



**Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Medicina
Departamento de Farmacologia e Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

RAIMUNDO MESSIAS DE ARAUJO FILHO

Efeitos comparativos do glutathione, glutamina, alanina e da alanilglutamina adicionados a um perfusato de composição intracelular.

2017

RAIMUNDO MESSIAS DE ARAUJO FILHO

Efeitos comparativos do glutathione, glutamina, alanina e da alanilglutamina adicionados a um perfusato de composição intracelular.

Tese de Doutorado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Manassés Claudino Fonteles

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A691e Araujo Filho, Raimundo Messias de.

Efeitos comparativos do glutathione, glutamina, alanina e da alanilglutamina adicionados a um perfusato de composição intracelular / Raimundo Messias de Araujo Filho. – 2017.
147 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles.

1. preservação renal. 2. perfusão renal. 3. transplante renal. 4. glutathione. 5. glutamina. I.
Título.

CDD 615.1

RAIMUNDO MESSIAS DE ARAUJO FILHO

Efeitos comparativos do glutathione, glutamina, alanina e da alanilglutamina adicionados a um perfusato de composição intracelular.

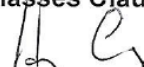
Tese de Doutorado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em 20/11/17

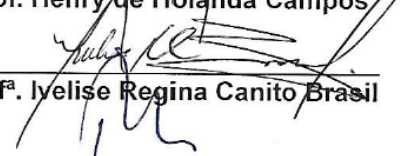
Banca examinadora



Prof. Manassés Claudino Fonteles



Prof. Henry de Holanda Campos



Prof.ª Ivelise Regina Canito Brasil



Prof. Aldo Ângelo Moreira Lima



Prof. Nilberto Robson Falcão do Nascimento

Dedico este meu trabalho a toda minha família, que é a base sólida da minha vida e, em especial, à minha amada esposa Ana Angélica e aos meus queridos dois filhos, Messias Júnior e Raul.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente ao meu orientador Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles pela paciência e incentivo constante na construção deste trabalho;
- Ao Prof. Dr. Henry de Holanda Campos pela amizade e incentivo;
- À Prof. Dra. Paula Frassinetti Castelo Branco Camurça Fernandes pela ajuda na conciliação dos meus plantões com a parte científica deste trabalho;
- Aos meus colegas de trabalho no setor de hemodiálise do Hospital Universitário Walter Cantídio na compreensão das trocas dos plantões: Silvana, Wilson, Leyla e Márcia;
- A todos meus colegas nefrologistas da Unidade de Transplante Renal do Hospital Universitário Walter Cantídio;
- A todos os meus colegas nefrologistas do setor de hemodiálise do Hospital Geral de Fortaleza;
- Aos meus colegas de trabalho da Clineec pela ajuda também nas trocas dos plantões: Josumary, Ocilma, Moisés e Daniele;
- Ao meu bolsista, Dr. José Ernando de Sousa Filho, pelo auxílio nos procedimentos cirúrgicos e na elaboração das planilhas e gráficos;
- Ao Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima pela ajuda nas dosagens dos aminoácidos.
- Ao enfermeiro Camilo Reuber de Sousa Soares pelo brilhante auxílio nos procedimentos cirúrgicos;
- À técnica de laboratório Maria Silva 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 dos substratos.
- À Dra. Rosa Salani Mota pela presteza e competência na análise estatística.

**“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não
sou o que deveria ser, mas graças a Deus,
não sou o que era antes”.**

(Marthin Luther King)

RESUMO

O transplante renal é a terapia substitutiva de escolha para os pacientes portadores de doença renal crônica avançada. A preservação renal tem como objetivo garantir a sua viabilidade funcional. Todos os procedimentos se concentraram na proteção das funções do órgão, na proteção das reservas de energia e da estrutura morfológica. Objetivos: o estudo fisiofarmacológico do rim perfundido e isolado de coelho com uma solução de composição intracelular rica em potássio e magnésio contendo 4g% de albumina bovina; avaliar os efeitos da glutamina, alanina, alanilglutamina e do glutathione em diferentes concentrações e avaliar os efeitos da subnormotermia. Coelhos do sexo masculino foram anestesiados com uretana 1,2g/kg por via intraperitoneal mais 30 mg/kg de pentobarbital por via intramuscular. Após a anestesia ser estabelecida, foi realizada uma incisão na linha média e o ureter esquerdo canulado com um tubo de polietileno. A aorta abdominal foi dissecada e os vasos colaterais ligados. A artéria mesentérica e a renal direita foram ligadas e foi removido o rim direito. A aorta foi canulada com uma cânula metálica estéril e a perfusão do rim esquerdo iniciada sem interrupção do fluxo. A preparação foi então colocada no circuito de perfusão onde foi mantida a 37°C ou a 22°C com solução de perfusão contendo 4g% de albumina previamente dialisada por 48 horas e oxigenada por uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂. A cada dez minutos colhia-se material para análise no perfusato e na urina para dosagem de inulina, sódio, potássio e cloreto. O fluxo de perfusato, a resistência vascular e as razões PO₂/PCO₂ foram monitorizados ao longo da experiência. Os animais foram distribuídos aleatoriamente e divididos em nove grupos: solução A, glutamina 1 mM e 3 mM, alanilglutamina 2 mM e 5 mM, glutamina 1 mM + alanina 2 mM, glutamina 1 mM + glutathione 2 mM, glutamina 1 mM + glutathione 4 mM e glutamina 1 mM + glutathione 2 mM a 22°C. Não houve, com os tratamentos, alteração nos parâmetros resistência vascular, transporte absoluto e percentual de potássio. O fluxo urinário foi mais alto nos grupos GL1, GL1GSH2 e GL1GSH4(p=0,08). O RFG foi mais alto nos grupos GL1, GL1GSH2 e GL1GSH4(p=0,03). Quando se analisou o transporte absoluto de sódio vimos que os maiores valores pertenciam aos grupos GL1GSH2, GL1GSH4 e ALGL5(p=0,001) e o transporte percentual de sódio tinha seus maiores valores nos grupos GL1GSH2 e ALGL5(p=0,012). Com relação ao transporte absoluto de cloreto o grupo com melhor índice é o GL1GSH2(p=0,002). O transporte percentual de cloreto tem o seu melhor resultado no grupo GL1GSH2(p=0,046). Já o clearance osmolar foi maior nos grupos GL1 e GL1GSH2(p=0,007). Concluímos que a adição de glutamina e de glutathione a uma solução de composição intracelular poderá resultar em melhor atividade fisiológica em termos de preservação renal, podendo ser aplicável na preservação renal para transplante.

Palavras chaves: preservação renal; perfusão renal; transplante renal; glutamina; glutathione.

ABSTRACT

Comparative effects of glutathione, glutamine, alanine and alanylglutamine added to a perfusate of intracellular composition.

Renal transplantation is the substitutive therapy of choice for patients with advanced chronic kidney disease. Kidney preservation aims to ensure its functional viability. All procedures focused on protecting the body's functions, protecting energy reserves and morphological structure. Objectives: the physiopharmacological study of the perfused and isolated rabbit kidney with a solution of intracellular composition rich in potassium and magnesium containing 4g% bovine albumin; to evaluate the effects of glutamine, alanine, alanylglutamine and glutathione at different concentrations and to evaluate the effects of subnormotermia. Male rabbits were anesthetized with urethane 1,2g/kg intraperitoneally and 30mg/kg pentobarbital intramuscularly. After the anesthesia was established, an incision was made in the midline and the left ureter cannulated with a polyethylene tube. The abdominal aorta was dissected and the collateral vessels connected. The mesenteric artery and the right renal artery were ligated and the right kidney was removed. The aorta was cannulated with a sterile metal cannula and perfusion of the left kidney started without interruption of flow. The preparation was then placed in the perfusion loop where it was maintained at 37 °C or 22 °C with infusion solution containing 4%g albumin previously dialysed for 48 hours and oxygenated by a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂. Every ten minutes, material was analyzed for perfusate and urine for inulin, sodium, potassium, and chloride dosage. Perfusate flow, vascular resistance and PO₂/PCO₂ ratios were monitored throughout the experiment. The animals were randomly assigned and divided into nine groups: solution A, 1 mM and 3 mM glutamine, 2 mM and 5 mM alanylglutamine, 1 mM glutamine + 2 mM alanine, 1 mM glutamine + 2 mM glutathione, 1 mM glutamine + 4 mM glutathione and 1 mM glutamine + 2 mM glutathione 22 ° C. There were no alterations in the parameter vascular resistance, absolute transport and percentage of potassium. Urinary flow was higher in groups GL1, GL1GSH2 and GL1GSH4(p=0.08). The RFG was higher in the GL1, GL1GSH2 and GL1GSH4 groups(p=0.03). When the absolute sodium transport was analyzed, the highest values belonged to the GL1GSH2, GL1GSH4 and ALGL5 groups (p=0.001) and the percentage sodium transport had their highest values in the GL1GSH2 and ALGL5 groups(p=0.012). Regarding the absolute transport of chloride, the group with the best index is GL1GSH2(p=0.002). The percentage transport of chloride has its best result in the GL1GSH2 group(p=0.046). The osmolar clearance was higher in the GL1 and GL1GSH2 groups(p=0.007). We conclude that the addition of glutamine and glutathione to an intracellular composition solution may result in better physiological activity in terms of renal preservation and may be applicable in renal preservation for transplantation. Keywords: renal preservation; renal perfusion; kidney transplantation; glutamine; alanine; glutathione.

LISTA de FIGURAS

Figura 1. Metabolismo da Glutamina.

Figura 2. Esquema do sistema de perfusão de rim isolado utilizado para a pesquisa.

Figura 3. Protocolo experimental com tempo total de aproximadamente 150 minutos.

LISTA DE IMAGENS

Imagem 1. Incisão abdominal de 1cm, abaixo do apêndice xifoide á região hipogástrica; vasos colaterais e ureter canulado, além dos fios posicionados nos vasos abdominais de grande calibre; artéria mesentérica e glândula suprarrenal ligadas, fios posicionados abaixo e acima do tronco celíaco.

Imagem 2. Sistema de perfusão utilizado nos experimentos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos de experimentos.

Tabela 2. Dinâmica de perfusão de rins perfundidos com solução A contendo 4 g% de albumina bovina a 37 °C.

Tabela 3. Dinâmica de perfusão de rins perfundidos com solução A contendo 4 g% de albumina bovina acrescentado de glutamina 1mM a 37 °C.

Tabela 4. Dinâmica de perfusão de rins perfundidos com solução A contendo 4 g% de albumina bovina acrescentado de glutamina 1mM e glutathione 2mM a 37 °C.

Tabela 5. Dinâmica de perfusão de rins perfundidos com solução A contendo 4 g% de albumina bovina acrescentado de glutamina 1mM e glutathione 4mM a 37 °C.

Tabela 6. Dinâmica de perfusão de rins perfundidos com solução A contendo 4 g% de albumina bovina acrescentado de glutamina 3mM a 37 °C.

Tabela 7. Dinâmica de perfusão de rins perfundidos com solução A contendo 4 g% de albumina bovina acrescentado de glutamina 1mM e alanina 2mM a 37 °C.

Tabela 8. Dinâmica de perfusão de rins perfundidos com solução A contendo 4 g% de albumina bovina acrescentado de alanilglutamina 2mM a 37 °C.

Tabela 9. Dinâmica de perfusão de rins perfundidos com solução A contendo 4 g% de albumina bovina acrescentado de alanilglutamina 5mM a 37 °C.

Tabela 10. Dinâmica de perfusão de rins perfundidos com solução A contendo 4 g% de albumina bovina acrescentado de glutamina 1mM e glutathione 2mM a 22 °C.

LISTAS DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Variação da concentração de substratos em rins perfundidos com glutamina 1 mM a 37°C.

Gráfico 2. Variação da concentração de substratos em rins perfundidos com glutamina 1 mM + glutation 2 mM a 37°C.

Gráfico 3. Variação da concentração de substratos em rins perfundidos com glutamina 1 mM + alanina 2 mM a 37°C.

Gráfico 4. Variação da concentração de substratos em rins perfundidos com alanilglutamina 2 mM a 37°C.

Gráfico 5. Variação da concentração de substratos em rins perfundidos com alanilglutamina 5 mM a 37°C.

Gráfico 6. Variação da concentração de substratos em rins perfundidos com glutamina 1 mM + glutation 2 mM a 22°C.

Gráfico 7A. Cinética da resistência vascular de rins de coelhos perfundidos com diferentes soluções de preservação.

Gráfico 7B. Cinética da resistência vascular de rins de coelhos perfundidos com diferentes soluções de preservação.

Gráfico 8A. Cinética do fluxo urinário de rins de coelhos perfundidos com diferentes soluções de preservação.

Gráfico 8B. Cinética do fluxo urinário de rins de coelhos perfundidos com diferentes soluções de preservação.

Gráfico 9A. Cinética do ritmo de filtração glomerular de rins de coelhos perfundidos com diferentes soluções de preservação.

Gráfico 9B. Cinética do ritmo de filtração glomerular de rins de coelhos perfundidos com diferentes soluções de preservação.

Gráfico 10A. Cinética do transporte de sódio de rins de coelhos perfundidos com diferentes soluções de preservação.

Gráfico 10B. Cinética do transporte de sódio de rins de coelhos perfundidos com diferentes soluções de preservação.

Gráfico 11A. Cinética do percentual de transporte de sódio de rins de coelhos perfundidos com diferentes soluções de preservação.

Gráfico 11B. Cinética do percentual de transporte de sódio de rins de coelhos perfundidos com diferentes soluções de preservação.

Gráfico 12A. Cinética do transporte de potássio de rins de coelhos perfundidos com diferentes soluções de preservação.

Gráfico 12B. Cinética do transporte de potássio de rins de coelhos perfundidos com diferentes soluções de preservação.

Gráfico 13A. Cinética do percentual de transporte de potássio de rins de coelhos perfundidos com diferentes soluções de preservação.

Gráfico 13B. Cinética do percentual de transporte de potássio de rins de coelhos perfundidos com diferentes soluções de preservação.

Gráfico 14A. Cinética do transporte de cloreto de rins de coelhos perfundidos com diferentes soluções de preservação.

Gráfico 14B. Cinética do transporte de cloreto de rins de coelhos perfundidos com diferentes soluções de preservação.

Gráfico 15A. Cinética do percentual de transporte de cloreto de rins de coelhos perfundidos com diferentes soluções de preservação.

Gráfico 15B. Cinética do percentual de transporte de cloreto de rins de coelhos perfundidos com diferentes soluções de preservação.

Gráfico 16A. Cinética do clearance de água livre de rins de coelhos perfundidos com diferentes soluções de preservação.

Gráfico 16B. Cinética do clearance de água livre de rins de coelhos perfundidos com diferentes soluções de preservação.

Gráfico 17A. Cinética do clearance osmolar de rins de coelhos perfundidos com diferentes soluções de preservação.

Gráfico 17B. Cinética do clearance osmolar de rins de coelhos perfundidos com diferentes soluções de preservação.

LISTAS DE SIGLAS E DE ABREVIATURAS

ROS – Espécies reativas do oxigênio.

UW-Belzer – Solução da Universidade de Wisconsin.

UW-MPS – Solução de preservação renal formulada por Belzer.

PEG – Polietilenoglicol.

UW – Solução da Universidade de Wisconsin.

HTK – Solução Histidina-Triptofano-Cetoglutarato.

EC – Solução Euro-Collins.

IGL-1 – Solução do Instituto George-Lopez.

HOC – Solução de Marshall.

KPS-1 – Solução de preservação de Belzer.

PBS – Solução de sacarose tamponada com fosfato.

HES – Hidroxietilamida.

GSH – Glutation.

PE50 – Tubo de polietileno.

DNA – Ácido desoxirribonucleico.

Mn-SOD – Superóxido dismutase ligada ao manganês.

ATP – Trifosfato de adenosina.

ADP – Difosfato de adenosina.

AMP – Monofosfato de adenosina.

GTP - Trifosfato de guanosina.

NH⁴ – Molécula de amônia.

CO² – Molécula de gás carbônico.

HSP-70 – Proteínas do choque térmico.

TNF-alfa – Fator de necrose tumoral alfa.

RNA – Ácido ribonucleico.

RNA_m – Ácido ribonucleico mensageiro.

NAD – Dinucleotídeo de nicotinamida e adenosina

PDG – Glutaminase renal dependente de fosfato.

iNOS – Óxido nítrico sintase indutível.

GABA – Ácido gama-butírico

NO – Óxido nítrico

GSSH – Glutation dissulfeto

°C – Graus Celsius

CS – Cold storage / Conservação estática

DF – Doador falecido

DCE – Doador critério expandido

HLA – Human Leucocyte Antigens

LIR – Lesão de isquemia e de reperfusão

ME – Morte encefálica

mmHg – Milímetros de mercúrio

MPP – Máquina de perfusão pulsátil

RA – Rejeição aguda

R – Resistência vascular

FU – Fluxo urinário

C_{IN} – Clearance de inulina

TNa – Transporte de sódio

%TNa – Percentual de transporte de sódio

TK – Transporte de potássio

%TK – Percentual de transporte de potássio

TCI – Transporte de cloreto

%TCI – Percentual de transporte de cloreto

Cosm – Clearance osmolar

CH₂O – Clearance de água livre

HIP – Hipotermia

DBD – Doação após morte encefálica

DCD – Doação após parada cardíaca

NTA – Necrose tubular aguda

AQIX – Solução de preservação livre de fosfato.

HPLC – Cromatografia líquida de alta resolução.

RFG – Ritmo de filtração glomerular.

GLp – Glutamina no perfusato.

GLu – Glutamina urinária.

ALp – Alanina no perfusato.

ALu – Alanina urinária.

GSHp – Glutation no perfusato.

GSHu – Glutation urinário.

ALGL – Alanilglutamina.

CND – Solução de custodiol suplementado com dextran

SUMÁRIO

1.Introdução.....	1-3
1.1.Tipos de Doadores Renais.....	3-5
1.2.Preservação do Rim para Transplantes.....	5-8
1.3.Hipotermia no Transplante Renal.....	8-11
1.4.Normotermia no Transplante Renal.....	11-13
1.5.Máquina de Perfusão Renal.....	13-17
1.6.Lesão de Isquemia e de Reperfusão.....	17-19
1.7.Soluções de Preservação do Rim para Transplante.....	19-25
1.8.Glutamina e Alanina.....	25-36
1.9.Glutation.....	36-40
2.Justificativa e Relevância do Estudo.....	40
3.Objetivos.....	40-41
4.Material e Métodos	
4.1.Animais de Experimentação.....	41
4.2.Grupos de Animais.....	41-43
4.3.Procedimento Cirúrgico.....	43-45
4.4.Sistema de Perfusão Renal.....	46-48
4.5.Solução de Perfusão Renal.....	49
4.6.Protocolo de Perfusão Renal.....	49-50
4.7.Parâmetros Fisiológicos no Rim Perfundido.....	50-52
4.8.Análises Bioquímicas.....	53
4.9. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Resolução(HPLC).....	53-54
4.10.Substâncias Utilizadas na Perfusão Renal.....	54-55
4.11.Análises Estatísticas.....	55
5.Resultados	
5.1.Perfusão renal com solução A contendo 4 g% de albumina a 37°C.....	56-57
5.2.Perfusão Renal com solução A contendo 4 g% de albumina e glutamina 1 mM a 37°C.....	58-61
5.3. Perfusão Renal com solução A contendo 4 g% de albumina, glutamina 1 mM e glutation 2 mM a 37°C.....	62-65

5.4. Perfusão Renal com solução A contendo 4 g% de albumina, glutamina 1 mM e glutathione 4 mM a 37°C.....	66-67
5.5. Perfusão Renal com solução A contendo 4 g% de albumina e glutamina 3 mM a 37°C.....	68-69
5.6. Perfusão Renal com solução A contendo 4 g% de albumina, glutamina 1 mM e alanina 2 mM a 37°C.....	70-73
5.7. Perfusão Renal com solução A contendo 4 g% de albumina e alanilglutamina 2 mM a 37°C.....	74-77
5.8. Perfusão Renal com solução A contendo 4 g% de albumina e alanilglutamina 5 mM a 37°C.....	78-81
5.9. Perfusão Renal com solução A contendo 4 g% de albumina, glutamina 1 mM e glutathione 2 mM a 22°C.....	82-85
Gráficos.....	86-107
6.Discussão.....	108-115
7.Conclusão.....	116
8.Bibliografia.....	117-147

1. INTRODUÇÃO

O transplante renal é o tratamento de escolha para a doença renal crônica em estágio final(Kaths e cols., 2016; Sadovsky e cols., 2015; Chandak e Callaghan, 2014; Malinoski e cols., 2013; Lindell e cols., 2013; Gomez e cols., 2012; Thuillier e cols., 2011; Nafar e cols., 2011; Kibondo e cols., 2010; Wolfe e cols., 1999).

É o transplante de órgãos mais frequente em todo o mundo e atualmente tem sido estabelecido como tratamento de rotina para a doença renal terminal. Uma vez que Jaboulay e Carrel desenvolveram as técnicas necessárias para realizar anastomoses vasculares na virada do século passado, tem havido um desejo de tratar falência de órgãos por transplante. Jaboulay foi o primeiro a tentar isso em 1906, tratando dois pacientes com insuficiência renal por transplante de um rim de cabra em um e um rim de porco para o outro. Ambos os transplantes falharam e ambos os pacientes morreram. O primeiro uso de um rim humano para transplante foi em 1936, quando Yu Yu Voronay, um cirurgião ucraniano trabalhando em Kiev, realizou o primeiro de uma série de seis transplantes para tratar pacientes morrendo de insuficiência renal aguda secundária a intoxicação por mercúrio. Todos os transplantes falharam, em grande parte devido a uma incapacidade de apreciar o efeito deletério da isquemia quente. O primeiro transplante renal com sucesso foi realizado em Boston, em 1954, por Joseph Murray, que realizou um transplante renal entre irmãos gêmeos univitelinos(Watson e Dark, 2012). No mesmo ano, David Hume realizou, em Boston, o primeiro transplante com sucesso proveniente de doador falecido(Sousa Júnior, 2016). O primeiro transplante no Brasil foi de doador vivo, em 1965, e o de doador falecido, em 1967(Ilanhez, 1994).

As sobrevidas dos pacientes e dos enxertos renais após o transplante têm melhorado ao longo das últimas décadas. A sobrevida do enxerto renal proveniente de doadores falecidos aumentou muito, ocasionada, principalmente, pela melhoria da terapia imunossupressora, da seleção dos receptores e do tratamento das complicações pós-operatórias(Ploeg e cols., 1992). No entanto, a função retardada do enxerto permanece uma importante complicação do transplante renal. Embora o transplante confira um maior benefício de sobrevivência entre todas as diferentes terapias de substituição renal, os pacientes transplantados renais ainda têm uma alta taxa de mortalidade em comparação com os controles populacionais(Ahlenstiel e cols., 2006)

A escassez de órgãos continua a representar um problema significativo nos transplantes. Por conseguinte, existe uma necessidade urgente de estratégias inovadoras para aumentar o número de transplantes com bons resultados que possam ser realizadas usando os rins disponíveis. Várias abordagens são tomadas para reduzir a falta de doadores, incluindo a utilização de doadores com coração parado(ainda não utilizado no Brasil), utilização de dois rins do mesmo doador de idade avançada e/ou com critérios expandidos(Gomez e cols., 2012; Matos e cols., 2015). No entanto, os receptores de transplante renal de doadores com critérios expandidos têm resultados menos eficazes do que os doadores padrão(Deken e cols., 2016; Gomez e cols., 2012).

Apesar dessa necessidade desesperada de órgãos, nem todos os rins são utilizados. Particularmente, há interesse em ampliar o “pool” de doadores, modificando os critérios existentes para a aceitação e por identificar maneiras de reduzir o número de doadores de órgãos desperdiçados. Fontes como os doadores marginais, os doadores de coração parado e as provas de histocompatibilidade não tão adequadas estão sendo consideradas para possíveis transplantes(Summers e cols., 2010).

No Brasil, no último trimestre de 2016 foi obtido um crescimento na taxa de doadores efetivos, mas essa elevação de 14,1 por milhão de população(pmp) para 14,4 pmp foi menor do que a esperada de 15 pmp para atingir a meta de 16 doadores por milhão de população no final de 2016. Foi obtida a taxa de 50 potenciais doadores por milhão da população(notificações), entretanto a taxa de efetivação de apenas 29% não tem crescido em decorrência principalmente de dois fatores: baixa taxa de doadores elegíveis(68,6%), que são aqueles nos quais foi completado o diagnóstico de morte encefálica e a elevada taxa de recusa familiar(44%). Outro aspecto que merece análise mais detalhada é que cinco estados, três da região sul(Santa Catarina: 36,2, Paraná: 31,4 e Rio Grande do Sul: 26 ppm), o Ceará: 25,8 pmp e o Distrito Federal: 27 pmp, ultrapassaram a taxa de 25 doadores pmp. O transplante renal que tem como meta 6000 transplantes(30 pmp) para este ano e que vinha apresentando crescimento constante até 2014(29,6 pmp), caiu em 2015(27,5 pmp) e novamente este ano(26,8 pmp). O fato preocupante é que pela primeira vez nos últimos anos a queda foi nos transplantes com doador falecido(2,8%), enquanto que os transplantes com doadores vivos apresentaram um leve crescimento(1,7%). Entre janeiro e setembro de 2016 foram

realizados no Brasil 4114 transplantes renais sendo 906 com doadores vivos e 3208 com doadores falecidos. O Ceará neste mesmo período realizou 191 transplantes sendo 16 de doadores vivos e 175 de doadores falecidos. Temos atualmente 467 pacientes ativos na lista do nosso estado, e no Brasil, 19279(Registro Brasileiro de Transplantes, 2016).

1.1. Tipos de Doadores Renais

Enquanto a discrepância entre a demanda de órgãos e a oferta está aumentando e os pacientes estão morrendo em números crescentes na lista de espera, há uma necessidade urgente de expandir o “pool” de doadores e usar todos os órgãos disponíveis. Há um desequilíbrio significativo entre a oferta e a demanda de órgãos no transplante renal atual(Deken e cols., 2016; Vogel e cols., 2012).

