso aconteceu ao analisar-se a resistência vascular, quando o grupo perfundido com Krebs-Henseleit apresentou maior resistência. Analisando-se o clearance de inulina, observou-se maiores clearances com o grupo perfundido com Krebs-Henseleit , sendo bem superior ao grupo perfundido com Solução A. Analisando-se a fração reabsorvida de sódio, verificou-se que este parâmetro é bem superior no grupo perfundido com Krebs-Henseleit e este fato também aconteceu com o clearance de água livre.

B)Ao adicionar-se as concentrações de GSH à Solução de Krebs-Henseleit foi demonstrado que à medida que é aumentada a concentração deste tripeptídio, o fluxo de perfusato diminui, enquanto a resistência aumenta. No tocante ao clearance de inulina, a mudança nas concentrações não alterou este parâmetro e o mesmo fato aconteceu com relação a fração de sódio reabsorvida. O GSH também causou uma perda de potássio significativa pelo néfron, nesta preparação.

C)Ao adicionar-se 4 mM de GSH à Solução A, observou-se que houve uma queda no fluxo de perfusato em relação à Solução A sem adição de substrato e também um aumento na resistência vascular. Houve um aumento no clearance de inulina com a adição do GSH, embora não significativa. Com relação à fração de sódio reabsorvida houve um aumento substancial e significativo com a adição do tripeptídeo. Outro achado importante foi que o GSH aumentou a reabsorção de potássio e o clearance osmolar.

Como conclusão final observamos que a adição de GSH aos perfusatos estudados teve o seu maior benefício na solução de composição intracelular(Solução A), com nítidos efeitos na função renal.

BIBLIOGRAFIA

REFERÊNCIAS

BELZER, F.O.; ASHBY, B.S.; HUANG, J.S.; DUNPHY, J.E. Etiology of rising perfusion pressure in isolated organ perfusion. Ann. Surg. 168(3):382-390, 1968.

BENJAMIN, J.L.; SELL, W. Assessment of renal function during isolated in vitro perfusion. Transplantation Proceedings. 3(1):616-618, 1971.

BERKOWITZ, H.D.; MILLER, L.D.; ITSKOVITZ, H.D.; BOVÉE, K.C. Renal function in the isolated perfused kidney. Surg. Gynec.Obstet. 127:1257-1266, 1968.

BOMZON, A.; NAIDU, S.G. Perfusion of the isolated rat hind limb. Journal of pharmacological methods. 14:285-296, 1985.

BREZIS, M.; ROSEN, S.; SILVA, P.; EPSTEIN, F.H. Selective glutathione depletion on function and structure of the isolated perfused rat kidney. Kidney International. 24:178-184, 1983.

BRUNIUS, V.; FRITJOFSSON, A.; GELIN, L.E. Microcirculatory aspects on the preservation of kidneys for transplantation. 4th Europ. Conf. Microcirculation. Bibl. anat., 9:374-380, 1966.

BUTTERWORTH, M.; UPSHALL, D.G.; HOBBS, M.; COHEN, G.M. Elevation of cysteine and replenishment of glutathione in rat lung slices precursors. Biochemical Pharmacology. 45(9):1769-1774, 1993.

CHANG, M.; SHI, M.; FORMAN, H.J. Exogenous glutathione protects endothelial cells from menadione toxicity. Am. J. Physiol.(Lung cell. Mol. Physiol.) (6): L637-L643, 1992.

COLLINS, G.M., BRAVO-SHUGARMAN, M., TERASAKI, P.I. Kidney preservation for transportation. The Lancet. 2:1219-1222, 1969.

COLLINS, G.M., HALASZ, N.A. Current aspects of renal preservation. Supplement to Urology. 10(1):1977.

CUYPERS, Y.; NIZET, A.; BAERTEN, A. Technique pour la perfusion de reins isolés de chien avec du sang hépariné. Arch. Internat. Physiol. Bioch. 72(2):245-255, 1964.

DiBONA, G.F. Effect of hypermagnesemia on renal tubular sodium handling in the rat. American Journal of Physiology. 221(1):53-57, 1971.

FONTELES, M.C., JESKE, A.H., KAROW, Jr.A.M. Blockade of vasoconstriction by isoxsuprine(vasodilatan) in the isolated perfused rabbit kidney. Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology. 5(2):333-344, 1973.

FONTELES, M.C., JESKE, A.H., KAROW, JR.A.M. Functional preservation of the mammalian kidney. Journal of Surgical Research. 14:7-15, 1973.

FONTELES, M.C.; PILLION, D.J.; JESKE, A.H.; LEIBACH, F.H. Extraction of glutathione by the isolated perfused rabbit kidney. J.Surg. Res. 21:169-174, 1976.

FONTELES, M.C., MACHADO, A.L., CAMPOS, A.B., MARQUES, R.B. Um estudo do dextran e do haemacel na preservação renal através de perfusão simples e reimplante. Rev. Med. Univ. Fed. Ceará. 17/18:65-70, 1977/1978.