No transplante renal, três grandes tipos de doadores são encontrados: doadores vivos, doadores falecidos após morte encefálica e doadores falecidos pós-morte cardíaca(Baker e Watson, 2015; Thiruchelvam e cols., 2011). Outra fonte doadora é o doador com critério expandido, que incluem os doadores após morte encefálica, mas associado a fatores de co-morbidades, como hipertensão arterial ou uma idade acima de sessenta anos(Matós e cols., 2015).

Trinta mil pessoas em todo o mundo a cada ano tornam-se doadores vivos de rins. Tradicionalmente, os doadores vivos de rins têm sido selecionados na base da ausência de fatores de risco para pobres resultados depois da doação e sem uma avaliação individualizada dos riscos a longo prazo(Grams e cols., 2016). Os doadores vivos fornecem os órgãos de melhor qualidade com os resultados mais bem sucedidos pelas seguintes razões: os doadores são geralmente mais jovens; o transplante pode ser planejado e executado na data escolhida antes que o paciente precise iniciar a diálise; não há danos ocultos nos órgãos como consequência de catecolaminas e de grandes liberações de citocinas que caracterizam a morte cerebral; a duração da isquemia fria é mais curta, minimizando assim a lesão de isquemia e de reperfusão(IRI); o transplante é realizado eletivamente por pessoal experiente em horário normal de trabalho(Baker e Watson, 2015; Opelz e Dohler, 2007). O transplante renal de doador vivo reduziu a diferença entre a demanda e a oferta de rins. Com melhorias nas técnicas cirúrgicas da nefrectomia, redução da dor

pós-operatória, menor tempo de permanência no hospital e maior retorno ao trabalho, a doação em vida tornou-se mais aceitável(Thiruchelvam e cols., 2011).

Existem dois tipos de doação de órgãos falecidos: a doação após a morte encefálica (DBD - anteriormente denominada doação cardíaca) e a doação após a morte circulatória (DCD - anteriormente denominada doação pós-parada cardíaca). Para doadores DBD a morte é confirmada por testes de morte do tronco encefálico. Um doador DCD é aquele que geralmente sofreu uma lesão cerebral grave, mas não tem morte cerebral. Rins de doadores após morte cardíaca têm mais alto risco de ter função retardada e disfunção primária do enxerto do que os de rins de doadores depois de morte encefálica. Embora o período de armazenamento frio ("isquemia fria") cause lesão de isquemia e de reperfusão no rim transplantado, o período adicional de isquemia quente resulta em lesão de isquemia e de reperfusão maior. Isto se manifesta como necrose tubular aguda (NTA) e a incidência desta nos rins de DCD é mais de 50%, em comparação com 25% nos rins DBD(Baker e Watson, 2015; Catena e cols., 2013; Minor e cols., 2005).

Os doadores com critérios expandidos foram estabelecidos como um grupo de doadores baseado na associação de certos fatores com sobrevida reduzida do enxerto(Matoss e cols., 2015). Historicamente, os doadores critérios expandidos foram conhecidos como doadores marginais, mas são agora mais apropriadamente referidos como doadores de alto risco.

Eles são definidos segundo os critérios definidos pelo Projeto de Diretrizes da Associação Médica Brasileira e do Conselho Federal de Medicina. Os critérios são definidos quanto à função ou quanto ao potencial de transmissão de doenças ou anomalias anatômicas. Quanto à função: doadores de mais de sessenta anos; doadores com idades entre 50-59 anos com pelo menos dois entre três critérios abaixo: hipertensão arterial sistêmica, creatinina acima de 1.5 mg/dL ou clearance de creatinina entre 50-70 mL/min antes da remoção do órgão(usando a creatinina no dia da remoção ou a creatinina terminal) ou o acidente vascular cerebral como causa de morte; doadores com doenças renais ou diabéticos ou doadores pediátricos(Kaths e cols., 2016). Quanto ao potencial de transmissão de doenças ou anomalias anatômicas: doadores portadores de infecções; doadores portadores de neoplasias malignas; comportamento social/sexual com inclusão em grupo de risco ou rins com anomalias anatômicas. Doadores critérios expandidos estão crescentemente sendo usados para solucionar a demanda por órgãos. Contudo,

estes órgãos são particularmente susceptíveis à injúria isquêmica fria durante a preservação(Parsons e Guarrera, 2014).

Vários fatores têm sido associados com a ocorrência de função tardia do enxerto e um dos mais importantes é a qualidade da preservação dos órgãos que depende da eficácia da solução de conservação, mas não existem evidências convincentes de que a sobrevivência do enxerto é afetada pelo método de conservação. O transplante de rins obtidos a partir de doadores de coração parado foi associado com um aumento de aproximadamente trinta por cento no risco de fracasso, independentemente da duração de conservação, e a máquina de perfusão pulsátil não foi capaz de melhorar o resultado(Opelz e Dohler, 2007).

1.2. Preservação do Rim para Transplantes

Desde o início do transplante renal, os resultados a curto e longo prazo têm melhorado constantemente. Isto tem sido causado por uma série de fatores, incluindo a experiência crescente de centros e de cirurgiões de transplantes, melhor seleção de doadores e de receptores, e melhorias nos regimes imunossupressores e na preservação renal. No entanto, a disfunção primária do enxerto tem relatado taxas de 0% a 20% para todos os transplantes renais. Dos transplantes que funcionam 20% a 100% evoluem com função retardada do enxerto de alguns dias a dois meses, com a maioria começando a funcionar após aproximadamente duas semanas. As causas de falência primária e de função tardia do enxerto(DGF) são multifatoriais, incluindo fatores nos doadores e nos receptores, mas provavelmente a razão mais importante é o dano isquêmico do rim antes do transplante. Isto tem tanto um componente isquêmico frio como um componente isquêmico quente(Knight e Nicholson, 2001).

Carrel e Lindberg desenvolveram a perfusão renal em 1938. Em 1956, Bogardus e Schlosser resfriaram rins de cães entre 23 e 26°C, que resultaram em marcada proteção da lesão funcional produzida por duas horas da oclusão do pedículo renal. Em 1963, Calne e colaboradores relataram que rins de cães poderiam ser preservados por oito a doze horas por imersão em água gelada. Este mesmo trabalho foi retomado por Keeler e colaboradores em 1966, que usou uma solução de preservação de composição intracelular que continha altas

concentrações de íons potássio e magnésio para prevenir a perda de potássio e magnésio em rins preservados com salina isotônica. Humphries e colaboradores foram os primeiros a descrever a preservação por perfusão pulsátil por máquina em 1963, seguida por Belzer e colaboradores relatando a preservação de rins de cães por mais de setenta e duas horas com perfusão hipotérmica contínua em 1967. Collins e colaboradores relataram com sucesso a preservação de rins de cães para transplante por lavagem inicial com uma solução hipotérmica de composição intracelular, seguida por estocagem a frio por mais de trinta horas(Knight e Nicholson, 2001).

O tempo no qual um órgão pode ser preservado representa um papel crucial. Órgãos como coração, fígado, ou pâncreas não toleram longos períodos de preservação, enquanto que o rim tem sido preservado com sucesso por um período superior a sessenta horas(Moutabarrik, 1998).

A função retardada do enxerto tem como conceito a necessidade de diálise na primeira semana após o transplante(Requião-Moura e cols., 2015; Hosgood e cols., 2012). Pode ter efeitos deletérios a longo prazo como rejeição aguda ou crônica mediada por fatores isquêmicos e/ou imunológicos(Shoskes e Halloran, 1996). Em vista da expansão das listas de espera para o transplante renal, melhorias nos resultados dos enxertos a longo prazo é crucial. Diferentes estudos têm mostrado que a função tardia do enxerto influencia não somente o período imediato no pós-transplante, mas também no seguimento a longo prazo do transplante renal(Ahlenstiel e cols., 2006). Preservação efetiva de órgãos é um importante preditor de um bom resultado no transplante renal(Trushkov e cols., 2003).

Foi somente na década de sessenta, com o rápido desenvolvimento do transplante renal que a preservação de órgãos para transporte de armazenamento e partilha entre os centros de transplantes começou a ser desenvolvida para uso clínico(Collins, 1969). O ano de 1967 viu a introdução da preservação por perfusão bem sucedida, em uma área dominada pelos trabalhos de Folker Belzer, seguido dois anos depois pela descrição de armazenamento a frio simples usando uma solução especializada, um conceito defendido por Geoffrey Collins(Jamieson, 2007).

A frequência da possibilidade de uma necrose tubular aguda aumenta com a estocagem prolongada, mas a isquemia quente é de grande importância. Experimentalmente, o efeito de trinta minutos de isquemia quente é mais prejudicial do que vinte e quatro horas adicionais de estocagem fria. O maior objetivo da

preservação renal é estender com segurança o tempo de preservação sem aumentar significativamente a frequência de necrose tubular aguda(Marshall, 1984; Armad e cols., 1999). O tempo no qual um órgão pode ser preservado representa um papel crucial na partilha generalizada de órgãos. Órgãos tais como o coração, fígado, ou pâncreas não podem tolerar longos períodos de preservação, enquanto que o rim tem sido preservado com sucesso por um período maior que sessenta horas(Moutabarrik e cols., 1998).

O objetivo da conservação de órgãos é manter o órgão num estado mais viável possível até o momento do transplante. A prática clínica atualmente é restrita pela qualidade de doadores de órgãos, pelo número de doadores de órgãos disponíveis e pela incapacidade de avaliar a viabilidade do órgão antes do transplante(St Peter e cols., 2002). A preservação de órgãos é uma linha de suprimento para os transplantes de órgãos(Southard e Belzer, 1995).

Na evolução dos métodos de preservação de órgãos ao longo do século tornou-se uma prática usual a perfusão do órgão e a armazenagem em baixas temperaturas. Avanços na composição das soluções de preservação fizeram este método mais eficaz e permitiu que o transplante de órgãos tornar-se uma terapia poderosa em todo o mundo(St Peter e cols., 2002).

O método mais simples e mais praticado de preservação estática hipotérmica é baixar a temperatura para reduzir o metabolismo celular e a exigência de oxigênio. No entanto, com altas taxas de função tardia do enxerto e de disfunção primária do enxerto, em doadores com critérios expandidos de órgãos e a doação após parada cardíaca, há uma necessidade de melhorar as condições de preservação dos órgãos captados(Hosgood e Nicholson, 2011; Kay e cols., 2009). Fonteles e Karow Jr., em 1977, demonstraram que o resfriamento até 15°C poderá preservar a atividade dos receptores, dependendo da velocidade do resfriamento.

O rim de cadáver está sujeito a danos a cada passo, ao longo do caminho do pré-transplante desde a captação à reperusão. Antes da declaração de morte cerebral, o rim pode ser danificado pelo processo de doença subjacente, comorbidades ou das manobras terapêuticas instituídas em uma tentativa de reanimar o paciente ou manter a circulação após a morte encefálica. Durante a captação os órgãos serão submetidos a diferentes graus de isquemia quente e fria(Shoskes e Halloran, 1996).

O período de isquemia é dividido em tempo de isquemia quente e tempo de isquemia fria. O tempo de isquemia quente é definido como o período em que o órgão é privado de sangue, oxigênio e de nutrientes, enquanto o metabolismo celular continua com força total, ao passo que o tempo de isquemia fria é o momento durante o qual o rim é conservado numa solução hipotérmica para retardar a atividade celular e reduzir a produção de metabólitos tóxicos. Durante o período de isquemia fria é possível realizar o HLA do doador e o “cross-match”, bem como a atribuição de órgãos e o transporte e a preparação do receptor (Van der Vliet e Warlé, 2013; O’Callaghan e cols., 2013; Catena e cols., 2013).

Apesar da armazenagem estática a frio para a preservação renal ter sido eficaz durante décadas com o organismo ideal, este protocolo de preservação estática não está adaptado ao uso de órgãos não ótimos, que são necessários para aumentar o número de enxertos. O transplante de rim, por conseguinte, necessita de ser melhorado. Além disso, os complexos mecanismos da lesão de isquemia e de reperfusão significam que apenas uma abordagem de componentes múltiplos que tem como alvo várias vias com uma variedade de estratégias pode proporcionar uma proteção suficiente do enxerto (Bon e cols., 2012).

1.3. Hipotermia no Transplante Renal

Calne e colaboradores em 1963 mostraram que o simples esfriamento dos rins em água gelada, a função renal era conservada durante doze horas. Estudos posteriores demonstraram a eficácia das soluções de preservação por prolongar o tempo de isquemia fria e melhorar a qualidade dos órgãos. Na verdade, a hipotermia diminui a atividade metabólica, o que finalmente leva à degradação celular. A principal desvantagem da armazenagem estática a frio é a impossibilidade intrínseca de aplicar um parâmetro de padronização para avaliar o estado de saúde do órgão e para medir o dano isquêmico, a fim de prever a viabilidade do enxerto como um índice de evolução pós-transplante (Catena e cols., 2013).

Belzer em 1967 desenvolveu uma bomba de perfusão pulsátil, perfundindo e preservando rins durante setenta e duas horas, empregando crioprecipitado oxigenado a baixa pressão e a uma temperatura de 6°C a 10°C. Após a introdução da armazenagem estática a frio por Collins, em 1969, o interesse pela máquina de

perfusão diminuiu, por ser mais simples e econômica e ter permitido a preservação por até trinta horas(Catena e cols., 2013).

A hipotermia reduz a taxa de dano ao tecido, diminuindo o metabolismo celular, forma o componente central de qualquer estratégia de preservação de órgãos e contribui diretamente para o edema celular, por efeitos depressores diretos sobre a bomba de sódio. A isquemia também resulta em pH reduzido e em um acúmulo de produtos tóxicos da respiração anaeróbica (lactato e hipoxantina) que contribuem para os danos dos radicais livres sobre a reperfusão do sangue do receptor com o órgão. A lesão de isquemia e reperfusão grave leva a função tardia do enxerto pós-transplante. Tal disfunção tardia do enxerto tem sido associada ao um pior prognóstico(Thuillier e cols., 2011; St Peter e cols., 2002; Abdennebi e cols., 1998).

As soluções de preservação são projetadas para neutralizar os efeitos da hipotermia e prolongar o tempo em que o órgão pode ser mantido sem oxigênio. Eles contêm diferentes componentes baseados em três componentes essenciais: uma composição eletrolítica adequada (elevada ou baixa em relação ao sódio ou potássio, um impermeabilizante para prevenir o edema celular e um tampão para prevenir a acidose(Hosgood e cols, 2010). No entanto, a acidose, as trocas iônicas através da membrana celular, a entrada de cálcio em compartimentos celulares e a perda de nucleotídeos de adenina também ocorrem e podem ser dirigidas por componentes específicos nestas soluções. Outros componentes, tais como os antioxidantes, os anti-metabólicos, os agentes farmacológicos podem ser incluídos, numa tentativa de reduzir a lesão de reperfusão(Collins, 1997; Bahde e cols., 2008). Tradicionalmente, a preservação de órgãos começa com a descarga imediata no rim com uma solução de conservação a frio para remover o sangue e reduzir a temperatura ao nível mais baixo do metabolismo(Hosgood e Nicholson, 2011; Haisch e cols., 1997).

A estocagem a frio modula a expressão dos anti-oxidantes intrínsecos, particularmente o Mn-SOD mitocondrial. A adição de anti-oxidantes extrínsecos à solução de Belzer marcadamente alterou a sua habilidade em proteger as células contra a injúria funcional e estrutural induzida pelo frio. Em seu trabalho pioneiro, Belzer e Southard modificaram a solução de estocagem para reduzir o edema intracelular, intersticial bem como a acidose. É intrigante observar que os radicais livres continuam a ser produzidos no frio. Estas células crescem em placas de

culturas quando estocadas hipotermicamente em um refrigerador e poderiam ainda utilizar oxigênio dissolvido na solução da Universidade de Wisconsin para o metabolismo e para a formação de radicais livres. A minimização da injúria celular, do frio usando substâncias anti-oxidantes permite que as células mantenham níveis de ATP e sugere que estas células no frio mantenham algum grau de atividade metabólica(Salahudeen e cols., 2000).

A exigência de um colóide em soluções de lavagem é controversa. Pode evitar o edema intersticial, mas ao preço de um aumento maior da viscosidade da solução. O uso de um colóide tem sido particularmente preconizado para a preservação do pâncreas e polietilenoglicol parece ser uma exceção a esta regra. Quando o PEG 20000 foi substituído pela hidroxilamida na Solução da Universidade de Wisconsin, a solução resultante conhecida como cardiosol, demonstrou-se ser significativamente superior para a preservação do coração por vinte e quatro horas(Collins, 1997).

A preservação extracorpórea é baseada fundamentalmente no resfriamento que diminui a atividade metabólica. O metabolismo ainda continua durante a estocagem hipotérmica mesmo a 0°C(Hosgood e Nicholson, 2010). O resfriamento sozinho, sem um suprimento contínuo de metabólitos, é capaz de minimizar a perda lenta de função com o decorrer do tempo. A heterogeneidade do metabolismo das diferentes células renais e dos tecidos – glomerular, tubular, mesangial, vascular e urotelial – e os efeitos variáveis do frio na taxa dos processos metabólicos individuais tornam isso talvez surpreendente, já que a preservação por técnicas relativamente simples tem apresentado bons resultados(Hosgood e cols., 2011; Kay e cols., 2009; Marshall, 1984).

Existem dois métodos principais para a armazenagem a frio de rins de doadores falecidos. No armazenamento a frio estático, o rim é irrigado com uma solução de preservação e mantido em recipientes com gelo. A perfusão hipotérmica por máquina, oxigenada ou não, mantém o esfriamento do núcleo do rim bombeando continuamente a solução de conservação a frio através dele. Este processo deve reduzir o dano associado com o tempo da isquemia quente e fria ao assegurar uma distribuição uniforme do fluido de conservação ao longo do órgão(O'Callaghan e cols., 2013; Gomez e cols., 2012). A preservação através da máquina de perfusão com soluções cristalóides hipotérmicas melhorou a função dos

rins que sofreram danos de isquemia quente e também estendeu com segurança o período de preservação(Szajer e cols., 2004).

Enquanto os conceitos de preservação têm sido explorados por numerosos estudos clínicos, muitas questões críticas sobre os mecanismos, as composições ideais de soluções de preservação, duração e o método de conservação(pulsátil versus estático) permanecem mal definidos. Como o armazenamento a frio diminui a demanda metabólica celular, a preservação hipotérmica de órgãos tem sido tradicionalmente considerada a melhor opção para manter a viabilidade do tecido e da energia celular. No entanto, durante a hipotermia, o déficit de ATP aumenta rapidamente, levando a uma diminuição da atividade da sódio/potássio ATPase, contribuindo assim para maiores concentrações intracelulares de sódio, associadas com edema das células potencialmente letal, um efeito apenas parcialmente compensado pelas outras soluções de preservação(Parsons e Guarrera, 2014; Hosgood e cols., 2011; Bahde e cols., 2008).

1.4. Normotermia no Transplante Renal

Embora as técnicas de perfusão normotérmica experimental tenham sido primeiramente introduzidas no começo do século vinte pelo cientista e cirurgião francês Alexis Carrel, a perfusão do órgão ex-vivo isolado em temperaturas normotérmicas ganhou entusiasmo somente nas últimas décadas(Yong e cols., 2016; Vogel e cols., 2012).

A perfusão normotérmica ex-vivo tem recentemente sido introduzida para a prática clínica como uma nova técnica de preservação renal. O objetivo da perfusão normotérmica ex-vivo é restaurar a função do órgão e repor substratos energéticos no rim por um breve período imediatamente antes do transplante. Esta técnica que tem sido mostrada reverte alguns dos efeitos prejudiciais da preservação hipotérmica. Embora o tempo de isquemia quente seja relativamente curto, a adição da isquemia fria aumenta a severidade da lesão da isquemia e reperfusão e a probabilidade de disfunção precoce do enxerto(Hosgood e Nicholson, 2014; Hosgood e cols., 2013; Hosgood e cols., 2011).

Visto de uma perspectiva diferente, nenhuma vantagem caberia à utilização de um sistema de perfusão normotérmica, que induz uma sinalização precoce para o estresse ou a liberação de marcadores inflamatórios, posteriormente passíveis de amplificação na fase pós-transplante imediato(Fuller e cols., 2007).

Os efeitos da conservação e da perfusão normotérmica em vários parâmetros bioquímicos da função das células podem também ser analisados. O tecido do órgão pode ser utilizado para isolar mitocôndrias, lisossomos e microssomos e, portanto, pode ser usado para avaliar também o modo como a preservação e a reperfusão afetam a função das organelas subcelulares isoladas. Esta informação proporciona um perfil relativamente completo da competência funcional do órgão e identifica locais de lesão metabólica. Os sistemas subcelulares isolados podem indicar como a preservação afeta as funções metabólicas específicas do órgão; eles também podem revelar como os agentes locais específicos contidos em soluções de preservação afetam a função de organelas isoladas. A preservação da função mitocondrial é criticamente importante para a viabilidade celular(Southard, 1989).

A perfusão normotérmica compreende o transporte de oxigênio suficiente para manter os níveis celulares de ATP normais, a temperatura fisiológica para permitir funções celulares normais e o transporte de nutrientes para prevenir a depleção de substratos energéticos celulares. As vantagens são: evitar a lesão celular causada pelo frio, independentemente da isquemia; minimizar a injúria de isquemia e de reperfusão pela prevenção da depleção de ATP celular ou pela sua reversão em órgãos previamente sujeitos à isquemia(como nos doadores pós-morte cardíaca); permitir que a função do órgão seja avaliada durante a armazenagem, a fim de testar a viabilidade de órgãos de doadores de alto risco(Hosgood e Nicholson, 2014).

Rins de doadores de alto risco são particularmente susceptíveis a lesões durante a preservação hipotérmica. Técnicas de preservação normotérmica têm o potencial de serem adaptadas a métodos para manter a melhor viabilidade do tecido em comparação com as técnicas hipotérmicas e podem ser utilizadas para melhorar e avaliar o estado do órgão, o que pode ser particularmente benéfico para rins de doadores pós-morte cardíaca. Os mecanismos de proteção associados com a perfusão pulsátil permanecem em grande parte obscuro. Pode-se especular que a perfusão pulsátil pode não só fornecer nutrição e eliminação de toxinas, mas também sustentar mecanismos fisiológicos vasoprotetores mediados por fluxos

endoteliais, que podem afetar significativamente a lesão de isquemia e de reperfusão e eventos da resposta imune(Catena e cols., 2013).

A perfusão normotérmica poderia oferecer uma avaliação mais precisa e imediata de viabilidade em relação às técnicas de hipotermia. Outra vantagem clara de restaurar o metabolismo durante a conservação é a oportunidade de manipular e tratar os rins antes do transplante. A preservação normotérmica favorece processos celulares com a produção ativa de ATP. A preservação normotérmica também permite o tratamento de rins com agentes terapêuticos para melhorar a condição de preservação e segmentar os mecanismos de lesão de isquemia e de reperfusão após o transplante. Um fornecimento contínuo de perfusato quente e oxigenado é vital - qualquer falha técnica durante a preservação de um órgão humano pode ter um impacto desastroso, tornando o órgão inviável(Vogel e cols., 2012).

Rins de doadores de alto risco e após morte cardíaca exigem um apoio adicional durante a preservação para manter a viabilidade do tecido. Além disso, as técnicas de preservação normotérmica, têm um maior potencial do que simplesmente preservar a viabilidade. Eles podem ser usados como um método para proteger contra a preservação e a injúria de isquemia e reperfusão, ressuscitar o rim para instigar os mecanismos de reparação, regular genes específicos em matéria de condições agudas e crônicas e também permitir uma avaliação completa do rim antes de ser transplantado(Hosgood e Nicholson, 2011).

1.5. Máquina de Perfusão Renal

A perfusão hipotérmica do rim tornou-se um método cada vez mais estabelecido para a preservação renal. A preservação por estocagem hipotérmica estática permanece o padrão ouro na preservação renal(Guarrera e cols., 2010). Estudos clínicos têm demonstrado superioridade da preservação hipotérmica por máquina sobre o armazenamento a frio e esta modalidade provou ser um método confiável para a preservação renal(Vaziri e cols., 2011).

A perfusão hipotérmica por máquina(HMP) é uma técnica dinâmica de preservação onde a circulação contínua de solução de preservação permite a disponibilidade dos substratos metabólicos necessários para a geração de ATP. A

perfusão hipotérmica por máquina também gera um efeito de lavagem que melhora a microvasculatura após a reperfusão. A perfusão hipotérmica por máquina permite o transporte de anti-oxidantes durante a perfusão. A HMP tem sido mais usada para o transplante renal com dados mostrando superioridade na função precoce do enxerto e na sua sobrevida(Guarrera e cols., 2010).

Nos anos setenta, a perfusão pulsátil por máquina foi o método padrão de preservação para enxertos renais, embora tivesse poucos protocolos escritos. Foi realizada uma variedade de estudos comparando perfusão pulsátil por máquina com estocagem a frio. Esses estudos mostraram poucos benefícios da perfusão pulsátil por máquina sobre estocagem a frio; desta forma, no início dos anos oitenta, a estocagem a frio foi quase que universalmente adotada como um método de escolha de preservação. Contudo, o interesse foi renovado na perfusão pulsátil por máquina no início dos anos noventa por duas razões. Primeira, novas soluções de preservação foram desenvolvidas que pareciam melhorar os resultados com a máquina de perfusão, e segundo, com a persistente e piora da escassez de doadores, levando os profissionais a buscar novas fontes de rim para doação(Knight e Nicholson, 2001).

O trabalho de Le Gallois sobre a perfusão cardíaca e o de Bernard sobre a perfusão hepática são frequentemente citados na literatura. O desenvolvimento de sistemas de bombas para manter os fluxos de perfusão controláveis, fez a tecnologia avançar substancialmente, mas têm aparecido muitos outros problemas incluindo o fornecimento de soluções de preservação para perfusão, o fornecimento de oxigênio e de nutrientes, assim como evitar danos nos tecidos no estado extracorpóreo(Fuller e Lee, 2007).

O uso de órgãos de doadores de alto risco tornou-se um meio importante para a expansão do pool do doador de órgãos. Para esses órgãos, o método de conservação aplicado é de importância ainda maior do que para os doadores de órgãos de coração pulsátil(Moser e cols., 2016; Treckmann e cols., 2011).

Atualmente, o armazenamento a frio é o padrão ouro para a maioria dos procedimentos de preservação de órgãos, mas, por causa dos limites de eficácia deste método ter sido atingido e por causa do aumento do uso de doadores marginais de órgãos, o uso da máquina de perfusão recuperou interesse. Apesar dos grandes avanços na tecnologia de preservação, bem como a rotina clínica, a

função tardia do enxerto ainda representa um problema significativo no transplante renal(Forde e cols., 2016).

A perfusão hipotérmica pulsátil por máquina dos rins tem sido usada clinicamente por mais de trinta anos. A máquina de perfusão é considerada superior à estática de armazenamento a frio, por causa da menor incidência de função tardia do enxerto, uma melhor conservação durante os períodos mais longos do que vinte e quatro horas, a capacidade de monitorar o fluxo renal, a pressão e a resistência interna e avaliar a viabilidade renal, e a possibilidade de fornecer suporte metabólico durante a perfusão(Mozes e cols., 2005).

Numerosas vantagens da preservação hipotérmica por máquina têm sido relatadas na literatura. Este método pode diminuir o vasoespasma, enquanto fornece parâmetros adicionais, tais como o fluxo, a resistência, a temperatura e a pressão, o que permite uma avaliação de danos isquêmicos e a viabilidade do órgão como possíveis preditores de pós-transplante(Moers e cols, 2009).

A preservação hipotérmica por máquina oferece a possibilidade de melhorar a qualidade do órgão por terapias de intervenção farmacológica e de tipagem genética. Além disso, ela mantém a estimulação hemodinâmica da vasculatura, que desempenha um papel crítico em condições fisiológicas normais. Nos últimos anos, o interesse na preservação hipotérmica por máquina aumentou devido ao maior número de órgãos de doadores de alto risco que são predispostos à disfunção primária e à função retardada do enxerto. Na verdade, os enxertos de alto risco não só mostram o comprometimento da qualidade, mas também são mais propensos a insultos isquêmicos(Catena e cols., 2013).

A máquina de perfusão hipotérmica permite um fornecimento contínuo de oxigênio durante a preservação, juntamente com a remoção dos resíduos metabólicos. No entanto, o fornecimento de oxigênio durante o armazenamento de órgãos, como na máquina de perfusão hipotérmica, é provável que seja uma espada de dois lados; embora a presença de oxigênio diminua ou evite a lesão celular isquêmica, promove lesões mediadas por radicais livres. Isto é de particular interesse como as células isoladas em estudos demonstraram que a hipotermia, usadas como uma medida de proteção na preservação de órgãos aumenta a disponibilidade de ferro intracelular redox-ativo e na presença de oxigênio, origina um prejuízo celular mediado pelos radicais livres. Assim, de um ponto de vista mecanicista, o suprimento de oxigênio sob condições de hipotermia deve ser feito na

presença de quelantes de ferro para disponibilidade intracelular para evitar esses efeitos adversos do oxigênio(Jamieson, 2007).

Os benefícios da máquina de perfusão são mais claramente vistos em órgãos de doadores marginais. O pool particularmente importante de doadores de órgãos marginais e foco de atenção considerável é o doador de coração parado. A perfusão pode quebrar este ciclo através da manutenção ou reposição de substratos celulares durante o período de conservação. Esta perfusão pode ser feita antes do armazenamento ou logo antes do reimplante do rim(St Peter e cols., 2002).

Com o alargamento dos critérios para incluir os órgãos de doadores critérios expandidos e aqueles pós-parada cardíaca, a preservação estática está associada ao aumento da disfunção tardia do enxerto e à perda do enxerto. A preservação hipotérmica por máquina de perfusão está cada vez mais sendo usada como um método alternativo para o armazenamento estático a frio para conservação de enxertos obtidos de doadores não ótimos. Na verdade, vários estudos relataram uma maior redução da disfunção tardia do enxerto após a preservação por máquina de perfusão do que após o armazenamento a frio estático. A preservação por máquina de perfusão é particularmente eficiente na diminuição tanto da disfunção primária do enxerto como da disfunção tardia do enxerto em rins de doadores de critérios expandidos, bem como na redução da disfunção tardia do enxerto em rins de doadores pós-parada cardíaca(Bon e cols., 2012).

O perfusato deve fornecer oxigênio para o órgão por meio de um transportador de oxigênio. A hipotermia retarda o metabolismo, reduz a necessidade de oxigênio, e é claramente essencial para o armazenamento simples. No entanto, se o substrato celular contínuo é fornecido, isso não é mais um requisito absoluto. A hipotermia durante a perfusão permite menos oxigenação e taxas de fluxos mais baixas, mas também está associada com o aumento da resistência vascular e diminuiu a disponibilidade de oxigênio. Assim, um veículo de oxigênio pode não ser necessário para atingir o fornecimento de oxigênio adequado durante a preservação hipotérmica(St Peter e cols., 2002).

A máquina de perfusão normotérmica de órgãos isolados não é uma tecnologia inovadora. Na primeira metade do século vinte, Alexis Carrel e Charles Lindbergh perfundiram órgãos abdominais com soro oxigenado em normotermia e demonstraram a viabilidade durante vários dias(Yong e cols., 2016).

A preservação de um órgão por máquina em temperatura corporal representa uma inversão completa do pensamento atual em termos de preservação de órgãos. Em contraste com o armazenamento a frio, o princípio subjacente da preservação por máquina de perfusão normotérmica é manter o metabolismo celular em um ambiente fisiológico ao longo de todo o período de conservação. A isquemia é prevenida pela perfusão do órgão com meio rico em oxigênio; a circulação contínua de substratos metabólicos e a remoção de resíduos fornecem a base para a produção do ATP. Pelo fato do oxigênio ser consumido a uma taxa elevada pelos tecidos funcionando em normotermia, a solução de perfusão requer um transportador de oxigênio especializado, e o sangue é mais amplamente utilizado para este fim(Vogel e cols., 2012).

Vários outros estudos concluíram que os rins conservados em máquina de perfusão mostram melhor função precoce do que a preservação por armazenamento a frio. A importância da função inicial foi reforçada por vários estudos que mostram uma correlação entre a disfunção inicial do enxerto e a sobrevivência do enxerto a longo prazo. Está bem estabelecido que a perfusão por máquina proporciona períodos de preservação mais bem sucedidos. A preservação renal com sucesso foi conseguida pela máquina de perfusão por até cinco a sete dias(Guarrera e cols., 2010).

Atualmente, a armazenagem a frio estática e a máquina de perfusão são usadas em paralelo e em benefício de um sobre o outro conceito. As questões críticas referente ao perfusato ótimo para qualquer perfusão a frio estática ou pulsátil, o modo de perfusão(pulsátil ou contínua), a duração da conservação e os aditivos do perfusato permanecem controversos(O'Callaghan e cols., 2013). Atualmente no Brasil, a máquina de perfusão ainda é um procedimento com custo muito alto e utilizado por pouquíssimos centros de transplantes. É somente disponibilizada para os doadores com alto risco para disfunção retardada do enxerto.

1.6. Lesão de Isquemia e Reperfusão

A lesão de isquemia e reperfusão é um processo complexo, que envolve a fisiopatologia da hipóxia e/ou da reoxigenação, o edema induzido pelo desequilíbrio

iônico e a acidose, o stress oxidativo, o desacoplamento mitocondrial e a ativação da cascata de coagulação e do endotélio, que está associada com uma resposta imunológica pró-inflamatória(Snoeijs e cols., 2011). As principais consequências da lesão de isquemia e reperfusão renal são a disfunção renal primária do enxerto e a função retardada do enxerto ou a disfunção crônica do enxerto, os quais envolvem um regresso obrigatório do paciente para a diálise(Bon e cols., 2012; Thuillier e cols., 2011). A lesão de isquemia e reperfusão desencadeia uma complexa cascata de eventos que produz mais danos com a consequente ativação de mediadores inflamatórios, danos ao endotélio, bem como a ativação e a infiltração de neutrófilos com a geração de espécies reativas de oxigênio(Hosgood e cols., 2011; Kibondo e cols., 2010; Waller e cols., 2006).

A função tardia do enxerto e a necrose tubular aguda devido à lesão de isquemia e reperfusão têm sido associadas a episódios de rejeição aguda subsequentes, cuja incidência é um importante preditor de nefropatia crônica do enxerto, em si a causa mais comum de falha do enxerto(Heylen e cols, 2015). É claro, portanto, que as melhorias nas soluções de conservação podem ter benefícios significativos para os transplantes clínicos em todo o mundo(Requião-Moura e cols., 2015).

Distúrbios microcirculatórios devido à disfunção do endotélio vascular são um expoente comum durante a lesão de isquemia e reperfusão de órgãos sólidos, incluindo o rim. Espécies reativas de oxigênio geradas no local da mucosa vascular podem comprometer diretamente a homeostase e a função endotelial. Além disso, ânions superóxidos podem inativar o óxido nítrico derivado do endotélio através da formação de peroxinitrito e deste modo, evitar a vasodilatação mediada pelo óxido nítrico(Herrero e cols., 2006). Mais importante ainda, as células endoteliais são particularmente propensas à lesão induzida pelo frio dependente de ferro com formação intracelular de espécies reativas de oxigênio(Gallinat e cols., 2013).

Os efeitos das lesões de isquemia e reperfusão e o dano tecidual subsequente que se manifesta como disfunção tardia do enxerto pode tornar o órgão mais visível para o sistema imunitário do receptor e promover a ativação da imunidade inata e adaptativa contra o órgão do doador. Em particular, a peroxidação lipídica irá conduzir não só a membrana a danos e à ativação das vias do ácido araquidônico com subsequente liberação de prostaglandinas e de leucotrienos, mas também pode aumentar a susceptibilidade do tecido para a ativação do

complemento pela via alternativa. Tais mediadores pró-inflamatórios não só vão estimular a liberação de citocinas e quimiocinas pelo tecido danificado, mas também irá contribuir para uma resposta de fase aguda que promove ainda mais inflamação(Ahmad e cols., 2004).

Não somente a hipotermia, mas também a alteração abrupta de temperatura de hipotermia para normotermia, que ocorre no momento da reperfusão do enxerto renal, pode causar disfunção mitocondrial e ativação da via apoptótica mitocondrial(Deken e cols., 2016).

Estratégias para aliviar danos relacionados com as espécies reativas de oxigênio devem ter por objetivo limitar a sua produção durante a preservação a frio e no momento da reoxigenação e o reaquecimento, em vez da abordagem mais difícil de neutralizar estas moléculas já produzidas. Um terceiro elemento é a preservação da integridade da membrana celular, e, particularmente, os das células endoteliais, que estão em contato direto com a solução de armazenamento a frio durante a preservação. Além disso, é importante manter a integridade do glicocálice, que fornece tanto a proteção contra o edema como limita a visibilidade de moléculas alogênicas na superfície da membrana da célula endotelial(Bahde e cols., 2008).

1.7. Soluções de Preservação do Rim para Transplante

Muitas soluções de preservação foram desenvolvidas ao longo dos anos com esforços de pesquisas para encontrar soluções apropriadas, e uma das primeiras soluções para a preservação renal foi desenvolvida por G.M. Collins. A solução de Collins foi modificada pela organização Eurotransplante, retirando o magnésio sem efeito negativo nos resultados na preservação. Hoje em dia, as principais soluções para a preservação renal são a solução da Universidade de Wisconsin(UW) mais conhecida como solução de Belzer, a solução Histidina-Triptofano-Cetoglutarato(HTK ou Custodiol), a solução Celsior, a solução do Instituto George-Lopez(IGL-1), a solução PolySol, a solução EuroCollins, a solução citrato hipertônica ou a solução de Marshall(HOC) e a sacarose tamponada com fosfato - PBS(Muhlbacher e cols., 1999).

A introdução da solução de Belzer em 1988, representou um avanço importante, que permite o armazenamento a frio estático de rins e órgãos extra-renais por mais de doze horas. Uma variedade de outras soluções de preservação tem sido proposta desde então, incluindo a introdução com sucesso da solução de Bretschneider histidina-triptofano-cetoglutarato (HTK), Celsior ou a PolySol. A solução HTK tornou-se uma solução padrão estabelecida na preservação estática de rim e fígado, o equivalente a solução de Belzer(Gallinat e cols., 2013).

As soluções intracelulares são caracterizadas pelo teor elevado de potássio e baixo em sódio para evitar o edema celular. A primeira solução de estocagem estática a frio foi desenvolvida por Collins na década de sessenta. Uma pequena modificação realizada pela Fundação Eurotransplante em 1976, eliminou o magnésio, resultando na solução Eurocollins que foi usada principalmente na era antes da solução de Belzer ter sido desenvolvida(Masaki e cols., 2000). Esta solução EuroCollins foi padrão na Europa por quase quinze anos e é uma solução de preservação do tipo intracelular(Jamart e Lambotte, 1983).

O princípio básico da solução EuroCollins é baseado na filosofia da composição eletrolítica intracelular onde a concentração eletrolítica mimetiza o meio intracelular. Tem um forte tampão de fosfato e como um carreador para a carga osmótica para atingir uma condição hipertônica de 420 mOsmol, a glicose é usada. Este fato pode ser a maior desvantagem, porque mesmo sob condições hipotérmicas, a glicose é enzimaticamente discriminada pelo menos para o nível do lactato, que resulta na duplicação de moléculas de substrato intracelular seguida pelo edema celular(Muhlbacher e cols., 1999).

As pesquisas contínuas e sistemáticas por Folkert Belzer e Southard na década de oitenta levaram ao desenvolvimento da solução da Universidade de Wisconsin e sua introdução clínica em 1987. Os substratos metabolicamente inertes tais como o lactobionato e a rafinose servem como agentes osmóticos. O hidroxietilamido é usado como um colóide que previne o edema intersticial e tem um efeito benéfico nas metaloproteinases, mas aumenta a viscosidade. O colóide foi originalmente adicionado à solução de preservação para prevenir o edema tecidual devido à pressão hidrostática. Nesta solução, os compostos alopurinol e o glutathione são incluídos para prevenir a formação de espécies reativas do oxigênio(O'Callaghan e cols., 2013).

Esta nova solução de preservação introduz três novas filosofias: (a) a concentração osmótica não é a mais longa mantida pela glicose metabolicamente ativa, é melhor alcançada pela administração de substratos metabolicamente inertes como o lactobionato e a rafinose; (b) muita atenção é dada para a administração adicional do carreador colóide hidroxietilamido(HES); (c) a adição de captadores de radicais livres, adenosina, glutathione e o alopurinol. Os últimos três produtos químicos foram adicionados para as seguintes considerações: a adenosina como um precursor pronto-disponível para a síntese de ATP durante a reperfusão; o glutathione principalmente para fornecer uma proteção possível contra a lesão de radicais livres associada à reperfusão; e o alopurinol para inibir qualquer ativação da xantina oxidase durante a reperfusão(Muhlbacher e cols., 1999).

A solução de Belzer é considerada a solução de preservação padrão ouro para os rins, fígado, pâncreas e intestino delgado(Li e cols., 2016; Meine e cols., 2015; Vaziri e cols., 2011; Mangus e cols., 2006; Agarwal e cols., 2006; Agarwal e cols., 2005; Nardo e cols., 2005). Contudo, a desvantagem da alta viscosidade, alto preço e o fato que os captadores de radicais glutathione não podem ser detectados nas bolsas por análise clínica(presumivelmente devido a difusão) encorajou competidores a produzir novos compostos com melhores custos(Parsons e Guarrera, 2014).

Entre os principais componentes das soluções de preservação, os colóides são essenciais para prevenir ou minimizar o edema intersticial. O hidroxietilamido foi escolhido para a preparação da solução de Belzer, mas causou um aumento da agregação dos eritrócitos(Li e cols., 2016). Esta solução foi também testada prospectivamente em um estudo multicêntrico Europeu, onde a solução de Belzer foi superior à solução Eurocollins por diminuir a taxa de função tardia do enxerto de 33% para 23%(Ploeg e cols., 1992). Ela foi a primeira a conter lactobionato e rafinose, ambas relativamente grandes moléculas impermeabilizantes que efetivamente controlam o volume da célula(Faenza e cols., 2001). A solução de Belzer e a de Collins contém fosfato para controlar a acidose, e um alto nível de potássio para minimizar a perda deste cátion intracelular(Muhlbacher e cols., 1999).

A solução de Histidina-Triptofano-Cetoglutarato(HTK) foi introduzida por H.J. Brettschneider, que desenvolveu uma solução fisiológica cardioplégica em 1970. A filosofia básica é a introdução de um potente sistema tampão, que é a histidina, junto com outros dois substratos(Mangus e cols., 2006; Agarwal e cols., 2006; Nardo e

cols., 2005). O desenho básico desta solução consiste de um muito potente tampão, histidina, combinado com dois aminoácidos. O triptofano serve como um estabilizador de membrana e um anti-oxidante enquanto o cetoglutarato age como um substrato para o metabolismo anaeróbico durante a preservação(O'Callaghan e cols., 2013; Muhlbacher e cols., 1999).

Durante a hipotermia, a sódio/potássio ATPase está inativa. As soluções do tipo intracelular tal como a da solução de Belzer são atualmente consideradas importantes para preservar a viabilidade celular. O tipo extracelular tais como a solução HTK tem baixa concentração de potássio e alta concentração de sódio. Comparando a solução de Belzer com a HTK, rins conservados na solução HTK produzem maiores valores de espécies reativas do oxigênio(ROS). No entanto, a perfusão com HTK antes do armazenamento em solução de Belzer pode melhorar os resultados que são refletidos pela redução dos radicais livres(Nafar e cols., 2011).

A solução HTK está sendo cada vez mais usada na preservação dos órgãos abdominais como uma alternativa para a solução de Belzer. Contudo, têm existido preocupações sobre a eficiência da solução HTK para proteger contra a injúria da isquemia fria no rim, pâncreas e transplante de fígado(Hosgood e cols., 2010).

A solução de preservação Celsior, criada pelo grupo Pasteur-Merieux, é uma mistura do carreador impermeabilizante osmoticamente inerte da Solução de Belzer, lactobionato e manitol, e o forte tampão da solução HTK usando 30 mmol do tampão histidina, juntamente com a presença de glutathione reduzido como um antioxidante. Do ponto de vista dos eletrólitos, Celsior é uma solução rica em sódio, pobre em potássio que é única neste aspecto(Muhlbacher e cols., 1999). A solução Celsior foi desenvolvida inicialmente para a preservação cardíaca no começo dos anos noventa. É semelhante à solução de Belzer na composição e tem provado ser também útil na preservação de rins, fígados e pâncreas. Ao contrário da solução de Belzer, ela tem um elevado teor de sódio(100 mM) e um teor menor de potássio(15 mM), e tem relativamente baixa viscosidade, uma vez que não contém hidroxietilamida(O'Callaghan e cols., 2013; Barr e cols., 1997).

A solução IGL-1 foi desenvolvida na Europa em 2005, inicialmente usada na preservação de enxertos renais e, posteriormente, no transplante hepático. A IGL-1 é uma solução de conservação com duas novas modificações. Altos níveis de potássio na solução de Belzer foram criticados por induzir vasoconstrição e lesão endotelial(De Rougemont e cols., 2010). Na solução IGL-1, a concentração de sódio

é mais alta e a concentração de potássio é mais baixa para evitar efeitos vasoconstritores em células endoteliais e na microvasculatura. Além disso, a hidroxietilamida é substituída pelo polietilenoglicol(PEG), porque o colóide original na solução de Belzer mostrou estar associado com a agregação de glóbulos vermelhos e obstrução da microcirculação(Badet e cols., 2005; Van der Plaats e cols., 2004). A molécula de polietilenoglicol também tem efeitos vasodilatadores e anti-oxidantes. Os baixos níveis de potássio e altos níveis de sódio associado ao uso do PEG demonstraram serem benéficas ao diminuir o dano microcirculatório e, conseqüentemente, a lesão de isquemia e de reperfusão. Estudos têm demonstrado que a solução IGL-1 também diminui a resposta inflamatória, o dano mitocondrial e a lesão hepatocelular, quando comparada à Solução de Belzer(Badet e cols., 2005).

A solução PolySol tem sido recentemente introduzida com o objetivo de facilitar o transplante de órgãos isquêmicos(Catena e cols., 2013). Esta solução combina colóide, impermeabilizantes, tampões, varredores de radicais livres, aminoácidos, vitaminas para melhorar a energia e o metabolismo da gordura no fígado transplantado(De Rougemont e cols., 2010).

Ao longo de várias décadas, a solução de perfusão predominante para a máquina de preservação hipotérmica foi a Solução de Belzer-MPS, formulada por Belzer e Southard, em 1983, e manteve-se comercialmente inalterada ao longo dos anos. Hoje em dia, ela é distribuída sob o nome de KPS-1(Gallinat e cols., 2013). Além disso, em comparação com a solução de Belzer, a solução Belzer-MPS possui uma concentração aumentada de sódio(a partir de 30 a 100 mM) e um reduzido teor de potássio(125-25 mM) e tem o lactobionato e a rafinose substituídos por 30 mM de manitol e 85 mM de gluconato, como impermeabilizantes principais. Com base apenas no conteúdo iônico, a Solução Belzer-MPS é classificada como uma solução isotônica de tipo extracelular que imita o ambiente extracelular normal das células(Baicu, 2005).

A KPS-1, no entanto, não contém ácido lactobiônico e pode, portanto, promover alterações celulares devido aos íons redox de ferro ativos, durante a perfusão fria. Por contraste, a Solução de CND inclui fortes quelantes de ferro que já foram mostrados diminuir eficazmente a lesão celular mediada pelos radicais livres durante a preservação hipotérmica do fígado por máquina. O aumento da peroxidação lipídica durante preservação hipotérmica renal, por máquina e com KPS-1, evidenciado no presente estudo, também sugere maior formação de

espécies altamente reativas de oxigênio na KPS-1, em comparação com a Solução CND(Gallinat e cols., 2013; Minor e cols., 2015).

A AQIX é uma solução de preservação normotérmica, capaz de suportar a atividade celular em temperaturas normais. Um estudo anterior mostrou que a AQIX mantém a viabilidade em rins de porco lavados e estaticamente armazenados durante duas horas a 32°C numa solução na qual foi realizada uma pré-oxigenação. O elemento chave de preservação normotérmica é manter o rim num estado de fornecimento de oxigênio e de nutrientes fisiológicos normais para suportar o metabolismo aeróbico. Isto tem muitas vantagens, mas também uma desvantagem potencialmente importante, na medida em que é logisticamente difícil de implementar na prática clínica, quando se considera o equipamento adicional necessário para proporcionar este suporte metabólico. Mais praticamente, usando uma combinação de técnicas hipotérmicas e normotérmicas provou ser benéfico(Kay e cols., 2011).

A Solução PBS140 tem uma viscosidade mais baixa, tornando mais fácil a sua utilização e que permite a perfusão mais rápida e eficiente do órgão do doador. Todos estes fatores têm o potencial de melhorar significativamente os resultados de transplante, reduzindo o dano inicial do tecido no momento do transplante(Ahmad e cols., 2004; Song e cols., 2001).

O uso da molécula de polietilenoglicol demonstrou reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio e estabilizar a membrana dos fosfolípidios. A preservação dos órgãos com soluções que contêm polietilenoglicol também tem sido associada a uma resposta imunitária menos potente com base em taxas reduzidas de rejeições agudas, quando os órgãos foram perfundidos com polietilenoglicol. A molécula de polietilenoglicol pode interagir com moléculas de adesão de superfície, criando uma barreira física que acredita-se impedir a ativação das células T, mediadas pelo complexo maior de histocompatibilidade de classe II(Timsit e Tullius, 2011).

É, portanto, provável, que as moléculas de polietilenoglicol inibam ou reduzam o estresse oxidativo, principalmente através da preservação ou da restauração da integridade da membrana e, portanto, poderia proteger contra a produção de espécies reativas de oxigênio durante a lesão de isquemia e de reperfusão. Além disso, a prevenção do edema protege contra o edema mitocondrial, que por si só é

um fator que contribui para o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio(Hauet e Eugene, 2008).

Os polietilenoglicóis oferecem várias vantagens para a preservação: eles não são tóxicos, neutros e solúveis em água. Além disso, os polietilenoglicóis têm uma elevada afinidade com as moléculas de água ao longo da sua cadeia, resultando em camadas de água estruturadas quando adsorvidos à superfície da célula. Com efeito, os dados a partir de modelos experimentais indicam que os polietilenos glicóis são mais eficazes em melhorar a preservação do enxerto do que o hidroxietilamido(Thuillier e cols., 2011).

1.8. Glutamina e Alanina

Em 1873, Hlasiwetz e Habermann foram os primeiros a considerar a glutamina como sendo uma molécula com propriedades biologicamente importantes. Cerca de sessenta anos depois, Krebs, em 1935, demonstrou que as células possuíam a capacidade de sintetizar ou degradar glutamina. Em todas as células, a glutamina pode ceder átomos de nitrogênio para a síntese de purinas, pirimidinas e de aminoácidos(Cruzat e cols., 2009). O ciclo das purinas e a glutamato desidrogenase podem formar amônia a taxas significativas e aproximadamente iguais. O ciclo opera para formar amônia até que os níveis de ATP(e GTP) caiam para um nível crítico até que a amônia seja formada via glutamato desidrogenase(Bogusky e Aoki, 1982).

A glutamina é um aminoácido não essencial. Entre os aminoácidos utilizados para a síntese de proteínas é o aminoácido livre mais abundante no corpo. O volume de glutamina provavelmente é de mais ou menos 70 g/d em seres humanos sob circunstâncias normais pós-absortivas. Cerca de 30% deste fluxo de glutamina é derivada da degradação de proteínas e o restante é sintetizado de novo. O local mais importante da síntese de glutamina provavelmente é o músculo esquelético. Além disso, o cérebro, o tecido adiposo, o coração e os pulmões liberaram glutamina sob certas condições fisiológicas e patológicas. A função do fígado na síntese de glutamina é variável e depende, entre outros fatores, da homeostase ácido-básica; sob condições fisiológicas, o equilíbrio entre a glutamina hepática é próximo de zero.