FONTELES, M.C. Efeitos do glutathione em alguns parâmetros da preservação renal. Tese de Livre Docência de Farmacologia Médica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará . Fortaleza, 1978.

FONTELES, M.C., LEIBACH, F.H. Glucose formation from glutathione in the isolated perfused rat kidney. Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie. 90:159-161, 1982.

FONTELES, M.C., COHEN, J.J., BLACK, A.J., WERTHEIM, S.J. Support of kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. Am. J. Physiol. 244(Renal fluid electrolyte Physiol. 13):F235-F246, 1983.

GRIFFITH, O.W.; BRIDGES, R.J.; MEISTER, A. Transport of gamma glutamyl amino acids: role of glutathione and gamma-glutamyl transpeptidase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76(12):6319-6322, 1979.

HAGEN, T.M.; WIERZBICKA, G.T.; BOWMAN, B.B. Fate of dietary glutathione: disposition in the gastrointestinal tract. Am. J. Physiol. 259(Gastrointest. Liver Physiol. 22):G530-G535, 1990.

HENDRY, W.F.; NABSETH, D.C.; LADAGA, L.G.; McLEUD, D. The circulatory behavior of isolated and preserved canine kidneys. Surgical Research. 5(7):287-295, 1965.

JACOBSEN, I.A.; PEGG, D.E.; STARKLINT, H.; BARFORT, P.; DIAPER, M.P. Hypothermic preservation of rabbit kidneys for 48 hours using low ionic strength solutions. Cryobiology. 27:423-429, 1990.

JESKE, A.H., FONTELES, M.C., KAROW, JR. Functional preservation of the mammalian kidney. II.Ultrastructure with low flow perfusion at normothermia. Journal of Surgical Research . 15:4-13, 1973.

JONES, D.P.; SUNDBY, G.; ORMSTAD, K.; ORRENIUS, S. Use of isolated kidney cells for study of drug metabolism. Biochemical Pharmacology. 28:929-935, 1979.

KANE, J.F.; EDWARDS, E.C. Renal vascular shutdown during perfusion of isolated kidney. Brit. J. Urology. 38:664-672, 1966.

KREBS, H.A.; HENSELEIT, K. Untersuchungen uber die harnstoffbildung im tierkorper. Z. Physiol. Chem. 210:33-66, 1932.

LASH, L.H.; JONES, D.P. Renal glutathione transport. The journal of biological chemistry. 259(23):14508-14514, 1984.

LASH, L.H.; HAGEN, T.M.; JONES, D.P. Exogenous glutathione protects intestinal epithelial cells from oxidative injury. Biochemistry. 83:4641-4645, 1986.

LEIBACH, F.H.; FONTELES, M.C.; PILLION, D.; KAROW, A.M. Glutathione in the isolated perfused rabbit kidney. J. Surg. Res. 17:228-231, 1974.

LITTLE, J.R.; COHEN, J.J. Effect of albumin concentration on function of isolated perfused rat kidney. American Journal of Physiology. 226(3):512-517, 1974.

MAK, I.T.; BOEHME, P.; WEGLIICKI, W.B. Antioxidant effects of calcium channel blockers against free radical injury in endothelial cells. Correlation of protection with preservation of glutathione levels. Circulation Research. 70(6):1099-1103, 1992.

MALININ, T.I.; HOLLERMAN, C.E. Evaluation of renal function in perfused rabbit kidneys. Journal of Surgical Research. 12:204-207, 1972.

MARSHALL, V., ROSS, B., BISHOP, M., MORRIS, P. Evaluation of renal preservation using the isolated perfused rat kidney. Transplantation. 26(5):315-318, 1978.

MARSHALL, V.C. Renal Preservation. Kidney Transplantation. 129-157, 1984.

MEISTER, A. Roles and functions of glutathione. Biochemical Society Transactions. Joint Colloquium : metabolism and function of glutathione. Organized and edited on behalf of the Pharmacological Biochemistry Group/Regulation in Metabolism Group by G.M. Cohen(London) and R. B. Freedman(Kent).78-79, 1982.

MEISTER, A. Metabolism and functions of glutathione. Trends Biochem. Sci. 6(9):231-234, 1981.

MEISTER, A. Selective modification of glutathione metabolism. Science. 220:472-476, 1983.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. Ann. Rev. Biochem. 52:711-760, 1983.

MEISTER, A. New aspects of glutathione biochemistry and transport: selective alteration of glutathione metabolism. Federation Proceedings. 43(15):3031-3042, 1984.

MELLO, G.; MAACK, T. Nephron function of the isolated perfused rat kidney. Am. J. Physiol. 231(6):1699:1707, 1976.

MERKENS, L.S., COHEN, J.J., PETERSON, O.W. Tissue K⁺ loss from the perfused rat kidney: effects of lactate and albumin treatment. Am. J. Physiol.

253(3): F228-F233, 1978 or *Am. J. Physiol.: Renal fluid electrolyte Physiol.* 4(3): F228-F233, 1978.

MESSANA, J.M.; CIESLINSKI, D.A.; O'CONNOR, R.P.; HUMES, H.D. Glutathione protects against exogenous oxidant injury to rabbit renal proximal tubules. *Am. J. Physiol.* 255(Renal Fluid Electrolyte Physiol. 24):F874-F884, 1988.