Postulou-se que, sob condições de aumento da procura, fontes endógenas de glutamina podem tornar-se um fator limitante para a síntese de proteínas e de outros processos metabólicos; por esta razão, a glutamina é por vezes referida como um aminoácido essencial condicional. A glutamina tem um papel crucial como um veículo não tóxico de nitrogênio entre os órgãos. Assim, no estado de jejum normal, o rim capta glutamina a partir do sangue, embora o rim tenha mostrado liberar glutamina em certas circunstâncias. A absorção renal de glutamina no ser humano varia entre sete e dez gramas por dia, uma quantidade que é igual a 10-15% do fluxo de glutamina em todo o corpo. A glutamina é metabolizada principalmente pela glutaminase, enzima dependente de fosfato intramitocondrial; apenas mais ou menos 10% são metabolizadas pela gama-glutamil transferase ligada à membrana no túbulo proximal distal (Van de Poll e cols., 2004).

A glutamina é o aminoácido mais abundante no plasma de um mamífero e é transportada ativamente e metabolizada em quase todos os tecidos. Porque a glutamina pode ser sintetizada de novo, tem sido historicamente designada como um aminoácido "não essencial". Evidências recentes sugerem, no entanto, que isso pode ser um equívoco. Embora o corpo tenha normalmente grande reserva de glutamina e pode sintetizar glutamina em grandes quantidades, estados catabólicos tais como grandes cirurgias, traumas, sepse são caracterizados por taxas de consumo de glutamina de corpo inteiro que excedem a produção máxima de glutamina. Se o estresse catabólico persistir, a depleção de glutamina profunda se desenvolve e pode contribuir para um resultado pobre. Embora a glutamina seja abundante no sangue e nos tecidos, ela é também consumida rapidamente. Uma das razões para a sua extremamente alta taxa de rotatividade é a grande variedade de funções metabólicas que, direta ou indiretamente, dependem da glutamina. Embora a glutamina possa ser utilizada de forma diferente em tecidos diferentes e em diferentes estados fisiológicos, as suas funções dentro da célula geralmente são separadas em quatro categorias: (1) o seu papel no transporte do nitrogênio; (2) sua importância na manutenção do estado redox celular; (3) a sua posição como um intermediário metabólico e (4) e seu papel como fonte de energia (Labow e Souba, 2000).

As potenciais funções da glutamina no homem são: constituinte das proteínas (membranas, enzimas, transportadores, etc), precursora da amoniogênese renal, precursora da ureiogênese hepática, doadora de nitrogênio para a síntese das

bases púricas e pirimidínicas, precursora de neuromediadores(ácido glutâmico, ácido gama-amino-butírico), precursora da glicose, fonte de energia(linfócitos, macrófagos e enterócitos) e reguladora da síntese proteica(Darmaun, 1994).

O metabolismo de glutamina renal está intimamente ligado à homeostase ácido-básica. A glutamina é metabolizada através da glutaminase tubular renal e da glutamato-desidrogenase, dando origem a HCO^{-3} e NH^{-4} , este último sendo excretado na urina. A reação líquida resulta na excreção de íons de hidrogênio do corpo. Por isso, a glutamina é utilizada como uma forma de suporte de amônia, que desempenha um papel fundamental no equilíbrio ácido-básico. Este processo, no entanto, também fornece para a perda obrigatória de nitrogênio do corpo, sob a forma de amônia. A acidose aumenta o consumo renal de glutamina, mas não tem efeito demonstrável sobre o consumo de glutamina intestinal. Além da glutamina, a alanina representa outro aminoácido importante envolvido no transporte de nitrogênio a partir do músculo esquelético para outros órgãos do corpo. A alanina é absorvida principalmente pelo fígado e utilizada como um precursor da gliconeogênese. A glutamina pode em última análise, servir como um precursor da gliconeogênese, sendo convertida no intestino para alanina, a qual é então utilizada na síntese de glicose pelo fígado(Souba e cols., 1985).

A atividade de glutaminase produz amônia e glutamato. Existem essencialmente dois tipos principais de glutaminase no corpo, e as duas estão localizadas na mitocôndria. A glutaminase hepática é inibida por um pH baixo e a sua atividade está dependente da presença de amônia. Em contraste, as concentrações elevadas de amônia e de glutamato inibem a glutaminase renal. A glutamina derivada da degradação da glutamina renal na via de glutaminase pode ter mais de três destinos. O glutamato pode ser liberado para a circulação sistêmica, transaminando para formar alanina e α -cetoglutarato, ou ainda mais degradado na via de glutamato-desidrogenase, dando origem a α -cetoglutarato e amônia. O colapso renal de glutamina vai então liberar a amônia, que pode ser excretada na urina. O papel dos rins desempenhado no metabolismo inter-órgãos de aminoácidos é de importância tanto qualitativa como quantitativa. O metabolismo da glutamina é sujeito a uma regulação intensa e coordenada sobre uma base inter-órgãos entre o intestino, o fígado e o rim. Há também o eixo inter-órgãos proeminente entre o intestino e o rim no que diz respeito à conversão citrulina-arginina. Alguns oligopeptídios (por exemplo, o glutation e os dipeptídios contendo glutamina

administrados como suplementos nutricionais) são convertidos pelo rim aos seus componentes constituintes, antes de poderem ser utilizados em processos metabólicos. O rim pode funcionar como mediador crucial dos efeitos benéficos da administração de glutamina como dipeptídeo. A evidência sugere que alguns efeitos benéficos da suplementação de glutamina administrada a humanos são realmente mediados pelo metabolismo intestinal prévio de glutamina para citrulina, que é seguido pela conversão renal de citrulina em arginina (Van de Poll e cols., 2004).

A glutamina aumenta a expressão da HSP-70 no tecido renal e também tem efeitos antioxidantes. Estes resultados fornecem forte evidência de que os efeitos renais protetores da glutamina são principalmente relatados por seus efeitos anti-inflamatórios melhor do que seus efeitos antioxidantes diretos. A glutamina preveniu a lesão renal aguda, diminuiu o TNF-alfa e aumentou o glutathione numa dose dependente. O pré-tratamento com glutamina significativamente restaurou os níveis de glutathione. Isto foi esperado uma vez que a glutamina é um precursor importante para a síntese de glutathione. É também conhecido que a glutamina é um indutor da HSP-70, uma importante proteína citoprotetora contra vários estresses celulares. Todos estes resultados indicam que a glutamina pode exercer sua proteção renal através da ativação da HSP-70 (Peng e cols., 2013; Bessems e cols., 2005).

A glutamina e a alanina contribuem para 60% a 65% do nitrogênio dos aminoácidos exportados pelo músculo esquelético durante estados de stress ou na sequência de tratamento com glicocorticóides. As concentrações de glutamina no plasma são significativamente reduzidas, no entanto, apesar da sua liberação acelerada do músculo, indicando que a captação de glutamina por outros órgãos deve exceder a liberação do músculo. O fígado foi geralmente considerado como sendo o órgão central do metabolismo de aminoácidos, mas estudos recentes têm demonstrado uma absorção rápida de glutamina pelo intestino, acompanhada pela produção de alanina. Muhlbacher e colaboradores em 1984 demonstraram que os glicocorticóides mediam um declínio na glutamina muscular intracelular e aumentam o efluxo de aminoácidos. O intestino delgado é o principal órgão do consumo de glutamina. Os estudos *in vitro* utilizando glutamina isotopicamente marcada demonstram que cerca de 40% de nitrogênio da glutamina é convertido em amônia, enquanto 25% aparecem em alanina. Além disso, a glutamina parece ser um combustível respiratório preferido, com cerca de 60% dos carbonos de glutamina sendo oxidado a CO². O trato gastrointestinal é bem adequado para a oxidação de

glutamina, uma vez que a amônia gerada durante este processo é liberada para o sangue da veia porta e convertido em uréia pelo fígado antes de atingir a circulação sistêmica(Souba e cols., 1985).

Em concentrações fisiológicas dos aminoácidos glicina e alanina protegem os túbulos isolados dos coelhos da injúria hipóxica. O rim isolado e perfundido de rato permite o estudo da função renal no rim intacto. As concentrações fisiológicas de glicina e as concentrações suprafisiológicas de alanina protegem os túbulos proximais isolados de coelhos da injúria hipóxica. No rim intacto as ações da glicina e da alanina provavelmente são mais complexas do que nos túbulos corticais isolados, uma vez que os aminoácidos têm efeitos diretos na perfusão renal, filtração e na oxigenação(Endre e cols., 1994).

A glutamina tem várias propriedades únicas que sugerem que ela desempenha um papel importante nos estados normais e patológicos. Do conjunto total de aminoácidos livres intracelulares no músculo, a glutamina representa cerca de 60%. A glutamina é disponibilizada através do metabolismo de aminoácidos endógenos no músculo. Os aminoácidos de cadeia ramificada são absorvidos pelo músculo e os seus nitrogênios removidos pela transaminação. O destino do nitrogênio presente é para formar glutamina e alanina. A glutamina e a alanina transportam dois terços do nitrogênio do aminoácido circulante. A glutamina é um importante combustível para um número de células que se dividem rapidamente. Esta oxidação fornece energia, e o seu carbono e o nitrogênio fornecem precursores para a síntese de purinas e pirimidinas, quando necessário para DNA, RNA e RNAm de síntese, tal como demonstrado pela elevada taxa de utilização da glutamina no sistema imune e em células que se dividem rapidamente, por exemplo, nos enterócitos, nas células tumorais e nos fibroblastos. A glutamina é usada pelo rim para combater a acidose através da produção de amônia. No trato gastrointestinal, a glutamina serve como um combustível oxidativo e é convertida em amônia e em alanina. Uma redução uniforme de aproximadamente 50% no pool livre de glutamina no músculo é uma das características mais típicas das respostas ao catabolismo. Embora a glutamina seja um aminoácido não essencial no sentido clássico, no sentido estritamente bioquímico é essencial. A glutamina tem duas porções aminas: um grupo α -amino e um grupo amida. Esta característica está subjacente à sua importância como um transportador de nitrogênio e um transportador de amônia. Uma vez que a glutamina é liberada a partir do músculo esquelético em quantidades

maiores do que a sua ocorrência na proteína muscular, deve surgir como um resultado do metabolismo dos aminoácidos. A biossíntese da glutamina a partir de glutamato e da amônia é catalisada pela síntese de glutamina numa reação dependente de ATP. Muitos autores relatam a captação de glutamato do músculo, e em particular, as cadeias de carbono de valina, isoleucina, asparagina, aspartato e glutamato que são convertidas em glutamina. O glutamato é formado a partir de α -cetoglutarato; o último é produzido na primeira parte do Ciclo de Krebs a partir do citrato, que por sua vez resulta da reação de condensação entre a acetil-CoA e do oxaloacetato, catalisada pela citrato sintase. A transaminação com um dos aminoácidos envolvidos na sua síntese irá produzir glutamato. Existem dois caminhos possíveis através dos quais o nitrogênio do segundo aminoácido pode ser convertido em amônia e, assim, ser incorporado em glutamina. A amônia pode ser produzida pela glutamato desidrogenase, que está presente no músculo. O glutamato é um precursor para a síntese de glutamina ou doador de amina para a síntese de alanina. A glutamina é usada pelo rim para combater a acidose através da produção de amônia urinária. A glutamina é absorvida no trato gastrointestinal e serve como um combustível oxidativo(Moskovitz e cols., 1994).

A utilização renal de glutamina para tamponar o íon hidrogênio irá aumentar a excreção de amônia, e ainda aumentar a perda de nitrogênio na urina. Estas vias podem explicar, em parte, a perda obrigatória de nitrogênio que tem sido associada com o estresse da lesão e infecção. O processamento de glutamina e de alanina pelo trato gastrointestinal, pelos rins e pelo fígado parecem ser uma característica central da presente resposta metabólica ao estresse(Souba e cols., 1985).

Em condições normais, tanto o fígado como o músculo liberam glutamina, enquanto a absorção pelo rim e pelo trato gastrointestinal quantitativamente equilibra esta versão. Grande interesse está sendo mostrado em novos substratos e, em particular, para glutamina. Esta nova abordagem tem induzido uma explosão de novas informações sobre a assimilação do peptídeo, bioenergéticos celulares e mecanismos de transporte. A depleção de glutamina está presente em muitos estados catabólicos(Moskovitz e cols., 1994).

O fígado é geralmente considerado como o principal, se não o exclusivo, local para gliconeogênese em seres humanos pós-absortivo. Além disso, apesar do fato de que a glutamina e a alanina são convertidas em glicose a taxas semelhantes, parece haver pouca ou não absorção de glutamina pelo fígado humano. Os tecidos

intestinais poderiam absorver glutamina e convertê-la para alanina, que pode então ser convertida em glicose no fígado. No entanto, estudos recentes, que indicam que apenas 5% da alanina são derivadas da glutamina, lançam dúvidas sobre a importância quantitativa desta. O fígado tanto pode usar e produzir glutamina, bem como outros precursores gliconeogênicos. Tem sido desde há muito conhecido, a partir de estudos em animais e in vitro, que o rim tem uma capacidade substancial para a gliconeogênese e que a glutamina é um importante substrato para a gliconeogênese renal. Além disso, parece provável que esta liberação renal de glicose pode ser em grande parte o resultado da gliconeogênese, porque o rim humano normalmente contém pouco glicogênio, e as células que poderiam armazenar glicogênio têm falta de glicose-6-fosfatase. A gliconeogênese global de alanina foi responsável também por 5% de aparecimento sistêmico de glicose no estado pós-absortivo; no entanto, em contraste com a glutamina, a produção renal de glicose a partir de alanina representa menos de 5% da gliconeogênese geral de alanina, tanto no estado pós-absortivo como durante a infusão de epinefrina. O rim foi o local predominante para a gliconeogênese de glutamina, enquanto que a conversão de glicose de alanina foi essencialmente limitada ao fígado. A captação de glutamina normalmente responde por mais de 60% de todos os aminoácidos absorvidos pelo rim humano pós-absortivo. A absorção renal de glutamina é mais do que suficiente para explicar toda a glicose produzida a partir de glutamina pelo rim, tanto no estado pós-absortivo. Os presentes estudos indicam que parece haver pouca gliconeogênese a partir de alanina renal em seres humanos e que a conversão da glicose para alanina ocorre principalmente no fígado. Tem sido demonstrada que a capacidade do rim para produzir glicose a partir de alanina varia consideravelmente entre as espécies. Estas observações fornecem uma possível explicação para a discrepância entre a captação hepática limitada de glutamina e a contribuição de glutamina para gliconeogênese. O rim humano normalmente tem pouco glicogênio, e as células que poderiam armazenar glicogênio têm falta de glicose-6-fosfatase e, portanto, não pode liberar glicose livre via glicogenólise. Por conseguinte, é provável que toda ou quase toda a glicose liberada pelo rim é devida à gliconeogênese. Se assim for, a gliconeogênese renal seria responsável por cerca de metade da gliconeogênese global. Os resultados do presente estudo indicam que a gliconeogênese da glutamina ocorre primariamente no rim e que a gliconeogênese de alanina ocorre quase exclusivamente no fígado (Stumvoll e cols., 1998).

Tem sido sugerido que a utilização de glutamina pode ser um caminho para o fornecimento de ATP, o que seria exigido por tais células metabolicamente ativas. No entanto, a quebra de glutamina por linfócitos e macrófagos é apenas parcial, com glutamina, aspartato e amônia sendo os principais produtos. A via para a oxidação parcial de glutamina foi denominada glutaminólise. Se a geração de energia a partir de glutamina foi importante, então seria de esperar que o carbono seria totalmente oxidado através do ciclo do ácido cítrico, o que parece estar presente em tais células. Uma segunda sugestão é que a degradação da glutamina proporciona intermediários para a biossíntese de nucleotídeos de purina e de pirimidina, os quais são necessários para a síntese de DNA e de RNA por estas células. Outra hipótese sugere que a elevada taxa de glutaminólise é importante para proporcionar as condições ótimas para a regulação precisa das taxas de síntese de nucleotídeos de purina e de pirimidina em momentos específicos do ciclo celular. A glutaminólise fornece amônia e o aspartato, que são necessários para a síntese de nucleotídeos de purina e de pirimidina: a glutamina também fornece nitrogênio durante a formação de glucosamina, GTP e NAD^+ . Seja qual for o seu papel, a elevada taxa de utilização de glutamina pelos linfócitos e macrófagos sugere que esta disposição pode ser importante para a manutenção da função imune. Todas as funções das células imunes que foram examinadas in vitro são dependentes da concentração de glutamina. Tem sido sugerido que o nível de glutamina no plasma reduzido contribui, pelo menos parcialmente, para a imunossupressão que acompanha tais situações. A depleção de glutamina em resultados in vivo em situações de imunossupressão e muitos de stress no homem estão associados com os níveis de glutamina no plasma reduzidos (Calder, 1994).

O glutathione é um antioxidante importante, crítico para a proteção dos tecidos dos danos dos radicais livres. Pode existir uma relação entre o efeito protetor da glutamina e o da biossíntese do glutathione. O glutathione é um tripeptídeo consistindo em glutamato, cisteína e glicina e sob várias condições experimentais, a porção glutamato da molécula é derivada da glutamina. O glutathione é um importante antioxidante e um componente vital das defesas do hospedeiro. Em adição à proteção contra a lesão de radicais livres, é importante na ativação de linfócitos, crítico para a função das células assassinas naturais e a citotoxicidade mediada por linfócitos, e pode ter um papel na proteção dos neutrófilos e macrófagos contra o dano oxidativo. Em contraste com o glutamato, a glutamina é eficientemente

transportada através das membranas celulares e pode ser um precursor mais prontamente disponível para a síntese de glutathione. Estes dados sugerem que a glutamina pode aumentar as defesas do hospedeiro, fornecendo reforçada proteção antioxidante (Hong e cols., 1992).

Aproximadamente um terço de todo o nitrogênio proveniente do metabolismo da proteína é transportado no sangue sob a forma de glutamina. Do mesmo modo, uma grande porção de nitrogênio fornecido pelo músculo esquelético, no estado pós-prandial é exportada como glutamina. Este desvio de nitrogênio fornece um meio não tóxico do transporte de amônia a partir da periferia para as vísceras. Depois de alcançar seu órgão-alvo, a amônia pode ser regenerada para a excreção ou ureiagênese. Na verdade, a glutamina é a principal fonte de nitrogênio utilizada na ureiagênese hepática. Na mitocôndria, a amônia é derivada da glutamina por hidrólise da glutamina em glutamato pela enzima glutaminase. A hidrólise do glutamato para um cetoglutarato pela enzima desidrogenase do glutamato também pode gerar amônia. No fígado, a amônia pode combinar com o CO_2 para formar fosfato de carbamilo, o qual posteriormente entra no ciclo da uréia. O grupo amino no glutamato e a glutamina podem também entrar no ciclo da uréia diretamente através de uma reação que envolve oxaloacetato para gerar aspartato. Uma das principais funções do fígado é a manutenção da homeostase da amônia no interior do corpo. O metabolismo da glutamina é distribuído heterogeneamente por todo o fígado, com consumo de glutamina pela glutaminase concentrada nos hepatócitos periportais e a síntese de glutamina via glutamina sintetase localizada dentro dos hepatócitos perivenosos. Esta distribuição fornece o fígado com um mecanismo para desintoxicar o sangue de amônia, contribuindo simultaneamente com glutamina para o fornecimento do sistema. O uso de glutamina como um serviço de transporte de nitrogênio também é importante na excreção de resíduos azotados e a manutenção da homeostase ácido-básica. Historicamente, a glutamina tem sido classificada como um aminoácido "não essencial", ou nutricionalmente dispensável, porque mesmo quando ausente da dieta pode ser sintetizada em grandes quantidades. A glutamina é um aminoácido com um papel central em diversas funções celulares. Seu destino metabólico celular varia entre os sistemas de órgãos, mas inclui o transporte de nitrogênio, o controle redox celular e das proteínas e a biossíntese de nucleotídeos; e é uma fonte de ATP. A depleção deste nutriente pode ter efeitos profundos sobre a fisiologia de órgãos, tais como a perda da integridade do intestino

e da imunossupressão. Embora existam mecanismos de controle para aumentar a produção de glutamina endógena, esses mecanismos podem ser insuficientes(Labow e Souba, 2000).

Um aspecto importante do papel bem estabelecido do rim no metabolismo ácido-básico envolve a produção de amônia, o que permite que o rim compense a acidose. A glutamina é o precursor principal da amônia renal no homem, no cão, no rato e, com mais de 90% da amônia total produzida sendo derivada desse aminoácido. A disponibilidade da glutamina para a produção de amônia no rim de mamíferos envolve o seu transporte em células do túbulo proximal. Essencialmente, toda a glutamina filtrada no glomérulo é reabsorvida nos túbulos proximais e, uma vez que a extração renal de glutamina é maior do que a taxa de filtração glomerular durante a acidose, tanto a membrana basal-lateral como as membranas luminais em borda em escova devem estar envolvidas no acúmulo intracelular de glutamina. A glutamina é transportada pelas membranas renais em borda em escova isoladas de ratos por um sistema saturável dependente de sódio e do pH. A glutamina não é um inibidor potente da entrada de ácido glutâmico e nem é o ácido glutâmico um forte inibidor da absorção de glutamina. A absorção de glutamina é inibida por diversos aminoácidos e a glutamina pode compartilhar um sistema de transporte com eles. Aparentemente, a adição do grupo de nitrogênio da amida proporciona uma alteração estrutural que faz glutamina semelhante a ambos os aminoácidos neutros e dibásicos para o transporte. A importância do metabolismo renal de glutamina foi estabelecida há muito tempo. A glutamina é o precursor principal de amônia urinária em cães. Isto também foi demonstrado ser verdade no homem e rato. O rim de mamíferos tem dois caminhos para a utilização de glutamina para produzir amônia urinária. A principal via envolve a glutaminase. A via de menor importância envolve a glutamina transaminase. Ambas estas enzimas estão localizadas na célula do túbulo proximal e são dependentes de um acúmulo intracelular de glutamina. Assim, o transporte é um passo importante que conduz à desaminação da glutamina e a produção de amônia urinária. O transporte luminal é extremamente eficaz na reabsorção de glutamina e evita perdas excessivas de glutamina na urina. Em condições normais menos de 1% da glutamina filtrada aparece na urina. A opinião prevalente é que a glutamina é transportada ativamente no túbulo proximal de células a partir do filtrado glomerular, levando ao acúmulo intracelular de glutamina.

O transporte de glutamina envolve a difusão passiva e reflete a taxa de utilização pelas vias de desaminação da glutamina presentes na célula(Weiss e cols., 1978).

A glutamina é hidrolisada para amônia e glutamato nos túbulos renais e a amônia produzida nesta reação está envolvida na excreção de íons hidrogênio pelo rim. A glutaminase renal dependente de fosfato (PDG), que se pensa ser a principal enzima envolvida na desamidação da glutamina renal, está localizada na membrana interna - compartimento da matriz da mitocôndria renal. Assim, a glutamina citoplasmática deve atravessar a membrana mitocondrial interna para que possa haver desamidação da PDG. Esta membrana é impermeável à maioria dos intermediários metabólicos e a entrada ou a saída destes compostos ocorre por transporte mediado por transportador. Vários trabalhos mostraram que um sistema de transporte de glutamina está presente na membrana interna das mitocôndrias renais. Este sistema é específico para a glutamina (e vários análogos próximos) e é adaptável - a sua atividade aumenta significativamente durante a acidose metabólica. No entanto, não há uma estreita correlação entre a adaptação do sistema de transporte e do aumento de produção de amônia renal. O glutamato não é um inibidor do transporte de glutamina mitocondrial(Goldstein, 1976).

A glutamina, assim como outros aminoácidos, é conhecida por inibir a proteólise. A glutamina, também desempenha um papel na ativação de proteínas de choque térmico, que protegem contra a isquemia e a lesão de reperfusão no coração. O efeito citoprotetor da glicina é relacionado com a inibição de proteases calpaína-like, que são ativadas durante a isquemia do fígado, e para um possível impacto sobre os níveis de glutathione, uma vez que a glicina é um componente deste antioxidante. A alanina é conhecida por preservar o pool de ATP(Bessemis e cols., 2005).

A glutamina sintetase, que catalisa a conversão dependente de ATP de glutamato e amônia em glutamina, é expressa de uma forma específica no tecido. A glutamina sintetase remove amônia ou glutamato e produz glutamina. As células que funcionam principalmente para remover o glutamato ou a amônia parecem conter níveis muito elevados de glutamina sintetase, enquanto que as células que sintetizam a glutamina parecem conter níveis muito mais baixos. A regulação da expressão da glutamina sintetase é complexa(Van Straaten e cols., 2006). A suplementação com glutamina tem sido sugerida para estimular o aumento da síntese de proteínas musculares e a ressíntese de glicogênio e melhorar o seu

desempenho. A glutamina é produzida a partir do glutamato e da amônia pela enzima glutamina sintetase no tecido muscular(Rogero e cols., 2006).

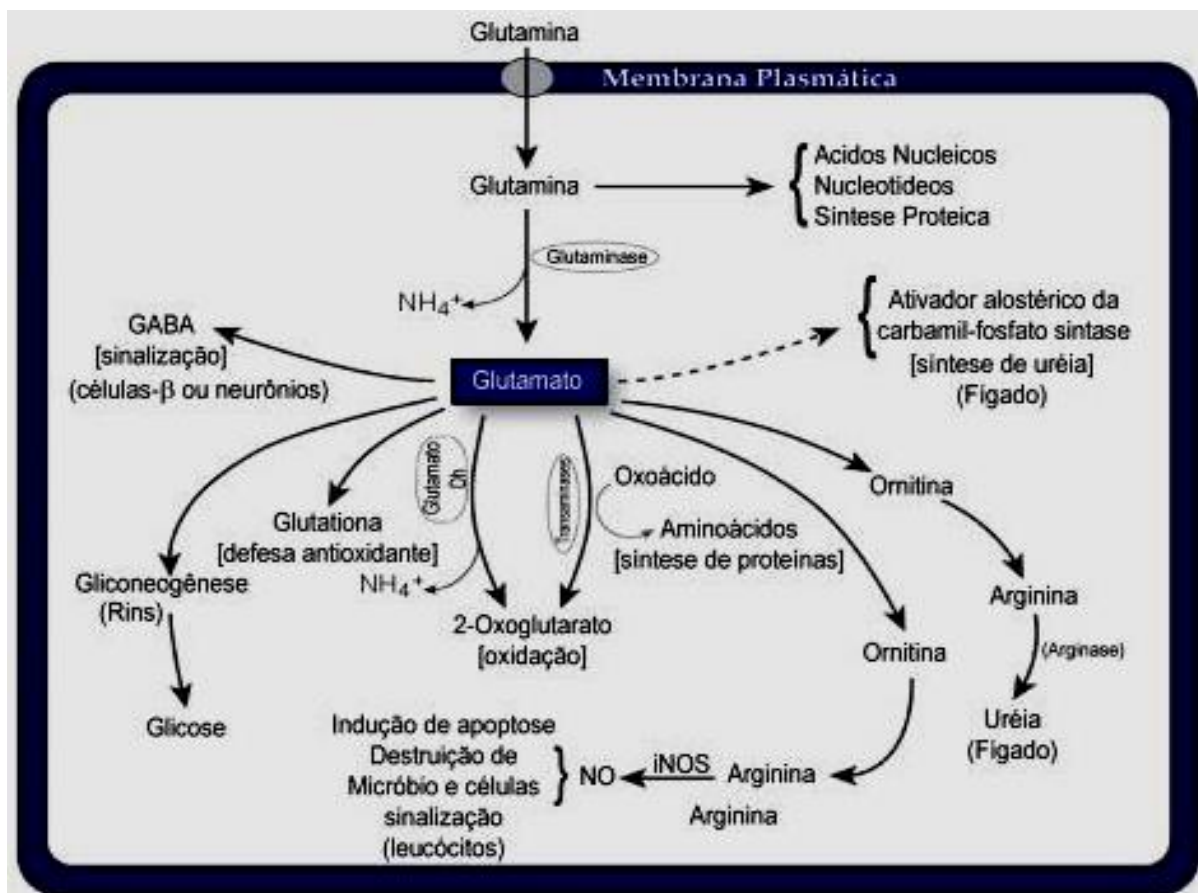


Figura 1. Metabolismo da Glutamina(Moretszohn e cols., 2007).

1.9. Glutathione

Um dos substratos que se tem adicionado às soluções de perfusão é o glutathione(GSH), gamaglutamilcisteinilglicina, um tripeptídeo com ações oxi-redutoras que integra numa concentração muito alta o tecido renal. Fonteles e colaboradores em 1974 evidenciaram em seu trabalho que com o processo da perfusão renal havia uma depleção importante de GSH e que com a adição deste substrato à solução havia uma recuperação do estado de depleção deste tripeptídeo. A estocagem fria de células tubulares humanas causa um marcado aumento na produção de radicais

livres, sugerindo que a adição de substâncias anti-oxidantes às soluções de preservação minimizaria a lesão do órgão causada pela estocagem(Salahudeen e cols., 2000).

O glutathion foi primeiramente detectado em 1888 e sua estrutura aprovada para síntese em 1935. Ele é um importante agente oxi-redutor 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).

A condição do glutathion intracelular é um importante determinante da suscetibilidade a diversas formas de lesões induzidas quimicamente e patologicamente. Através das ações da glutathion peroxidase, da glutathion redutase, e da glutathion S-transferase, as funções do GSH agem na desintoxicação das espécies reativas de oxigênio e de eletrófilos. As diferenças de atividades destas enzimas, e, conseqüentemente, a capacidade das células para usar o GSH para a desintoxicação e a manutenção da homeostase redox, podem determinar a susceptibilidade a lesões. Observações anteriores de que as células tubulares distais dos néfrons são mais susceptíveis à depleção de ATP na hipóxia ou os inibidores químicos da produção de ATP celular são consistentes com a conclusão de que as diferenças na função mitocondrial são determinantes importantes de respostas celulares a condições tóxicas ou patológicas. Embora as mitocôndrias tenham sido identificadas como alvos intracelulares frequentes para muitos produtos químicos citotóxicos, pouco se sabe sobre a regulação da condição do GSH mitocondrial. A regulação da condição do GSH celular nos rins, bem como em vários outros tecidos é compartimentalizada, envolvendo processos que ocorrem na membrana plasmática, no citossol, no retículo endoplasmático, no núcleo e na mitocôndria. As mitocôndrias são de particular importância para a condição redox do GSH porque essas organelas são os locais intracelulares primários de consumo de oxigênio e podem ser fontes significativas de espécies reativas de oxigênio. O estresse oxidativo mitocondrial tem recebido atenção renovada recentemente sobre o seu papel na lesão celular e nas diversas patologias. Na membrana plasmática, o GSH é transportado para as células renais tubulares proximais através da membrana basolateral por um transportador dependente de íons sódio e pode funcionar para fornecer GSH exógeno para as células tubulares proximais para

protegê-los de danos oxidativos; o GSH é transportado para fora das células renais tubulares proximais através da membrana de borda em escova por uma membrana transportadora potencial-sensível. O pool mitocondrial de GSH não é derivado a partir da síntese de novo de GSH, mas a partir de transporte de GSH citosólico através da membrana interna(Lash e cols., 1998).

O glutathione é um tiol de baixo peso molecular predominante em células de mamíferos e desempenha um papel importante nas defesas celulares contra o stress oxidativo. Embora o GSH reaja espontaneamente com alguns eletrófilos, a maioria de tais reações requerem catálise por uma família de enzimas conhecidas como as GSH S-transferases(Griffith, 1999).

Uma vez que a glutathione é o doador sulfidrílico biológico mais comum, pode proteger os grupos sulfidrílico em proteínas críticas de oxidação. Por outro lado, o glutathione poderia simplesmente fornecer substratos para a oxidação para o rim. Uma vez que as enzimas de degradação de glutathione estão presentes no rim, o tripeptídeo pode ser hidrolisado para os seus aminoácidos constituintes, glutamato, cisteína e glicina; estes podem ser submetidos a degradação oxidativa e, assim, proporcionar energia metabólica. Este parece ser tanto mais provável, já que o ácido glutâmico e a glicina são conhecidos por estar presentes numa concentração muito elevada no rim(Fonteles e cols., 1976).

Foi fornecida evidência substancial para um papel do rim no turnover metabólico do glutathione extracelular. Em estudos do destino do glutathione extracelular tem sido proposto que a degradação ocorre principalmente na superfície luminal da membrana renal da borda em escova e que a gama-glutamyl transpeptidase é uma glutathionase agindo sobre o glutathione extracelular(Haberle e cols., 1979).

Em modelos animais de transplante, a superóxido dismutase e a glutathione redutase estão esgotadas na fase de isquemia fria, devido à sua biossíntese reduzida e a excessiva geração de radicais livres. Após o transplante de rim, a glutathione peroxidase aumenta no plasma, e depois de aproximadamente três meses, é que se aproxima dos níveis normais. Uma correlação inversa entre o nível de creatinina e da atividade da glutathione peroxidase plasmática é observada em pacientes após o transplante renal. O monitoramento da atividade da glutathione peroxidase plasmática pode ser um marcador útil adicional da função do enxerto. Os radicais livres são gerados durante a reperfusão de órgãos isquêmicos. Estudos

experimentais têm demonstrado que o dano produzido pela reperfusão pode ser impedido por um captador de radicais livres(Nafar e cols., 2011).

O GSH intracelular é um componente essencial de defesa celular contra as substâncias oxidantes e os vários outros tipos de estresses tóxicos e patológicos. A manutenção das concentrações adequadas de GSH e o estado reduzido tiol-dissulfeto dentro das células é necessário para a função adequada. As células do rim, em particular as da região tubular proximal, são susceptíveis a agentes que alteram o estado redox celular. Isto é devido a uma elevada taxa metabólica basal e uma alta taxa de transporte metabólico(Weinberg e cols., 1987).

As células renais tubulares proximais estão expostas ao GSH extracelular de duas maneiras: o GSH no plasma, principalmente derivado do efluxo a partir do fígado, ou é submetido à filtração glomerular, entra no lúmen, e atinge a membrana de borda em escova, ou entra no plasma peritubular e atinge a membrana basal-lateral. A medição das atividades de várias enzimas do metabolismo de drogas relevantes dependente de GSH e de outros mostraram que as células proximais tubulares têm atividades significativamente mais elevadas do que as das células tubulares distais de GSH peroxidase. As concentrações intracelulares de GSH nas células tubulares proximais são apenas modestamente(isto é, cerca de 25%) maiores do que aquelas nas células tubulares distais, e a atividade da gamaglutamilmcisteína sintetase é semelhante nas duas populações de células. Os resultados mostram que as células proximais tubulares renais podem ativamente acumular GSH do meio extracelular para concentrações que são várias vezes maiores que as concentrações iniciais de GSH. Altas atividades de oxidação e de degradação foram também encontradas, indicando que a degradação, captação de aminoácidos constituintes e a ressíntese intracelular de GSH podem também ser um mecanismo para preservação do estado intracelular de oxi-redução, embora a ressíntese intracelular de GSH não tenha sido um meio eficiente de aumentar o conteúdo intracelular de GSH. A manipulação celular renal de GSH envolve primariamente três processos: transporte de membrana, oxidação e degradação. Desde que as enzimas responsáveis pela degradação de GSH estão na membrana plasmática da borda em escova e tem seus sítios ativos voltados para o líquido extracelular, um secundário componente da manipulação renal de GSH é a captação dos aminoácidos constituintes seguido por ressíntese de GSH. As enzimas que catalisam a oxidação do GSH estão presentes na membrana basolateral e dentro da

célula, tal que outro componente secundário da manipulação renal é a captação do glutathione dissulfeto(GSSG) e a redução intracelular de volta para GSH. A manutenção do conteúdo suficiente de GSH e do bom estado redox GSH/GSSG é essencial para a função celular normal. Outros estudos também demonstraram que o GSH protege as células extracelulares tubulares proximais renais de lesão oxidativa. Por isso, a adição de GSH ao meio extracelular pode ser um importante método de evitar ou neutralizar o dano oxidativo às células tubulares proximais renais. A degradação predomina na ausência de inibidores do turnover de GSH, mas a absorção de GSH pode desempenhar um papel quantitativamente significativo que é maior do que a redução ou a biossíntese, particularmente sob condições patológicas ou toxicológicas onde o GSH intracelular pode ser depletado(Visarius e cols., 1996).

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Com o advento dos transplantes de órgãos e a necessidade crescente de mais doadores é primordial o aprimoramento das soluções preservadoras com a finalidade de minimizar os danos aos novos órgãos. Após a etapa do cuidado agudo e intensivo ao doador, a isquemia do enxerto passa a ser o fator que mais compromete a viabilidade e o sucesso inicial do transplante. Desta forma a pesquisa por melhores soluções preservadoras de órgãos que reduzam estes efeitos danosos à função renal é de suma importância.

3. OBJETIVOS

Com o intuito de minimizar os efeitos lesivos à integridade do néfron e evitar dano à função renal do rim transplantado, testamos a adição de diferentes substratos numa solução de perfusão rica em potássio e magnésio, conhecida como solução A. Adicionando glutathione, glutamina, alanina ou alanilglutamina poderemos

evitar ou diminuir as lesões causadas pela isquemia fria? Ou mesmo atenuar os efeitos do tempo prolongado da isquemia fria devido protocolos de alocação de órgãos?

Avaliamos os efeitos destes substratos em diferentes concentrações em vários parâmetros como resistência vascular, fluxo urinário, ritmo de filtração glomerular, transporte absoluto e percentual de sódio, potássio e de cloreto, clearance osmolar e de água livre. A avaliação do possível consumo e utilização destas substâncias como citoprotetores.

A principal razão do estudo metabólico e funcional consistiu no uso da preparação do rim isolado de coelho em preparações normotérmicas e em subnormotermia a 22°C.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais de Experimentação

Coelhos Califórnia, do sexo masculino, provenientes da cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará pesando em média 1400 g e variando entre 800 e 2000 g foram mantidos em gaiolas, com ingestão livre de água e ração padronizada para coelhos. Nas vinte e quatro horas que antecederam o experimento, os animais foram mantidos em jejum alimentar, com ingestão de água ad libitum. A pesquisa está registrada no Conceia sob o número 4160237/2015.

4.2. Grupos de Animais

Foram usados um total de quarenta e seis coelhos os quais foram divididos nos seguintes grupos:

Grupo controle(SOLA): os animais deste grupo foram perfundidos com solução A contendo 4 g% de albumina bovina. Este grupo é constituído por oito animais(n=8).

Grupo glutamina 1 mM(GL1): os animais deste grupo foram perfundidos com solução A mais 4 g% de albumina bovina e acrescida de glutamina 1 mM. Este grupo foi constituído por cinco animais(n=5).

Grupo glutamina 1 mM + glutathione 2 mM(GL1GSH2): os animais deste grupo foram perfundidos com solução A mais 4 g% de albumina bovina e foi adicionado à esta solução 1 mM de glutamina + 2 mM de glutathione. Este grupo foi constituído por seis animais(n=6).

Grupo glutamina 1 mM + glutathione 4 mM(GL1GSH4): os animais deste grupo foram perfundidos com solução A mais 4 g% de albumina bovina e foi adicionado à esta solução 1 mM de glutamina + 4 mM de glutathione. Este grupo foi constituído por seis animais(n=4).

Grupo glutamina 1 mM + alanina 2 mM(GL1AL2): os animais deste grupo foram perfundidos com solução A mais 4 g% de albumina bovina e adicionada de glutamina 1 mM + alanina 2 mM. Este grupo foi constituído por quatro animais(n=4).

Grupo glutamina 3 mM(GL3): os animais deste grupo foram perfundidos com solução A mais 4 g% de albumina bovina e acrescida de glutamina 3 mM. Este grupo foi constituído por cinco animais(n=4).

Grupo alanylglutamina 2 mM(ALGL2): os animais deste grupo foram perfundidos com solução A mais 4 g% de albumina bovina e foi adicionado à esta solução 2 mM de alanylglutamina. Este grupo foi constituído por quatro animais(n=4).

Grupo alanylglutamina 5 mM(ALGL5): os animais deste grupo foram perfundidos com solução A mais 4 g% de albumina bovina e adicionada de alanylglutamina 5 mM. Este grupo foi constituído por seis animais(n=6).

Grupo subnormotermia(HIP): os animais deste grupo foram perfundidos com solução A mais 4 g% de albumina bovina e adicionada de 1 mM de glutamina + 2 mM de glutathione sob subnormotermia(22°C). Este grupo foi constituído por cinco animais(n=5).

Estes grupos estão resumidos na tabela 1.

Solução de Perfusão	Número de animais
Solução A com 4 g% albumina	8
Solução A com 4 g% albumina + glutamina 1 mM	5
Solução A com 4 g% albumina + glutamina 1 mM + glutation 2 mM	6
Solução A com 4 g% albumina + glutamina 1 mM + glutation 4 mM	4
Solução A com 4 g% Albumina + glutamina 1 mM + alanina 2 mM	4
Solução A com 4 g% albumina + glutamina 3 mM	4
Solução A com 4 g% albumina + alanilglutamina 2 mM	4
Solução A com 4 g% albumina + alanilglutamina 5 mM	6
Solução A com 4 g% albumina + glutamina 1 mM + glutation 2 mM em condições de subnormotermia(22 °C).	5

Tabela 1. Grupos de experimentos.

4.3. Procedimento Cirúrgico

Os animais foram 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, foi administrada através da veia marginal da orelha do animal uma solução de manitol a 20% contendo 400 mg e posteriormente procede-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 foram recobertas com compressas de gaze umedecidas em solução salina aquecida a 37° C. O ureter esquerdo foi 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 foi cuidadosamente isolada, e o seu pedúnculo vascular retirado, sendo a glândula então removida.

Ligou-se em seguida a artéria mesentérica, procedendo-se então a ligadura e retirada do rim contralateral, que foi imediatamente pesado. A seguir o coto proximal da artéria renal direita foi amarrado próximo à aorta. Após todas as estruturas estarem completamente suturadas e isoladas foi 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 foi introduzida na aorta iniciava-se a perfusão renal “in situ”, com ligadura simultânea da aorta acima da artéria renal. Alguns destes detalhes podem ser visualizados na imagem 1.

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 foi seccionada e simultaneamente clampeada abaixo do ponto de secção. Isolada a preparação foi feita uma lavagem rápida com solução salina aquecida a 37°C e a imediata transferência para o circuito de perfusão.

Maiores detalhes deste procedimento do ponto de vista cirúrgico podem ser complementados pela leitura do trabalho de pós-graduação de Elizabete de Moraes em 1984, depositado na Biblioteca da Faculdade de Medicina.

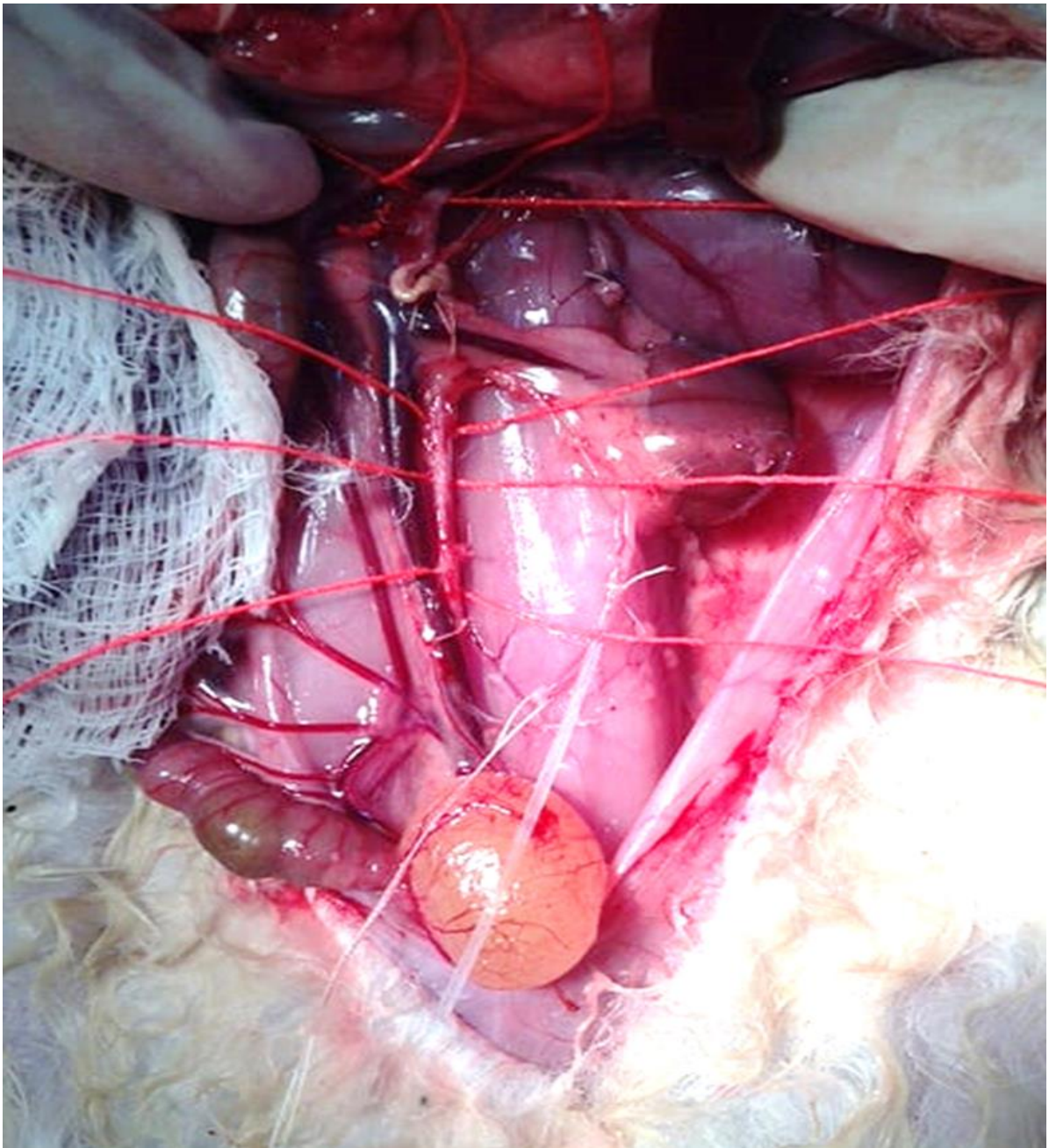


Imagem 1. Incisão abdominal de 1 cm, abaixo do apêndice xifoide á região hipogástrica; vasos colaterais e ureter canulado, além dos fios posicionados nos vasos abdominais de grande calibre; artéria mesentérica e glândula suprarrenal ligadas, fios posicionados abaixo e acima do tronco celíaco.

4.4. Sistema de Perfusão Renal

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

- a) Uma bomba Flexflo(modelo N° A-1860-V), previamente calibrada para fluxo de 20-200 mL/min, com medida simultânea da resistência na ponta da cânula;
- b) Linha de perfusão do tipo teflon previamente esterilizada;
- c) Filtro milipore de 8 µm 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 cateter 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 ou a 23 °C, conforme o tipo da experiência;
- j) Uma bomba aquecedora com termostato.

O sistema de perfusão está representado em diagrama a seguir na imagem 2 e na figura 2.



Imagem 2. Sistema de perfusão utilizado nos experimentos(Campos, 1989; Adaptado por Fonteles).

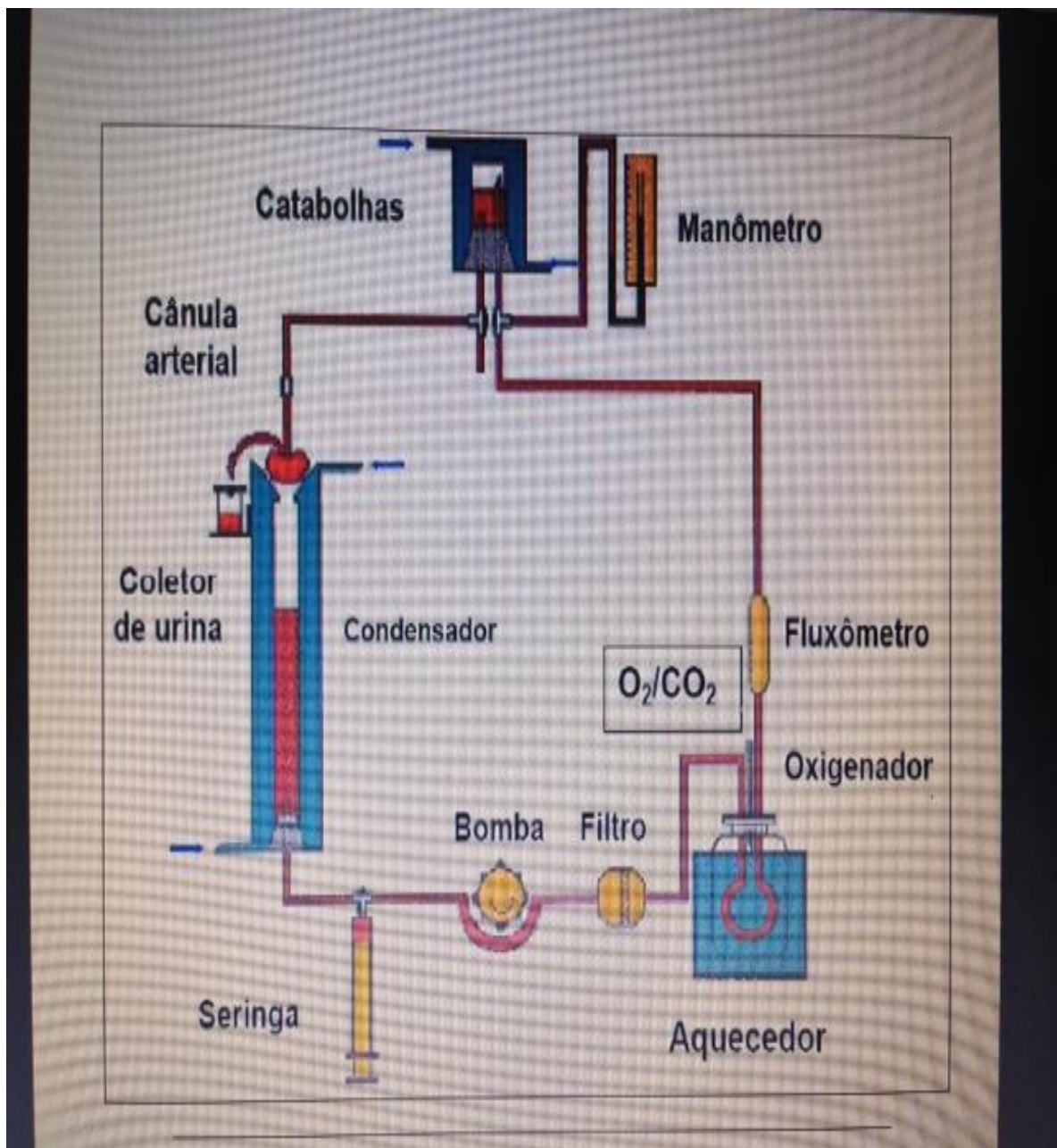


Figura 2. Esquema do sistema de perfusão de rim isolado que foi utilizado para a pesquisa(Campos, 1989).

4.5. Solução de Perfusão Renal

Uma solução de perfusão conhecida como solução A (rica em potássio e em magnésio) contendo 4 gramas de albumina bovina/100 mL foi utilizada. A Solução A foi preparada com a seguinte composição, em mmol/L: NaCl: 96,2; KCl: 40,3; CaCl₂: 1,7; MgSO₄: 12,5; NaHCO₃: 11,9; e glicose: 11,1.

O perfusato que foi 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.

Procedeu-se então à diluição da albumina bovina na concentração de 4 g/100 mL, sendo após esta etapa distribuída em alíquotas em membranas de celofane (Dialysis Sacks 250-7 U, Sigma, St. Louis-USA). Antes do início do experimento, o perfusato foi filtrado em membrana milipore de 0,8 µm, o pH foi 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, glutathione (GSH) 2 e 4 mM nos seus respectivos grupos de tratamento, glutamina na concentração de 1 e 3 mM nos seus respectivos grupos, alanina 2 mM, alanilglutamina 2 e 5 mM.