MORAES, M.E.A. Perfusão do rim isolado de coelhos: estudo comparativo de aminoglicosídeos. *Tese de Mestrado*. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 1984.

NISHIITSUTSUJI-UWO, J.M., ROSS, B.D., KREBS, H.A. Metabolic activities of the isolated perfused rat kidney. *Biochemical Journal*. 108:852-862, 1967.

NIZET, A.; CUYPERS, Y.; DEETJEN, P.; KRAMER, K. Functional capacity of the isolated perfused dog kidney. *Pflugers Archiv*. 296:179-195, 1967.

NIZET, A. The isolated perfused kidney: possibilities, limitations and results. *Kidney International*. 7:1-11, 1975.

NUTT, M.P.; FIELDS, B.L.; SEBREE, L.A.; SOUTHARD, J.H.; PYZALSKA, D.; PYZOLSKI, R.; THOMAS, A.; MENTZER, R.M.; BIANCO, J.A. Assessment of junction, perfusion, metabolism, and histology in hearts preserved with University of Wisconsin Solution. *Circulatory*. 86(5):II333-II338, 1992.

ORMSTAD, K.; ORRENIUS, S. The localization of renal glutathione oxidase. Activity studied in the isolated, perfused rat kidney. Biochemical and biophysical research communications. 92(2):540-545, 1980.

ORMSTAD, K., JONES, D.P., ORRENIUS, S. Characteristics of glutathione biosynthesis by freshly isolated rat kidney cells. The Journal of Biological Chemistry. 255(1): 175-181, 1980.

PEGG, D.E.; FARRANT, J. Vascular resistance and edema in the isolated rabbit kidney perfused with a cell-free solution. Cryobiology. 6(3):200-210, 1969.

PEGG, D.E., GREEN, C.J. Renal preservation by hypothermic perfusion using a defined perfusion fluid. Cryobiology. 9:420-428, 1972.

PEGG, D.E., GREEN, C.J. The functional state of kidneys perfused at 37°C with a bloodless fluid. Journal of Surgical Research. 15:218-225, 1973.

PEGG, D.E. Vascular resistance of the isolated Rabbit kidney. Cryobiology. 8:431-440, 1971.

PLOEG, R.J.; GOOSSENS, D.; McANULTY, J.F.; SOUTHARD, J.H.; BELZER, F.O. Successful 72-hour cold storage of dog kidneys with UW Solution. Transplantation. 46:191-196, 1988.

PURI, R.N.; MEISTER, A. Transport of glutathione, as gamma-glutamylcysteinylglycyl ester, into liver and kidney. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:5258-5260, 1983

RANKIN, B.B.; WELLS, W.; CURTHOYS, N.P. Rat renal peritubular transport and metabolism of plasma^[35S] glutathione. Am. J. Physiol. 249:F198-F204, 1985.

RICHARDSON, G.; ULFELDER, H. Experiences with a simplified method of small organ perfusion. Surgery. 48(1):237-243, 1960.

ROSENFELD, S.; SELLERS, A.L.; KATY, J. Development of an isolated perfused mammalian kidney. Am. J. Physiol. 196(5) :1155-1159, 1959.

ROSENFELD, S.; SELLERS, A.L. Pressure-flow studies in the isolated artificial heart-lung perfused mammalian kidney. Am. J. Physiol. 199(3):499-502, 1960.

ROSENFELD, S.; KRAUS, R.; McCULLEN, A. Effect of renin, ischemia, and plasma protein loading on the isolated perfused kidney. Am. J. Physiol. 209(4):835-843, 1965.

SACKS, S.A., PETRITSCH, P.H., KAUFMAN, J.J. Canine kidney preservation using a new perfusate. The Lancet. 1:1024-1028, 1973.

SCHUREK, H.J.; BRECHT, J.P.; LOHFERT, H.; HIERHALZER, K. The basic requirements for the function of the isolated cell free perfused rat kidney. Pflugers Arch. 354:349-365, 1975.

SKAARING, P.; BIERRING, F.; HEJNAL, J.; SVENDSEN, V.; JENSEN, E.; KEMP, E. Ultrastructure of the glomerular filtration membrane of autotransplanted canina kidneys stored for 24 hours. Cryobiology. 12:224-230, 1975.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. Analytical Biochemistry. 27:502-522, 1969.

UHLIG, S.; WENDEL, A. The physiological consequences of glutathione variations. Life Sciences. 51:1083-1094, 1992.

VREUGDENHIL P.K.; EVANS W.; BELZER, F.O.; SOUTHARD, J.H. Glutathione depletion in cold-stored organs. Transplantation Proceedings. 22(2):455-457, 1990.

WAUGH, W.H.; KUBO, T. Development of an isolated perfused dog kidney with improved function. American Journal of physiology. 217(1):277-290, 1969.

WRIGHT, F.S. Potassium transport by successive segments of the mammalian nephron. Federation Proceedings. 40(9):2398-2402, 1981.