4.6. Protocolo de Perfusão Renal

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 foram 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 foi coletada uma amostra de perfusato e após os dez minutos iniciais foi colhida a segunda amostra de perfusato, registrando-se na ocasião as leituras de fluxo e de pressão. A cada intervalo de dez minutos repetiam-se estes procedimentos até completar noventa minutos de observação.

Imediatamente após a colheita, as amostras foram congeladas a - 20° C. A colheita do perfusato foi feita no período intermediário de cada duas coletas de urina.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL



Adaptado de Nogueira, A, A, R; Estudos do efeitos da Bradicinina na função renal de ratos, 2011

32

Figura 3. Protocolo experimental com tempo total de aproximadamente 150 minutos.

4.7. Parâmetros Fisiológicos no Rim Perfundido

Foram estudados os seguintes parâmetros fisiológicos durante a perfusão renal:

1)Peso do Rim: o peso do rim contralateral(direito) foi determinado imediatamente após a nefrectomia, sendo utilizado para as determinações de fluxo de perfusato e de resistência vascular, bem como medidas de sódio, potássio e cloreto. Ao final da perfusão, também foi 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 era 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⁺): era obtido pelo produto do RFG e da concentração de sódio no perfusato(PNa⁺). $FNa^+ = RFG \times PNa^+, (\text{uEq/g/min})$.

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

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

10)Percentual de Sódio Transportado(%TNa⁺): era 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⁺). $FK^+ = RFG \times PK^+, (\text{uEq/g/min})$.

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

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

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

15)Cloreto Filtrado(FCl⁻): era o produto do ritmo de filtração glomerular(RFG) pela concentração de cloreto no perfusato (PCl⁻). $FCl^- = RFG \times PCl^-$, (uEq/g/min).

16)Cloreto Excretado(ECl⁻): era o produto do fluxo urinário(FU) pela concentração de cloreto na urina. $ECl^- = FU \times UCl^-$, (uEq/g/min).

17)Cloreto Transportado(TCl⁻): resultado da diferença entre o cloreto filtrado(FCl⁻) e o cloreto excretado(ECl⁻). $TCl^- = FCl^- - ECl^-$, (uEq/g/min).

18)Percentual de cloreto Transportado(%TCl⁻): resultado da divisão do produto cloreto transportado(TCl⁻) x 100 pelo cloreto filtrado(FCl⁻). $\%TCl^- = (TCl^- \times 100 / FCl^-)$.

19)Clearance Osmolar(COsm): resultado do produto da relação osmolaridade urinária(UOsm)/osmolaridade do perfusato(POsm) pelo fluxo urinário(FU). $COsm = \frac{UOsm}{POsm} \times FU$, (mL/g/min).

POsm

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

4.8. Análises Bioquímicas

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

Na determinação de inulina no perfusato e na urina foi utilizada 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 eliminava-se inteiramente a fase de desproteínização e embora os reagentes sejam os mesmos, a fase de aquecimento no clássico banho-maria foi substituída por blocos metálicos. Podia-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 permitiam a utilização de volumes até dez 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.).

4.9. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Resolução(HPLC)

As amostras de perfusato e de urina foram analisadas para quantificação dos substratos utilizados neste trabalho. O aparelho utilizado foi o ultimate 3000 punt, ultimate 3000 autosampler, column compartment, ultimate 3000 rs variable wavelength detector. Foram analisadas no perfusato as amostras no P0, P30, P60 e P90 e na urina nos tempos 30, 60 e 90 minutos.

O Método utilizado foi a derivatização pré-coluna com PITC. O fenilisotiocianato(PITC) reage com aminoácidos para formar derivados de feniltiocarbamil(PTC) que podem ser detectados com alta sensibilidade a 245 nm. Por conseguinte, a derivatização pré-coluna de aminoácidos com PITC seguida por uma separação por HPLC em fase reversa com detecção UV é utilizada para analisar a composição de aminoácidos. Depois de o reagente ser removido sob vácuo, os aminoácidos derivatizados podem ser armazenados secos e congelados

durante várias semanas sem qualquer degradação significativa. Se a solução injetável é mantida fria, não ocorre perda perceptível na resposta cromatográfica após três dias.

A separação de PTC-aminoácidos num HPLC de fase reversa com coluna ODS é realizada através de uma combinação de alterações nas concentrações de acetonitrilo e de resistência iônica do tampão. Os precipitados do PTC-aminoácidos a partir da coluna são monitorizados a 254 nm. O limite do detector é considerado como 1 pmol para a maioria dos derivados de aminoácidos. A linearidade das respostas é obtida na gama de 20 a 500 pmol com coeficientes de correlação superiores a 0,999. Para obter bons dados de composição, as amostras maiores do que 500 ng de proteína/peptídeo antes da hidrólise são as mais adequadas para esta análise de aminoácidos de proteínas/peptídeos.

A integração e os cálculos dos picos isolados nos cromatogramas são realizados usando um software milinium 32 da Waters Co. As concentrações de todos os componentes de interesse em cada injeção são calibrados contra a quantidade do padrão externo(quantidade conhecida de glutamina e de arginina). O cálculo final para corrigir o fator diluente é dado usando o programa Excel.

4.10. Substâncias Utilizadas na Perfusão Renal

Sais utilizados no preparo da solução A:

Cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio dihidratado, sulfato de magnésio hepta-hidratado, bicarbonato de sódio e glicose.

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

Substâncias adicionadas à solução de perfusão:

glutation reduzido(GSH), inulina – SIGMA

glutamina, alanina e alanilglutamina - SIGMA

penicilina G potássica - FONTOURA WYETH

Anestésicos:

uretano - MERCK

pentobarbital sódico - CLIN-MIDY

Anticoagulantes:

heparina - ROCHE

manitol – MERCK

4.11. Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise em computador com o programa SPSS versão 20. Os seguintes cálculos foram efetuados: média, desvio padrão, erro padrão da média e mediana. A normalidade da distribuição das variáveis observadas foi realizada através do teste de Kolmogorov-Smirnov e a igualdade de variâncias através do teste de Shapiro-Wilk. Por período, o teste de igualdade dos tratamentos em função da distribuição das variáveis foi realizado através do teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes e, quando rejeitada a hipótese de igualdade dos tratamentos, foi realizada uma comparação de dois a dois os tratamentos. Por tratamento, o teste de igualdade dos períodos em função da distribuição das variáveis foi realizado através do teste de Wilcoxon para amostras pareadas e, quando rejeitada a hipótese de igualdade dos períodos, realizou-se a comparação entre dois a dois os períodos. Os testes têm um 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.

5. RESULTADOS

5.1. Perfusão renal com solução A contendo 4 g% de albumina a 37°C.

Os primeiros resultados desta série de experimentos estão apresentados na tabela 2. Todos os parâmetros funcionais estão ali sumarizados.

Oito animais foram utilizados neste grupo, intitulado como solução A. Os rins destes animais foram perfundidos durante noventa minutos com solução A contendo somente 4 g% de albumina bovina a 37°C, previamente dialisada. Os fluxos de perfusato variaram de 10 a 33 mL/min.

A análise da tabela 3 revela que a resistência vascular manteve-se estável durante todo o procedimento variando a média de 5,16 a 5,62 mmHg/mL/g/min ($p = 0,824$). Com relação ao fluxo urinário houve durante a perfusão uma redução que chegou a quase 50% começando com uma média de 0,120 e terminando com uma média de 0,061 mL/g/min sendo estatisticamente significativa ($p < 0,001$). No tocante ao ritmo de filtração glomerular ele começou de fato a cair nos últimos 30 minutos da perfusão, variando com uma média de 0,206 a 0,078 mL/g/min ($p < 0,004$).

A reabsorção de sódio em termos absolutos a média variou de 2,53 a 9,40 uEq/g/min evidenciando uma queda a medida que transcorre a perfusão ($p = 0,315$) e com relação ao percentual de transporte de sódio ele se mantém estável até o minuto 60 para então começar a cair variando a média de 19,02 a 38,38% ($p = 0,754$). Com relação ao transporte absoluto de potássio a média variou de -0,050 a 0,325 uEq/g/min, mostrando uma tendência de queda nos últimos vinte minutos ($p = 0,182$) e o percentual de transporte de potássio a média variou de -15,0 a 10,37%, começando bem negativo e finalizando menos negativo ($p = 0,337$).

O transporte absoluto de cloreto mostrou uma tendência de queda começando com uma média de 8,75 e terminando com uma média de 1,95 uEq/g/min ($p = 0,736$) e o percentual manteve-se mais ou menos estável variando a média de 12,55 no começo até 28,31% no minuto 60 e voltando a cair novamente chegando a uma média de 20% ($p = 0,860$). Com relação ao clearance osmolar houve uma tendência de queda começando com uma média de 0,113 e terminando com uma média de 0,060 mL/g/min sendo significativa ($p < 0,001$) e o clearance de água livre manteve-se estável variando a média de 0,001 a 0,007 mL/g/min ($p = 0,071$).

Tabela 2. Dinâmica de perfusão de rins perfundidos com solução A contendo 4 g% de albumina bovina a 37 °C.

TP	R	FU	RFG	TNa ⁺	%TNa ⁺	TK ⁺	%TK ⁺	TCI ⁻	%TCI ⁻	Cosm	CH2O
10	5,62±0,68	0,11±0,02	0,15±0,03	4,80±1,52	27,86±5,33	0,07±0,40	-15,00±10,87	3,37±1,09	12,55±6,54	0,107±0,02	0,005±0,001
20	5,29±0,72	0,12±0,03	0,21±0,07	9,40±4,08	33,66±6,65	1,05±0,47	5,12±7,10	8,75±3,85	24,22±6,28	0,113±0,03	0,007±0,003
30	5,22±0,79	0,09±0,03	0,14±0,04	5,92±2,42	36,40±5,80	0,62±0,41	10,37±6,34	5,46±2,29	28,01±4,72	0,086±0,02	0,005±0,002
40	5,31±0,65	0,08±0,02	0,11±0,03	3,64±1,30	32,77±7,42	0,11±0,28	-8,51±12,88	3,20±1,18	23,58±6,86	0,073±0,02	0,003±0,001
50	5,38±0,63	0,07±0,02	0,11±0,03	4,00±1,46	36,48±6,12	0,33±0,42	2,59±14,03	3,49±1,44	27,26±6,57	0,069±0,02	0,002±0,001
60	5,16±0,60	0,07±0,02	0,11±0,03	4,27±1,45	38,38±7,49	0,21±0,63	-1,41±18,34	3,71±1,50	28,31±8,10	0,064±0,02	0,003±0,001
70	5,24±0,56	0,06±0,01	0,09±0,02	3,03±0,93	33,42±4,95	0,29±0,23	3,93±11,46	2,50±0,71	25,66±5,33	0,059±0,01	0,004±0,001
80	5,49±0,61	0,06±0,01	0,08±0,02	2,69±0,88	28,85±8,42	0,12±0,16	-3,16±13,79	2,17±0,64	21,92±7,79	0,061±0,01	0,003±0,001
90	5,38±0,52	0,06±0,01	0,08±0,02	2,53±0,66	27,98±10,20	-0,05±0,31	-3,13±16,05	1,95±0,66	20,04±10,44	0,060±0,01	0,001±0,001

Os resultados são expressos em média ± e.p.m.; oito animais foram utilizados neste grupo; TP: tempo(min); R: resistência vascular(mmHg/mL/g/min); FU: fluxo urinário(mL/g/min) $p < 0,001$; RFG: ritmo de filtração glomerular(mL/g/min) $p = 0,004$; TNa⁺: transporte absoluto de sódio(μEq/g/min); %TNa⁺: percentual do transporte de sódio; TK⁺: transporte absoluto de potássio(μEq/g/min); %TK⁺: percentual do transporte de potássio; TCI⁻: transporte absoluto de cloreto(μEq/g/min); %TCI⁻: percentual do transporte de cloreto; Cosm: clearance osmolar(mL/g/min) $p < 0,001$; CH₂O: clearance de água livre(mL/g/min).

5.2. Perfusão Renal com solução A contendo 4 g% de albumina e glutamina 1 mM a 37°C.

Cinco animais fizeram parte deste grupo de perfusão. Os rins destes animais foram perfundidos durante noventa minutos com solução A contendo 4 g% de albumina bovina e glutamina 1 mM a 37°C, previamente dialisada. Os resultados deste grupo estão demonstrados na tabela 3. Os fluxos de perfusato variaram de 17,5 a 38 mL/min.

Avaliando o parâmetro resistência visualizamos que ela mantém-se estável durante toda a perfusão variando a média de 4,23 a 4,81 mmHg/mL/g/min($p = 0,719$). Com relação ao fluxo urinário podemos observar um crescimento até os trinta minutos para depois começar a cair, a média variando de 0,177 a 0,313 mL/g/min($p = 0,806$). Quando avaliamos o ritmo de filtração glomerular observamos um crescimento inicial até o minuto 30 para depois cair até o minuto 60 e voltar a subir, variando a média de 0,243 a 0,333 mL/g/min($p = 0,867$).

O transporte absoluto de sódio a média variou de 3,66 a 12,34 uEq/g/min mostrando uma tendência de aumento no minuto 40 e no minuto 80($p = 0,620$). O transporte percentual de sódio decresceu até o minuto 30 voltando a subir logo em seguida variando a média de 18,63 a 36,01%($p = 0,680$). Com relação ao transporte absoluto de potássio ele esteve negativo até o minuto 40 e então começou a subir, variando a média de -0,99 a 1,98 uEq/g/min($p = 0,060$) e o transporte percentual de potássio mostra uma tendência de crescimento variando a média de -15,39 a 19,57%($p = 0,144$). O transporte absoluto de cloreto iniciou um processo de queda até o minuto 40 voltando a subir e ficar estável até o minuto 70 variando a média de -0,41 a 10,12 uEq/g/min($p = 0,632$) e o transporte percentual de cloreto mostrou também uma queda até o minuto 30, quando voltou a subir e ficar estável até o minuto 70 e voltando a subir novamente variando a média de 4,43 a 25,89%($p = 0,614$). Com relação ao clearance osmolar observou-se um aumento até o minuto 30 para em seguida começar um processo de queda variando a média de 0,175 a 0,289 mL/g/min($p = 0,657$) e o clearance de água livre iniciou um aumento até o minuto 30 voltando a subir no minuto 60 e cai no minuto 80, variando a média de 0,002 a 0,029 mL/g/min($p = 0,467$).

Com relação à concentração de substratos, a glutamina no perfusato diminui à medida que transcorre a perfusão numa média que varia 4307 a 4769 uM. Na

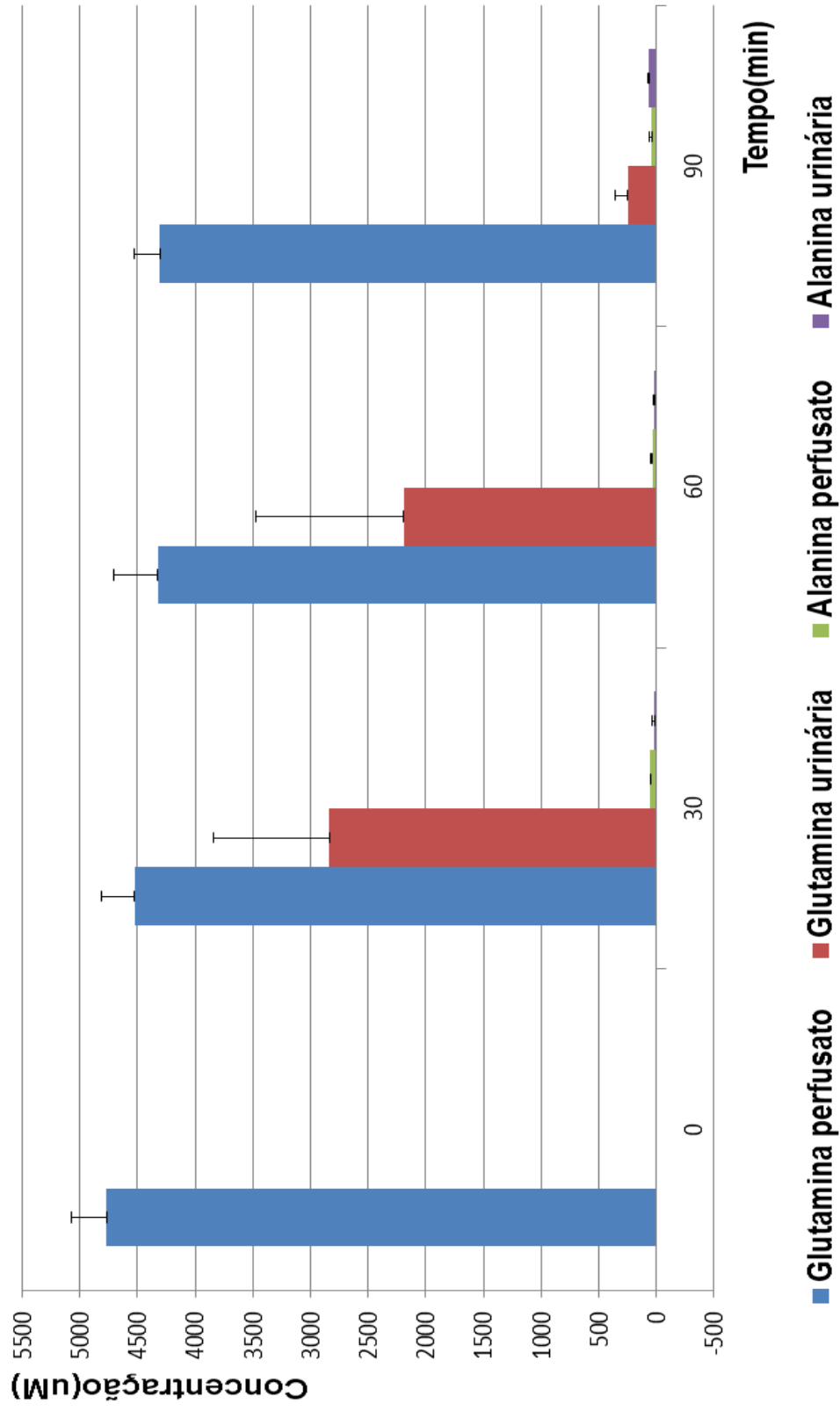
urina a média da concentração de glutamina excretada diminui à medida que transcorre a experiência começando com 2837 uM e finalizando com 249 uM. Neste experimento aos 30, 60 e 90 minutos há presença de alanina no perfusato e a média variando de 50,7 a 36 uM. Existe também uma excreção de alanina e a média variando de 16 a 67 uM. Todos estes dados da cinética dos substratos utilizados podem ser observados no gráfico 1.

Tabela 3. Dinâmica de perfusão de rins perfundidos com solução A contendo 4 g% de albumina bovina associado à glutamina 1 mM a 37°C.

TP	R	FU	RFG	TNa ⁺	%TNa ⁺	TK ⁺	%TK ⁺	TCI ⁻	%TCI ⁻	Cosm	CH ₂ O
10	4,42±0,08	0,18±0,03	0,243±0,05	9,19±2,70	36,01±3,48	0,03±0,40	-1,47± 8,63	7,83±2,83	24,49±6,24	0,175±0,03	0,002±0,003
20	4,23±0,30	0,28±0,10	0,317±0,10	8,70±3,52	26,31±6,18	-0,03±0,20	0,95± 4,03	8,15±2,93	18,86±5,29	0,263±0,09	0,018±0,008
30	4,71±0,48	0,31±0,15	0,322±0,12	3,66±1,43	18,63±4,88	-0,99±0,69	-15,39±12,12	-0,41±2,44	4,43±5,18	0,289±0,11	0,024±0,011
40	4,81±0,64	0,28±0,12	0,308±0,11	8,13±2,57	29,10±6,57	-0,26±0,64	1,55± 9,96	4,55±1,67	16,56±5,16	0,261±0,10	0,019±0,008
50	4,62±0,61	0,24±0,08	0,284±0,08	11,33±5,38	30,55±3,81	0,98±0,58	13,58±10,33	7,11±3,98	16,70±3,71	0,251±0,08	0,019±0,009
60	4,55±0,60	0,27±0,08	0,283±0,08	10,07±4,49	27,19±4,24	0,86±0,47	8,61± 7,36	6,32±3,31	14,89±2,86	0,242±0,07	0,024±0,014
70	4,63±0,64	0,29±0,08	0,333±0,08	9,91±4,06	28,85±5,39	0,89±0,84	13,00±12,40	5,70±3,32	16,91±5,94	0,256±0,07	0,029±0,017
80	4,57±0,62	0,26±0,06	0,331±0,07	12,34±4,45	32,52±8,10	1,98±1,48	16,20±15,09	10,12±4,10	23,15±9,44	0,235±0,04	0,022±0,011
90	4,55±0,62	0,20±0,03	0,252±0,04	10,94±3,31	35,22±4,18	1,30±0,69	19,57±10,96	8,89±4,23	25,89±4,23	0,187±0,03	0,015±0,007

Os resultados são expressos em média \pm e.p.m.; cinco animais foram utilizados neste grupo; TP: tempo(min); R: resistência vascular(mmHg/mL/g/min); FU: fluxo urinário(mL/g/min); RFG: ritmo de filtração glomerular(mL/g/min); %TNa: percentual de transporte de sódio; %TK: percentual de transporte de potássio; %TCI: percentual de transporte de cloreto; Cosm: clearance osmolar(mL/g/min); CH₂O: clearance de água livre(mL/g/min).

Gráfico 1. Variação da concentração de substratos no perfusato e na urina em rins perfundidos com glutamina 1 mM a 37°C.



5.3. Perfusão Renal com solução A contendo 4 g% de albumina, glutamina 1 mM e glutathione 2 mM a 37°C.

Seis animais fizeram parte deste grupo de perfusão. Os rins destes animais foram perfundidos durante noventa minutos com solução A contendo 4 g% de albumina bovina, glutamina 1 mM e glutathione 2 mM a 37°C, previamente dialisada. Os resultados deste grupo estão demonstrados na tabela 4. Os fluxos de perfusatos variaram de 16,5 a 32 mL/min.

A resistência vascular diminui à medida que transcorrem os noventa minutos da perfusão começando com uma média de 5,79 e finalizando com 4,34 mmHg/mL/g/min, sendo significativa ($p < 0,001$). Com relação ao fluxo urinário verifica-se um aumento até o minuto 30 para depois começar a cair variando a média de 0,182 a 0,273 mL/g/min ($p = 0,367$). O ritmo de filtração glomerular inicia uma tendência de crescimento a partir do minuto 60 e voltando a cair no final da perfusão renal variando a média de 0,314 a 0,467 mL/g/min ($p = 0,853$).

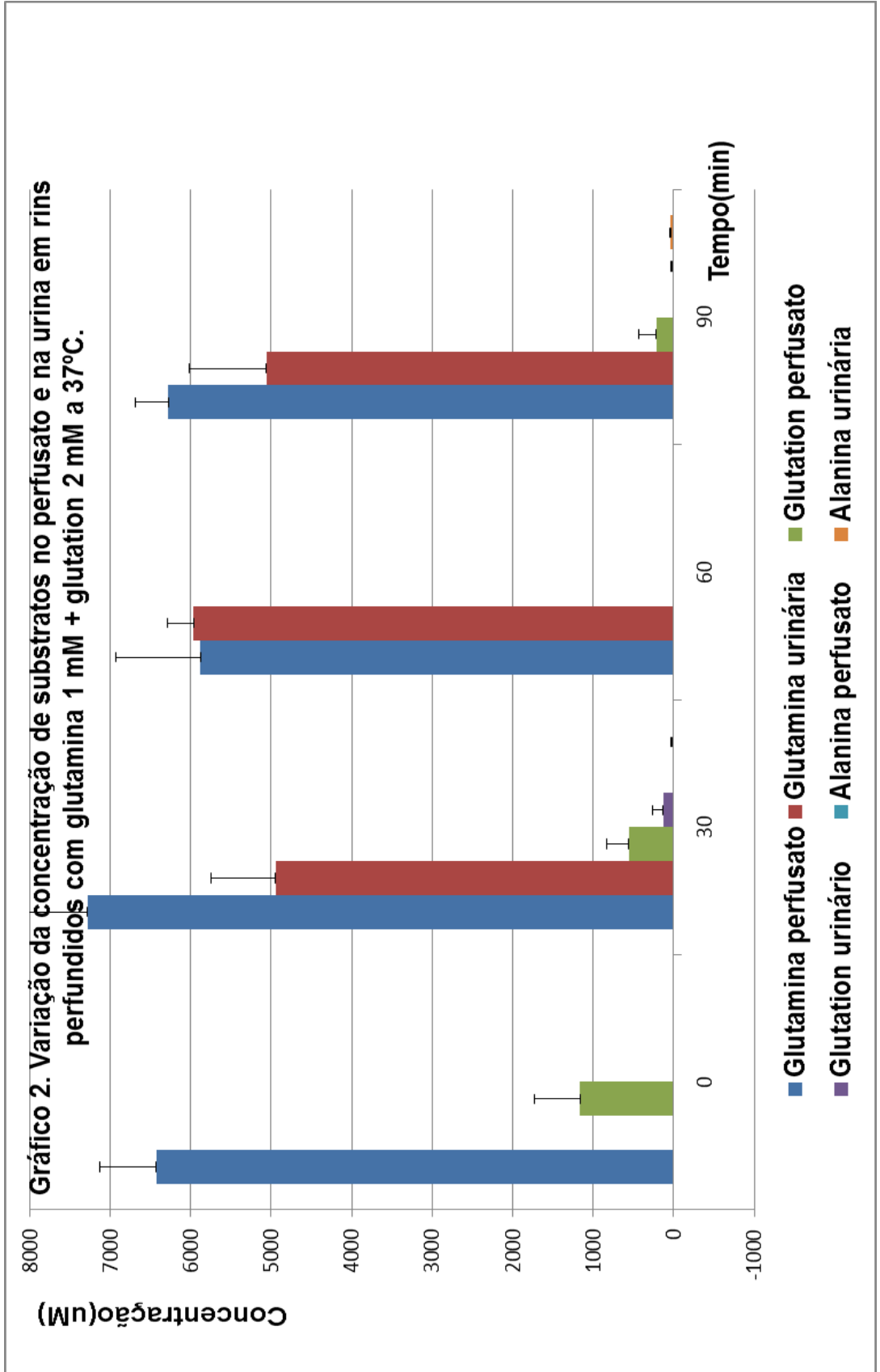
O transporte absoluto de sódio cai até o minuto 40 quando começa a subir e somente voltar a cair no final do experimento variando a média de 16,60 a 33,36 uEq/g/min ($p = 0,539$). No transporte percentual de sódio observa-se uma queda até o minuto 30 para depois começar a subir e só cair novamente no final da perfusão, variando a média de 36,41 a 60,46% ($p = 0,052$), estes dois parâmetros sem significado estatístico. Com relação ao transporte absoluto de potássio, inicia-se um processo de crescimento somente no minuto 60 e voltando a cair no final variando a média de 1,4 a 6,49 uEq/g/min ($p = 0,262$). No tocante ao transporte percentual de potássio observa-se um processo de queda até o minuto 50 e voltando a cair nos últimos dez minutos de perfusão variando a média de -2,62 a 30,40% ($p = 0,127$). O transporte absoluto de cloreto cai até o minuto 40 voltando a subir e caindo novamente no último minuto da perfusão renal variando a média de 14,73 a 34,68 uEq/g/min ($p = 0,511$). O transporte percentual de cloreto observa-se também uma queda até o minuto 30 voltando a subir até o minuto 80 variando a média de 21,47 a 50,15% ($p = 0,127$). Com relação ao clearance osmolar há um incremento até o minuto 30 variando a média de 0,180 a 0,263 mL/g/min ($p = 0,484$). O clearance de água livre começa a perfusão com um aumento para depois cair no minuto 40, e voltar a subir no minuto 60 variando a média de -0,007 a 0,0095 mL/g/min ($p = 0,433$).

Na análise da concentração dos substratos observamos que a glutamina presente no perfusato aumenta no minuto 60, para depois cair e subir novamente variando a média de 6279 a 7281 uM. Na urina a excreção da glutamina aumenta no minuto 60 e depois diminui no minuto final da perfusão com uma média variando de 4948 a 5969 uM. Foi observada também aos 90 minutos de perfusão a presença de 18 uM de alanina e na urina no minuto 30 e 90. O glutathione inicia com uma concentração de 1165 uM no P0 e cai gradativamente no minuto 90 para 214 uM. Na urina observou-se glutathione nos primeiros 30 minutos com uma concentração de 128 uM. Todos estes dados podem ser observados no gráfico 2.

Tabela 4. Dinâmica de perfusão de rins perfundidos com solução A contendo 4 g% de albumina bovina associado à glutamina 1 mM e glutatation 2 mM.

TP	R	FU	RFG	TNa ⁺	% TNa ⁺	TK ⁺	% TK ⁺	TCI ⁻	% TCI ⁻	Cosm	CH ₂ O
10	5,79±0,41	0,22±0,03	0,41±0,07	21,92±4,69	51,66±5,17	4,06±2,02	25,69±10,48	22,37±5,39	43,39±5,37	0,229±0,04	-0,0070±0,009
20	5,17±0,33	0,26±0,04	0,43±0,08	21,14±6,06	42,80±6,33	4,66±1,78	22,37±9,13	21,62±7,51	33,28±7,48	0,255±0,04	0,0078±0,021
30	4,75±0,32	0,27±0,04	0,43±0,08	19,52±6,00	36,64±6,59	2,48±2,24	-2,14±16,33	18,67±7,05	24,93±8,47	0,263±0,04	0,0095±0,011
40	4,56±0,30	0,25±0,03	0,37±0,05	16,60±3,32	40,62±5,13	1,40±0,85	8,67±7,67	14,73±3,46	28,63±5,18	0,241±0,03	0,0037±0,005
50	4,45±0,29	0,26±0,03	0,44±0,07	21,79±4,45	44,88±3,65	1,82±1,30	4,85±8,40	21,23±5,37	33,26±5,45	0,254±0,03	0,0025±0,004
60	4,41±0,30	0,23±0,04	0,46±0,09	26,82±7,38	53,50±5,75	4,98±1,81	30,40±6,95	27,09±8,11	44,49±6,22	0,227±0,03	0,0032±0,010
70	4,40±0,33	0,22±0,04	0,46±0,10	28,18±7,15	57,86±4,60	5,30±1,62	27,53±5,31	28,69±8,02	46,73±4,71	0,219±0,04	0,0002±0,009
80	4,38±0,37	0,20±0,04	0,47±0,14	33,36±14,34	60,46±7,91	6,49±3,52	29,85±10,71	34,68±16,24	50,15±8,62	0,192±0,03	0,0058±0,023
90	4,34±0,36	0,18±0,04	0,31±0,13	16,83±12,19	36,41±14,07	2,89±3,93	-2,62±17,31	15,29±13,71	21,47±15,32	0,180±0,03	0,0025±0,015

Os resultados são expressos em média ± e.p.m.; seis animais foram utilizados neste grupo; TP: tempo(min); R: resistência vascular(mmHg/mL/g/min) $p < 0,001$; FU: fluxo urinário(mL/g/min); RFG: ritmo de filtração glomerular(mL/g/min); TNa⁺: transporte absoluto de sódio(uEq/g/min); % TNa⁺: percentual do transporte de sódio; TK⁺: transporte absoluto de potássio(uEq/g/min); % TK⁺: percentual do transporte de potássio; TCI⁻: transporte absoluto de cloreto(uEq/g/min); % TCI⁻: percentual do transporte de cloreto; Cosm: clearance osmolar(mL/g/min); CH₂O: clearance de água livre (mL/g/min).



5.4. Perfusão Renal com solução A contendo 4 g% de albumina, glutamina 1 mM e glutathione 4 mM a 37°C.

Quatro animais fizeram parte deste grupo de perfusão. Os rins destes animais foram perfundidos durante noventa minutos com solução A contendo 4 g% de albumina bovina, glutamina 1 mM e glutathione 4 mM a 37°C, previamente dialisada. Os resultados deste grupo estão demonstrados na tabela 5. Os fluxos de perfusato variaram de 17,5 a 36 mL/min.

A resistência vascular iniciou com um aumento até o minuto 30 para depois começar a cair variando a média de 3,57 a 4,67 mmHg/mL/g/min, sendo significativa ($p < 0,001$). O fluxo urinário a média variou de 0,161 a 0,317 mL/g/min observando certa instabilidade ($p = 0,389$). Com relação ao ritmo de filtração glomerular vimos um processo de subida até os vinte minutos iniciais e a partir começou a cair variando a média de 0,203 a 0,430 mL/g/min ($p = 0,374$).

O transporte absoluto de sódio mostrou também certa instabilidade variando a média de 6,99 a 16,12 uEq/g/min ($p = 0,519$), mas com o transporte percentual de sódio há uma certa estabilidade variando a média de 37,87 a 45,41% ($p = 0,950$). O transporte absoluto do potássio inicia a perfusão com um crescimento para posteriormente começar a cair até o minuto 70 e depois voltar a subir variando a média de 0,28 a 3,12 uEq/g/min ($p = 0,359$). O transporte percentual de potássio mostra um aumento nos primeiros trinta minutos para depois cair variando a média de -14,31 a 22,66% ($p = 0,101$). O transporte absoluto de cloreto mostra uma instabilidade variando a média de 4,45 a 13,58 uEq/g/min ($p = 0,207$). No transporte percentual de cloreto há um incremento até o minuto 30 e ficar estável variando a média de 21,57 a 32,26% ($p = 0,721$). O clearance osmolar tem uma tendência de redução até o minuto 30 quando então começa a subir até o minuto 60 e voltar a cair variando a média de 0,153 a 0,321 mL/g/min ($p = 0,351$). No tocante ao clearance de água livre há um crescimento até o minuto 40 e a partir daí começa a cair variando a média de 0,008 a 0,046 mL/g/min ($p = 0,404$).

Tabela 5. Dinâmica de perfusão de rins perfundidos com solução A contendo 4 g% de albumina bovina associado à glutamina 1 mM e glutatation 4 mM a 37°C.

TP	R	FU	RFG	TNa+	% TNa+	TK+	% TK+	TCI-	% TCI-	Cosm	CH2O
10	4,43±0,52	0,25±0,06	0,41±0,09	16,12±3,68	40,64±3,34	0,57±1,44	-4,60±13,70	13,58±3,80	27,31±2,40	0,321±0,08	0,017±0,01
20	4,57±0,68	0,32±0,09	0,43±0,10	14,90±4,46	38,90±8,84	1,55±0,92	11,80±3,06	11,98±4,53	27,94±8,67	0,280±0,07	0,037±0,01
30	4,67±0,90	0,23±0,08	0,34±0,11	15,23±5,22	43,54±4,92	3,12±1,18	22,66±2,96	13,14±4,79	32,26±4,02	0,192±0,06	0,037±0,02
40	4,35±0,85	0,25±0,12	0,31±0,14	9,44±2,55	38,69±7,02	1,06±1,18	-11,68±4,37	5,83±1,23	22,57±4,93	0,202±0,09	0,046±0,02
50	4,08±0,68	0,23±0,06	0,31±0,08	11,22±2,77	37,87±6,13	1,19±1,12	-11,06±1,71	8,29±2,66	23,75±6,27	0,205±0,05	0,025±0,01
60	3,84±0,55	0,24±0,04	0,34±0,07	14,15±2,80	41,20±3,97	0,65±0,90	-14,31±0,31	10,85±3,01	26,20±4,23	0,225±0,04	0,014±0,01
70	3,70±0,40	0,21±0,06	0,27±0,07	10,36±2,27	38,99±2,61	0,28±0,51	-0,24±4,61	7,13±1,97	21,57±3,56	0,196±0,06	0,011±0,01
80	3,64±0,39	0,16±0,05	0,20±0,06	6,99±1,33	38,55±4,36	0,33±0,32	7,97±1,77	4,45±0,74	23,35±4,35	0,153±0,05	0,008±0,01
90	3,57±0,41	0,20±0,06	0,28±0,08	11,91±2,00	45,41±5,08	1,21±0,41	11,77±1,11	8,70±1,40	29,96±4,47	0,189±0,06	0,013±0,01

Os resultados são expressos em média ± e.p.m.; quatro animais foram utilizados neste grupo; TP: tempo(min); R: resistência vascular(mmHg/mL/g/min) **p < 0,001**; FU: fluxo urinário(mL/g/min); RFG: ritmo de filtração glomerular(mL/g/min); TNa⁺: transporte absoluto de sódio(uEq/g /min); % TNa⁺: percentual de transporte de sódio; TK⁺: transporte absoluto de potássio(uEq/g/min); % TK⁺: percentual de transporte de potássio; TCl⁻: transporte absoluto de cloreto(uEq/g/min); % TCl⁻: percentual do transporte de cloreto; Cosm: clearance osmolar(mL/g/min); CH₂O: clearance de água livre(mL/g/min).

5.5. Perfusão Renal com solução A contendo 4 g% de albumina e glutamina 3 mM a 37°C.

Quatro animais fizeram parte deste grupo de perfusão. Os rins destes animais foram perfundidos durante noventa minutos com solução A contendo 4 g% de albumina bovina e glutamina 3 mM a 37°C, previamente dialisada. Os resultados deste grupo estão demonstrados na tabela 6. Os fluxos de perfusato variaram de 17 a 33 mL/min.

A resistência vascular mostrou uma queda leve ao longo de toda a perfusão variando a média de 5,70 a 5,17 mmHg/mL/g/min($p = 0,111$). Com relação ao fluxo urinário observou-se um incremento até o minuto 30 quando começou a cair e a média variou de 0,054 a 0,088 mL/g/min($p = 0,832$). O ritmo de filtração glomerular aumentou até o minuto 30 quando caiu e manteve-se estável até o minuto 80 variando a média de 0,068 a 0,153 mL/g/min($p = 0,884$). O transporte absoluto de sódio mostrou uma instabilidade variando a média de 0,87 a 2,83 uEq/g/min($p = 0,714$) e transporte percentual de sódio mostrou também instabilidade nos seus dados variando a média 4,58 a 34,34%($p = 0,289$).

O transporte absoluto de potássio aumentou até os cinquenta minutos de perfusão caindo a partir de então e voltando a subir depois, variando a média de -0,52 a 0,57 uEq/g/min($p = 0,231$). Já o transporte percentual de potássio ficou quase todo os noventa minutos negativo variando a média de -48,13 a 5,57%($p = 0,331$). O transporte absoluto de cloreto aumentou nos primeiros 50 minutos e começou a cair a partir de então variando a média de 1,47 a 3,89 uEq/g/min($p = 0,573$). O transporte percentual de cloreto comportou-se de forma instável variando a média de -0,51 a 27,32%($p = 0,320$). O clearance osmolar aumentou até os setenta minutos variando a média de 0,053 a 0,107 mL/g/min($p = 0,926$). E o clearance de água livre diminuiu substancialmente nos últimos trinta minutos variando a média de -0,0060 a 0,0038 mL/g/min($p = 0,867$).

Tabela 6. Dinâmica de perfusão de rins perfundidos com solução A contendo 4 g% de albumina bovina associado à glutamina 3 mM a 37°C.

TP	R	FU	RFG	TNa ⁺	% TNa ⁺	TK ⁺	% TK ⁺	TCI ⁻	% TCI ⁻	Cosm	CH ₂ O
10	5,70±0,61	0,05±0,02	0,07±0,02	1,62±0,95	20,75±15,14	-0,06±0,44	-4,17±18,93	1,47±0,51	18,81± 6,62	0,053±0,01	0,0018±0,00
20	5,52±0,82	0,06±0,03	0,09±0,04	2,50±0,96	34,34± 6,19	0,17±0,26	-4,42±17,07	2,97±1,42	27,32± 2,12	0,059±0,02	0,0038±0,00
30	5,51±0,86	0,10±0,05	0,14±0,08	2,13±0,95	22,72± 9,19	0,21±0,42	-25,73± 3,12	3,18±2,02	19,18± 3,54	0,099±0,05	0,0030±0,00
40	5,34±0,82	0,10±0,05	0,13±0,06	1,50±4,00	24,39± 6,11	0,30±0,42	-4,23±12,50	2,37±1,32	18,30± 3,71	0,095±0,04	0,0008±0,00
50	5,24±0,79	0,09±0,05	0,13±0,07	2,83±1,62	18,04±14,96	0,53±0,41	5,57±11,90	3,86±2,35	18,64± 5,46	0,090±0,04	0,0008±0,00
60	5,26±0,81	0,11±0,06	0,15±0,10	2,40±1,79	4,58± 9,53	-0,52±0,44	-48,13±29,43	3,78±3,26	-0,51±11,39	0,103±0,05	0,0028±0,00
70	5,20±0,80	0,10±0,06	0,14±0,08	1,96±1,07	17,08± 5,10	0,17±0,42	-29,73±25,74	3,08±2,02	14,96± 6,39	0,107±0,06	-0,0060±0,00
80	5,17±0,82	0,09±0,05	0,13±0,08	2,61±1,80	20,37± 3,03	0,57±0,67	-15,71±18,85	3,89±3,12	15,90± 6,55	0,090±0,05	-0,0020±0,00
90	5,18±0,81	0,09±0,05	0,12±0,07	0,87±0,42	12,47± 8,17	0,31±0,36	-6,04± 9,11	1,75±1,28	10,50± 2,60	0,092±0,05	-0,0038±0,00

Os resultados são expressos em média \pm e.p.m.; quatro animais foram utilizados neste grupo; TP: tempo(min); R: resistência vascular(mmHg/mL/g/min); FU: fluxo urinário(mL/g/min); RFG: ritmo de filtração glomerular(mL/g/min); TNa⁺: transporte absoluto de sódio(uEq/g/min); % TNa⁺: percentual do transporte de sódio; TK⁺: transporte absoluto de potássio(uEq/g/min); % TK⁺: percentual do transporte de potássio; TCI⁻: transporte absoluto de cloreto(uEq/g/min); % TCI⁻: percentual do transporte de cloreto; Cosm: clearance osmolar(mL/g/min); CH₂O: clearance de água livre(mL/g/min).

5.6. Perfusão Renal com solução A contendo 4 g% de albumina, glutamina 1 mM e alanina 2 mM a 37°C.

Quatro animais fizeram parte deste grupo de perfusão. Os rins destes animais foram perfundidos durante noventa minutos, com solução A contendo 4 g% de albumina bovina, glutamina 1 mM e 2 mM de alanina a 37°C, previamente dialisada. Os resultados deste grupo estão demonstrados na tabela 7. Os fluxos de perfusato variaram de 21,5 a 32 mL/min.

A resistência vascular diminui à medida que a perfusão transcorre e só voltando a subir nos vinte minutos finais a média variando de 4,47 a 3,82 mmHg/mL/g/min($p = 0,038$). Com relação ao fluxo urinário houve uma redução até o minuto 60 variando a média de 0,043 a 0,082 mL/g/min($p = 0,130$). O ritmo de filtração glomerular diminui até o minuto 60 quando a partir daí começou a subir variando a média de 0,057 a 0,144 mL/g/min($p = 0,193$).

O transporte absoluto de sódio começou a cair até o minuto 30 quando sobiu e caiu de novo no minuto 60 variando a média de 1,40 a 7,59 uEq/g/min($p = 0,092$). O transporte percentual de sódio caiu até o minuto 30 quando voltou a subir e caiu mais uma vez no minuto 60 variando a média de 21,06 a 42,50%($p = 0,433$). O transporte absoluto de potássio comportou-se de forma instável variando a média de 1,00 a 0,03 uEq/g/min($p = 0,839$). O transporte percentual de potássio variou a média de 0,14 a 18,71% apresentando-se de forma instável durante os noventa minutos de perfusão($p = 0,875$). Com relação ao transporte absoluto de cloreto houve uma redução até o minuto 30, quando então sobiu até o minuto 50 e caiu novamente e voltou a subir no minuto 80 variando a média de 1,23 a 7,23 uEq/g/min($p = 0,302$). O transporte percentual de cloreto houve uma redução até o minuto 30 e subindo por vinte minutos caiu novamente variando a média de 15,07 a 34,61%($p = 0,595$). O clearance osmolar manteve-se numa tendência de queda variando a média de 0,044 a 0,084 mL/g/min($p = 0,220$). O clearance de água livre caiu até o minuto 60 variando a média de -0,0030 a 0,0003 mL/g/min($p = 0,832$).

A análise das concentrações dos substratos no perfusato e na urina evidenciou a presença de glutamina e de alanina. No perfusato a concentração de glutamina manteve-se estável com a média variando de 6674 a 6908 uM e a de alanina teve uma queda de 20% a média variando 3437 a 4523 uM. Na urina a excreção da glutamina diminui no minuto 60 quase 80% e depois voltando a subir

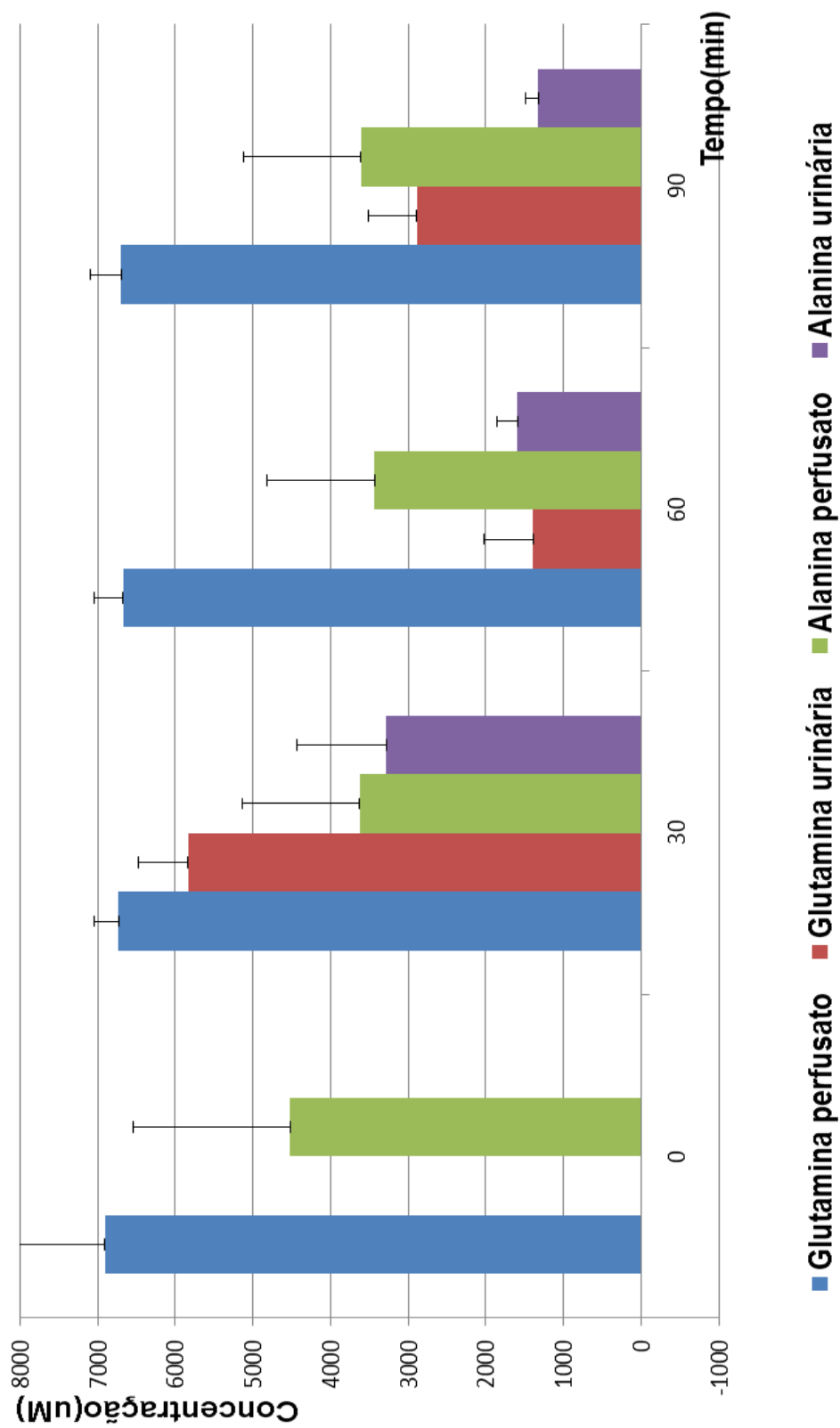
para um valor inferior ao inicial variando a média de 1390 a 5835 uM e da alanina também diminui para quase 50% no minuto 60 e caindo menos no minuto noventa e a média variando de 1326 a 3285 uM. Todos estes dados podem ser observados no gráfico 3.

Tabela 7. Dinâmica de perfusão de rins perfundidos com solução A contendo 4 g% de albumina bovina associado à glutamina 1 mM associado a 2 mM de alanina a 37°C.

TP	R	FU	RFG	TNa ⁺	%TNa ⁺	TK ⁺	%TK ⁺	TCl ⁻	%TCl ⁻	Cosm	CH ₂ O
10	4,47±0,46	0,08±0,01	0,14±0,020	7,59±2,57	42,50±10,21	1,00±0,57	16,73± 7,41	7,23±2,55	34,61±10,53	0,084±0,005	0,0008±0,003
20	4,37±0,49	0,06±0,01	0,08±0,016	2,97±1,63	27,98± 9,54	0,03±0,30	0,14±10,13	2,52±1,59	26,86± 8,76	0,059±0,010	-0,0010±0,002
30	4,17±0,49	0,05±0,01	0,07±0,010	2,18±0,80	25,21± 7,16	0,32±0,13	12,39± 3,96	2,00±0,77	22,36± 7,01	0,054±0,010	-0,0030±0,001
40	3,95±0,43	0,05±0,01	0,06±0,012	2,28±0,54	33,76± 6,94	0,31±0,22	11,63± 9,31	2,20±0,63	28,45± 8,83	0,060±0,010	-0,0020±0,001
50	3,99±0,45	0,04±0,01	0,06±0,011	2,57±0,45	36,74± 2,64	0,42±0,23	17,77±10,93	2,56±0,51	32,13± 4,12	0,044±0,010	-0,0013±0,001
60	3,93±0,46	0,04±0,01	0,06±0,012	1,67±0,50	25,45± 3,36	0,30±0,13	11,19± 6,28	1,61±0,52	18,54± 3,83	0,044±0,010	-0,0003±0,001
70	3,82±0,46	0,05±0,01	0,06±0,016	1,40±0,58	21,06± 6,13	0,12±0,16	2,33± 5,04	1,23±0,60	15,07± 6,72	0,050±0,015	0,0000±0,000
80	3,89±0,46	0,05±0,01	0,07±0,019	2,48±0,76	32,91± 2,66	0,55±0,22	18,71± 5,20	2,49±0,80	29,84± 3,42	0,046±0,015	0,0003±0,000
90	3,95±0,48	0,05±0,01	0,07±0,020	2,30±0,92	26,58± 6,42	0,51±0,23	17,69± 2,67	2,33±0,90	21,96± 5,08	0,049±0,015	0,0003±0,000

Os resultados são expressos em média ± e.p.m.; quatro animais foram utilizados neste grupo; TP: tempo(min); R: resistência vascular(mmHg/mL/g/min) **p = 0,038**; FU: fluxo urinário(mL/g/min); RFG: ritmo de filtração glomerular(mL/g/min); TNa⁺: transporte absoluto de sódio(uEq/g/ min); %TNa⁺: percentual do transporte de sódio; TK⁺: transporte absoluto de potássio(uEq/g/min); %TK⁺: percentual do transporte de potássio; TCl⁻: transporte absoluto de cloreto(uEq/g/min); %TCl⁻: percentual do transporte de cloreto; Cosm: clearance osmolar(mL/g/min); CH₂O: clearance de água livre(mL/g/min).

Gráfico 3. Variação da concentração de substratos no perfusato e na urina em rins perfundidos com glutamina 1 mM + alanina 2 mM a 37°C.



5.7. Perfusão Renal com solução A contendo 4 g% de albumina e alanilglutamina 2 mM a 37°C.

Quatro animais fizeram parte deste grupo de perfusão. Os rins destes animais foram perfundidos durante noventa minutos com solução A contendo 4 g% de albumina bovina e alanilglutamina 2 mM a 37°C, previamente dialisada. Os resultados deste grupo estão demonstrados na tabela 8. Os fluxos de perfusato variaram de 12 a 25 mL/min.

Analisando os dados da resistência vascular observou-se uma queda progressiva nos noventa minutos da perfusão variando a média de 6,72 a 8,14 mmHg/mL/g/min, sendo estatisticamente diferente($p = 0,013$). Com relação ao fluxo urinário à medida que transcorreu a experiência a média dos fluxos foi aumentando variando de 0,102 a 0,181 mL/g/min($p = 0,141$). E o ritmo de filtração glomerular seguiu a mesma tendência de subida do fluxo urinário e a média variando de 0,128 a 0,304 mL/g/min, mas neste caso é estatisticamente significativa($p = 0,043$).

No tocante ao transporte absoluto de sódio observamos uma queda nos trinta minutos iniciais, para depois começar a subir e ficar num valor um pouco acima do valor inicial variando a média de 2,84 a 6,12 uEq/g/min($p = 0,685$). No transporte percentual de sódio evidenciamos uma queda nos primeiros trinta minutos para então começar a subir, mas sem chegar ao valor inicial e cair no minuto 70 variando a média de 23,44 a 48,01%($p = 0,772$). O transporte absoluto de potássio caiu nos primeiros trinta minutos para depois começar a subir e ultrapassar o valor inicial e no minuto 70 voltar a cair e a média variando de 0,09 a 1,14 uEq/g/min($p = 0,935$). No transporte percentual de potássio vimos uma subida a partir de um valor negativo até o minuto 20, voltando a subir no minuto 50 e mantendo uma tendência de estabilidade no resto do experimento e a média variando de -9,31 a 28,11%($p = 0,902$). No transporte absoluto de cloreto observamos uma queda inicial nos primeiros trinta minutos para depois subir e ficar estável variando a média de 1,86 a 5,48 uEq/g/min($p = 0,946$). No transporte percentual de cloreto vimos uma queda nos primeiros trinta minutos para depois subir para um valor inferior ao inicial e depois cair novamente nos trinta minutos finais e a média variando de 7,86 a 41,20%($p = 0,632$). Com relação ao clearance osmolar observou-se um aumento progressivo com uma média variando de 0,099 a 0,174 mL/g/min($p = 0,098$). No

clearance de água livre observou-se um aumento principalmente nos últimos quarenta minutos com uma média variando de 0,002 a 0,007 mL/g/min($p = 0,691$).

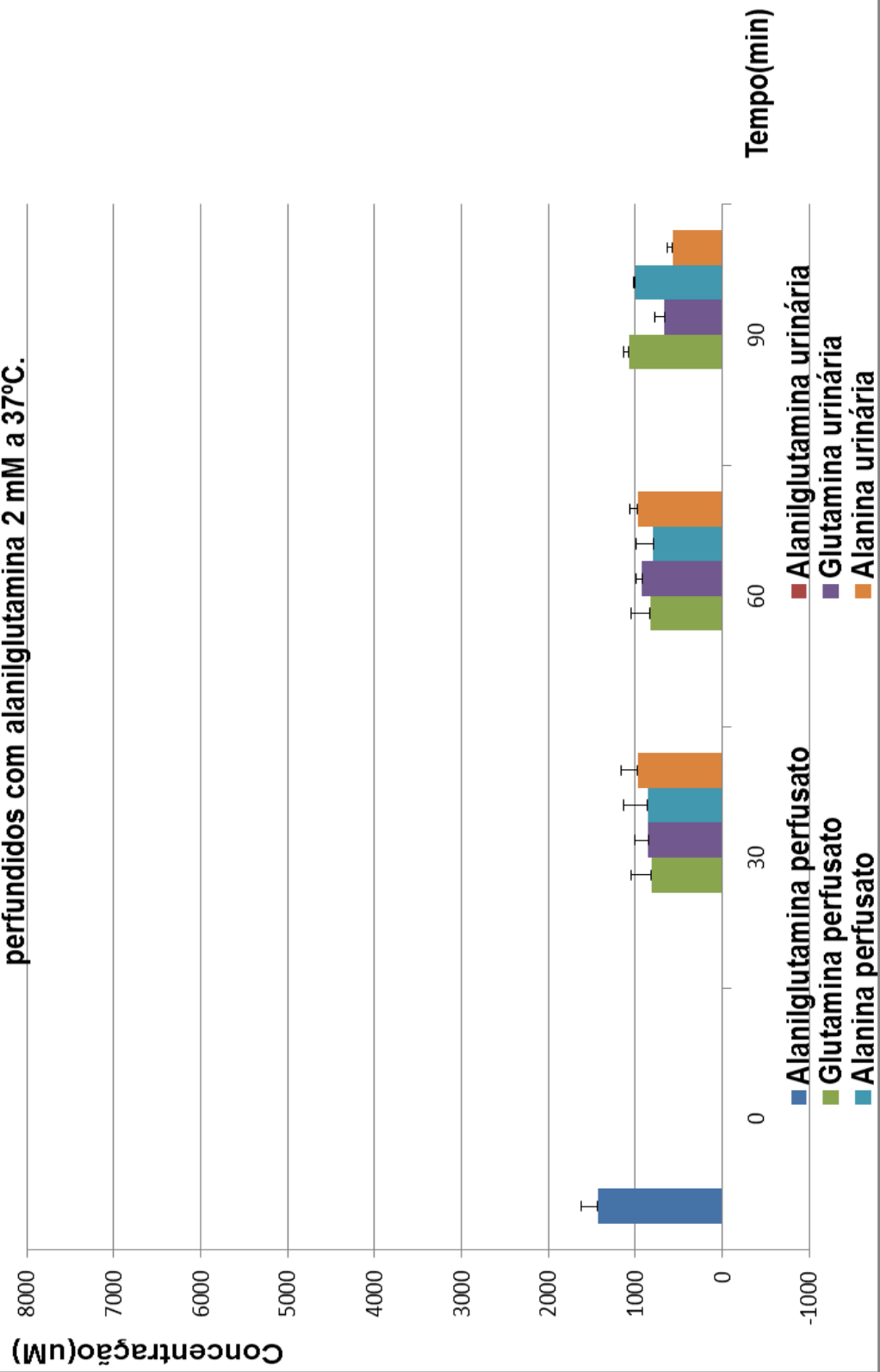
No P0 encontramos uma concentração de 1430,78 uM de alanilglutamina que é posteriormente transformada em glutamina e alanina. As concentrações de glutamina no perfusato aumentam levemente à medida que passa o experimento variando a média de 813,76 a 1072,88 uM. Na urina as concentrações de glutamina aumentam inicialmente para depois cair a média variando de 665,58 a 851,17 uM. Com relação à alanina vemos um aumento da concentração no perfusato a média variando de 857,95 a 1000,34 uM e na urina a excreção se mantém estável nos sessenta minutos iniciais para depois cair no último minuto com uma média variando de 568,66 a 974,82 uM. Todos estes dados podem ser observados no gráfico 4.

Tabela 8. Dinâmica de perfusão de rins perfundidos com solução A contendo 4 g% de albumina bovina associado à 2 mM de alanilglutamina a 37°C.

TP	R	FU	RFG	TNa ⁺	%TNa ⁺	TK ⁺	%TK ⁺	TCI ⁻	%TCI ⁻	Cosm	CH ₂ O
10	8,14±1,06	0,11±0,02	0,140±0,01	5,79±1,64	48,01±0,79	0,84±1,19	8,97±24,57	5,48±2,28	41,20±1,60	0,102±0,02	0,002±0,001
20	7,63±1,07	0,11±0,02	0,128±0,03	4,53±1,08	35,63±3,51	0,52±0,24	12,90±4,58	3,95±0,93	27,93±3,30	0,103±0,02	0,004±0,003
30	7,51±1,17	0,11±0,03	0,130±0,03	2,84±0,67	28,06±0,96	0,29±0,10	9,16±5,41	1,86±0,66	20,20±1,02	0,106±0,03	0,005±0,003
40	7,28±1,18	0,10±0,03	0,168±0,04	3,85±2,52	42,00±5,34	0,46±0,61	5,62±10,43	3,20±2,71	34,74±5,62	0,099±0,03	0,004±0,002
50	6,99±1,22	0,12±0,03	0,187±0,04	5,37±1,93	44,02±2,21	1,04±0,68	11,81±9,77	4,36±1,80	33,49±2,29	0,116±0,03	0,003±0,002
60	6,96±1,32	0,15±0,04	0,251±0,04	5,48±1,63	39,42±3,74	1,14±0,48	8,40±7,03	3,64±1,20	26,28±4,22	0,145±0,04	0,006±0,003
70	6,87±1,31	0,17±0,03	0,259±0,05	4,43±2,20	23,44±6,76	0,68±0,92	19,22±4,73	2,42±1,89	7,86±7,84	0,160±0,04	0,005±0,002
80	6,72±1,25	0,18±0,03	0,304±0,02	6,10±2,12	28,59±6,83	0,42±0,91	19,05±1,95	3,97±1,89	14,75±7,09	0,174±0,03	0,007±0,003
90	6,77±1,27	0,18±0,03	0,294±0,03	6,12±2,50	29,07±8,04	1,17±0,75	15,47±8,96	4,05±2,43	16,48±8,72	0,171±0,03	0,006±0,004

Os resultados são expressos em média ± e.p.m.; quatro animais foram utilizados neste grupo; TP: tempo(min); R: resistência vascular(mmHg/mL/g/min) $p = 0,013$; FU: fluxo urinário(mL/g/min); RFG: ritmo de filtração glomerular(mL/g/min) $p = 0,043$; TNa⁺: transporte absoluto de sódio(uEq/g/min); % TNa⁺: percentual de transporte de sódio; TK⁺: transporte absoluto de potássio(uEq/g/min); % TK⁺: percentual de transporte de potássio; TCl⁻: transporte absoluto de cloreto(uEq/g/min); % TCl⁻: percentual de transporte de cloreto; Cosm: clearance osmolar(mL/g/min); CH₂O: clearance de água livre(mL/g/min).

Gráfico 4. Variação da concentração de substratos no perfusato e na urina em rins perfundidos com alanilglutamina 2 mM a 37°C.



5.8. Perfusão Renal com solução A contendo 4 g% de albumina e alanilglutamina 5 mM a 37°C.

Seis animais fizeram parte deste grupo de perfusão. Os rins destes animais foram perfundidos durante noventa minutos com solução A contendo 4g % de albumina bovina e alanilglutamina 5 mM a 37°C, previamente dialisada. Os resultados deste grupo estão demonstrados na tabela 9. Os fluxos de perfusato variaram de 15,5 a 36,5 mL/min.

Com relação à resistência vascular as médias mantiveram-se estáveis variando de 5,02 a 5,67 mmHg/mL/g/min($p = 0,444$). O fluxo urinário aumentou mais intensamente nos primeiros cinquenta minutos para depois começar a cair, mas para valores superiores aos iniciais, variando a média de 0,104 a 0,150 mL/g/min($p = 0,134$). O ritmo de filtração glomerular aumentou até os cinquenta minutos quando também começou a cair variando a média de 0,187 a 0,279 mL/g/min($p = 0,655$).

O transporte absoluto do sódio sobiu até o minuto 60 para depois cair e voltar para os valores iniciais e a média variou de 7,31 a 13,87 uEq/g/min($p = 0,408$). O transporte percentual de sódio manteve uma tendência de estabilidade variando a média de 43,06 a 55,17%($p = 0,291$). O transporte absoluto do potássio diminuiu à medida que o tempo passa tendendo a um valor negativo e a média variou de -0,85 a 0,24 uEq/g/min($p = 0,726$). O mesmo aconteceu com o transporte percentual de potássio caindo até valores negativos variando a média de -10,93 a 12,01%($p = 0,311$). Com relação ao transporte absoluto de cloreto houve um incremento principalmente após os quarenta minutos de perfusão e caindo para valores inferiores aos iniciais no minuto 70 com uma média que variou de 4,18 a 9,44 uEq/g/min($p = 0,598$). Com relação ao transporte percentual de cloreto observamos uma estabilidade e a média variou de 30,37 a 42,22%($p = 0,319$). O clearance osmolar mostrou certa instabilidade com uma média variando de 0,095 a 0,149 mL/g/min($p = 0,059$). Com relação ao clearance de água livre observamos um clearance negativo no início até os quarenta minutos e depois houve um aumento até os 70 minutos e voltou a cair com uma média variando de -0,002 a 0,011 mL/g/min, tendo diferença estatística($p = 0,009$).

Na avaliação do HPLC, observamos a presença da alanilglutamina no P0 e aqui diferentemente do grupo alanilglutamina 2 mM constatamos também a presença de uma pequena quantidade de alanilglutamina no P30 evidenciando uma

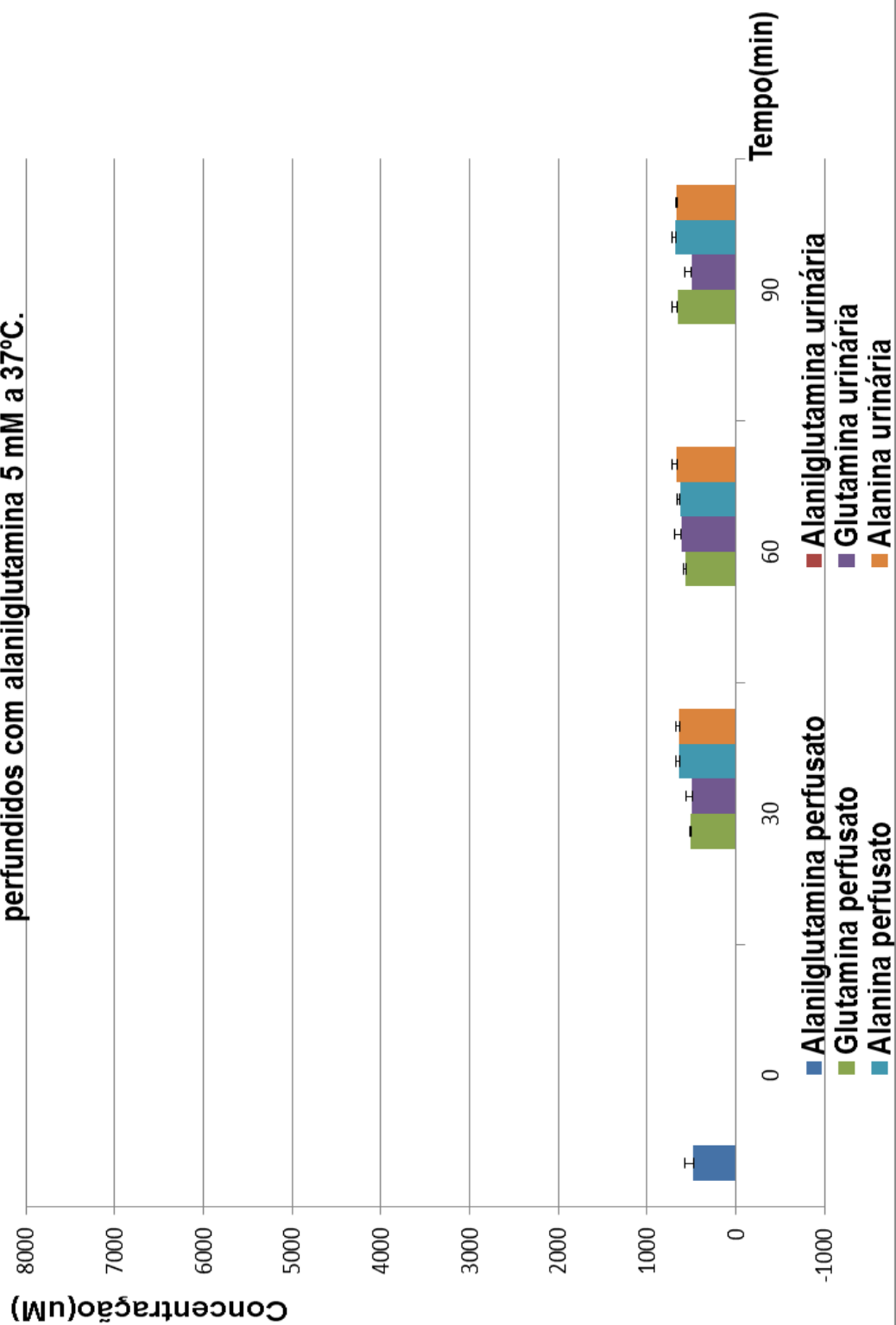
média de 13,63 uM. A média da alanilglutamina no perfusato antes de começar a experiência foi de 473,9 uM. Notamos que as concentrações médias da glutamina no perfusato e na urina mantiveram-se estáveis e a média variou no perfusato de 507,2 a 655,3 e na urina de 489,97 a 616,13 uM. Com relação à presença da alanina as concentrações também estiveram estáveis tanto no perfusato como também na urina, sendo a variação da média de 630 a 674,9 e 637,7 a 667,9 uM, respectivamente. Todos estes dados podem ser observados no gráfico 5.

Tabela 9. Dinâmica de perfusão de rins perfundidos com solução A contendo 4 g% de albumina bovina associado à 5 mM de alanilglutamina a 37°C.

TP	R	FU	RFG	TNa ⁺	%TNa ⁺	TK ⁺	%TK ⁺	TCI ⁻	%TCI ⁻	Cosm	CH ₂ O
10	5,67±0,60	0,11±0,02	0,22±0,03	9,15±2,46	51,05±4,50	0,24±0,32	12,01± 8,45	6,90±2,56	37,91± 6,25	0,108±0,02	-0,002±0,003
20	5,43±0,53	0,10±0,02	0,19±0,02	9,53±1,45	55,17±4,06	-0,16±0,31	2,82±11,56	7,26±1,09	42,22± 6,02	0,095±0,02	0,001±0,008
30	5,67±0,60	0,14±0,04	0,24±0,05	10,07±2,03	52,59±4,41	-0,24±0,59	8,96±10,77	5,48±1,88	36,27± 6,59	0,141±0,04	-0,002±0,003
40	5,31±0,52	0,13±0,02	0,23±0,03	10,43±2,77	49,66±6,22	-0,31±0,83	-7,20±21,02	6,40±2,84	32,09± 8,81	0,132±0,03	-0,002±0,004
50	5,02±0,40	0,15±0,03	0,28±0,05	13,68±3,34	51,13±2,05	-0,40±0,85	-3,12±14,41	8,78±1,57	35,13± 3,32	0,149±0,03	0,001±0,005
60	5,31±0,51	0,14±0,03	0,25±0,04	13,87±3,59	47,32±6,32	-0,37±0,70	-10,93±16,06	9,44±1,83	33,18± 6,95	0,131±0,03	0,005±0,003
70	5,49±0,53	0,13±0,02	0,21±0,05	9,34±2,07	45,80±7,28	-0,85±0,50	-10,46±13,64	5,08±1,89	31,70± 6,88	0,117±0,02	0,011±0,001
80	5,33±0,57	0,11±0,01	0,21±0,02	9,65±2,32	47,73±7,11	-0,38±0,54	-2,32±12,86	6,45±2,38	35,89± 6,09	0,108±0,01	0,007±0,001
90	5,14±0,68	0,13±0,03	0,21±0,05	7,31±0,91	43,06±5,09	-0,40±0,26	-6,65± 4,98	4,18±1,78	30,37± 4,90	0,126±0,03	0,002±0,002

Os resultados são expressos em média ± e.p.m.; seis animais foram utilizados neste grupo; TP: tempo(min); R: resistência vascular(mmHg/mL/g/min); FU: fluxo urinário(mL/g/min); RFG: ritmo de filtração glomerular(mL/g/min); TNa⁺: transporte absoluto de sódio(uEq/g/min); %TNa⁺: percentual de transporte de sódio; TK⁺: transporte absoluto de potássio(uEq/g/min); %TK⁺: percentual do transporte de potássio; TCI⁻: transporte absoluto de cloreto(uEq/g/min); %TCI⁻: percentual do transporte de cloreto; Cosm: clearance osmolar(mL/g/min); CH₂O: clearance de água livre (mL/g/min) **p = 0,009.**

Gráfico 5. Variação da concentração de substratos no perfusato e na urina em rins perfundidos com alanilglutamina 5 mM a 37°C.



5.9. Perfusão Renal com solução A contendo 4 g% de albumina, glutamina 1 mM e glutathione 2 mM a 22°C.

Cinco animais fizeram parte deste grupo de perfusão. Os rins destes animais foram perfundidos durante noventa minutos com solução A contendo 4 g% de albumina bovina, glutamina 1 mM e glutathione 2 mM a 22°C, previamente dialisada. Os resultados deste grupo estão demonstrados na tabela 10. Os fluxos de perfusato variaram de 19 a 28 mL/min.

A resistência vascular diminui à medida que o tempo passa variando a média de 4,96 a 5,69 mmHg/mL/g/min ($p = 0,903$). O fluxo urinário aumentou também à medida que a perfusão progride variando a média de 0,037 a 0,107 mL/g/min ($p < 0,001$). O ritmo de filtração glomerular aumenta também com o tempo de perfusão variando a média de 0,042 a 0,163 mL/g/min ($p = 0,002$).

No tocante ao transporte absoluto de sódio há um aumento progressivo com o valor final quase dez vezes maior e a média variando de 0,64 a 6,12 uEq/g/min ($p = 0,247$). Já o transporte percentual de sódio mostra uma tendência de aumento nos primeiros trinta minutos para depois cair e ficar estável e voltar a cair no minuto 70 com uma média variando de 8,96 a 28,28% ($p = 0,656$). O transporte absoluto de potássio aumenta até o minuto 40 quando cai e volta a subir e ficando no final com um valor acima do inicial com uma média variando de -0,13 a 1,88 uEq/g/min ($p = 0,888$). Com relação o transporte percentual de potássio há um crescimento de um valor negativo até o minuto 60 com uma média variando de -6,19 a 22,42% ($p = 0,889$). No transporte absoluto de cloro há um aumento até os trinta minutos iniciais quando começa a cair e subir novamente no minuto 60 chegando ao final com um valor mais de onze vezes superior e a média variando de 0,58 a 6,67 uEq/g/min ($p = 0,423$). Com relação ao transporte percentual de cloro há um incremento até o minuto 40, mas o valor final muito superior ao valor inicial com uma média variando de 7,36 a 25,23% ($p = 0,498$). O clearance osmolar aumenta com o tempo de perfusão variando a média de 0,034 a 0,105 mL/g/min ($p < 0,001$). E o clearance de água livre mostra uma estabilidade durante toda a perfusão variando a média de -0,001 a 0,003 mL/g/min ($p = 0,878$).

Neste grupo as concentrações de glutamina tendem a aumentar no perfusato nos primeiros sessenta minutos para depois cair e a média variam de 4283 a 6293 uM e a excreção urinária mantém-se estável e a média variando de 5050 a 5650 uM

e com relação ao glutathione as médias das concentrações no perfusato diminuem drasticamente variando de 727 a 3116 uM e somente observa-se a presença de glutathione na urina somente nos primeiros trinta minutos. Todos estes dados podem ser observados no gráfico 6.

Tabela 10. Dinâmica de perfusão de rins perfundidos com solução A contendo 4 g% de albumina bovina associado a glutamina 1 mM e glutatión 2 mM a 22°C.

TP	R	FU	RFG	TNa ⁺	%TNa ⁺	TK ⁺	%TK ⁺	TCI ⁻	%TCI ⁻	Cosm	CH ₂ O
10	5,69±0,26	0,04±0,004	0,04±0,01	0,64±0,44	8,96±7,68	-0,13±0,19	-6,19±11,31	0,58±0,48	7,36±6,23	0,034±0,01	0,003±0,001
20	5,42±0,24	0,05±0,008	0,07±0,01	1,88±0,82	20,07±8,12	0,55±0,20	17,83±4,59	1,91±1,04	16,58±7,74	0,050±0,01	0,001±0,002
30	5,33±0,22	0,05±0,013	0,09±0,02	3,77±1,83	28,28±9,37	1,09±0,56	19,52±9,16	4,14±2,12	24,36±9,28	0,049±0,01	0,001±0,001
40	5,23±0,32	0,06±0,013	0,09±0,02	3,78±1,48	26,93±7,48	1,10±0,54	19,77±8,08	3,69±1,67	25,23±6,37	0,055±0,01	0,001±0,001
50	5,14±0,37	0,05±0,013	0,07±0,02	2,12±0,92	26,52±5,04	0,36±0,18	13,33±3,95	2,16±1,04	22,14±5,50	0,048±0,01	0,001±0,001
60	5,14±0,36	0,06±0,017	0,08±0,02	2,53±0,86	25,73±3,80	0,58±0,14	22,42±4,98	2,51±0,90	21,84±3,37	0,061±0,01	0,002±0,001
70	5,07±0,36	0,08±0,026	0,12±0,05	3,78±2,37	19,97±5,85	1,06±0,85	15,37±6,74	3,79±2,59	15,46±5,47	0,083±0,03	-0,001±0,002
80	4,98±0,33	0,10±0,026	0,14±0,06	5,21±3,61	16,94±9,71	1,44±1,33	10,08±8,72	5,54±4,17	14,93±7,62	0,094±0,02	0,002±0,003
90	4,96±0,31	0,11±0,026	0,16±0,06	6,12±3,70	23,26±6,83	1,88±1,40	15,12±7,63	6,67±4,43	19,00±7,06	0,106±0,02	0,003±0,002

Os resultados são expressos em média ± e.p.m.; cinco animais foram utilizados neste grupo; TP: tempo(min); R: resistência vascular(mmHg/mL/g/min); FU: fluxo urinário(mL/g/min) $p < 0,001$; RFG: ritmo de filtração glomerular(mL/g/min) $p = 0,002$; TNa⁺: transporte absoluto de sódio(uEq/g/min); %TNa⁺: percentual do transporte de sódio; TK⁺: transporte absoluto de potássio(uEq/g/min); %TK⁺: percentual de transporte de potássio; TCI⁻: transporte absoluto de cloreto(uEq/g/min); %TCI⁻: percentual de transporte de cloreto; Cosm: clearance osmolar(mL/g/min) $p < 0,001$; CH₂O: clearance de água livre(mL/g/min).

Gráfico 6. Variação da concentração de substratos no perfusato e na urina em rins perfundidos com glutamina 1 mM + glutatation 2 mM a 22°C.

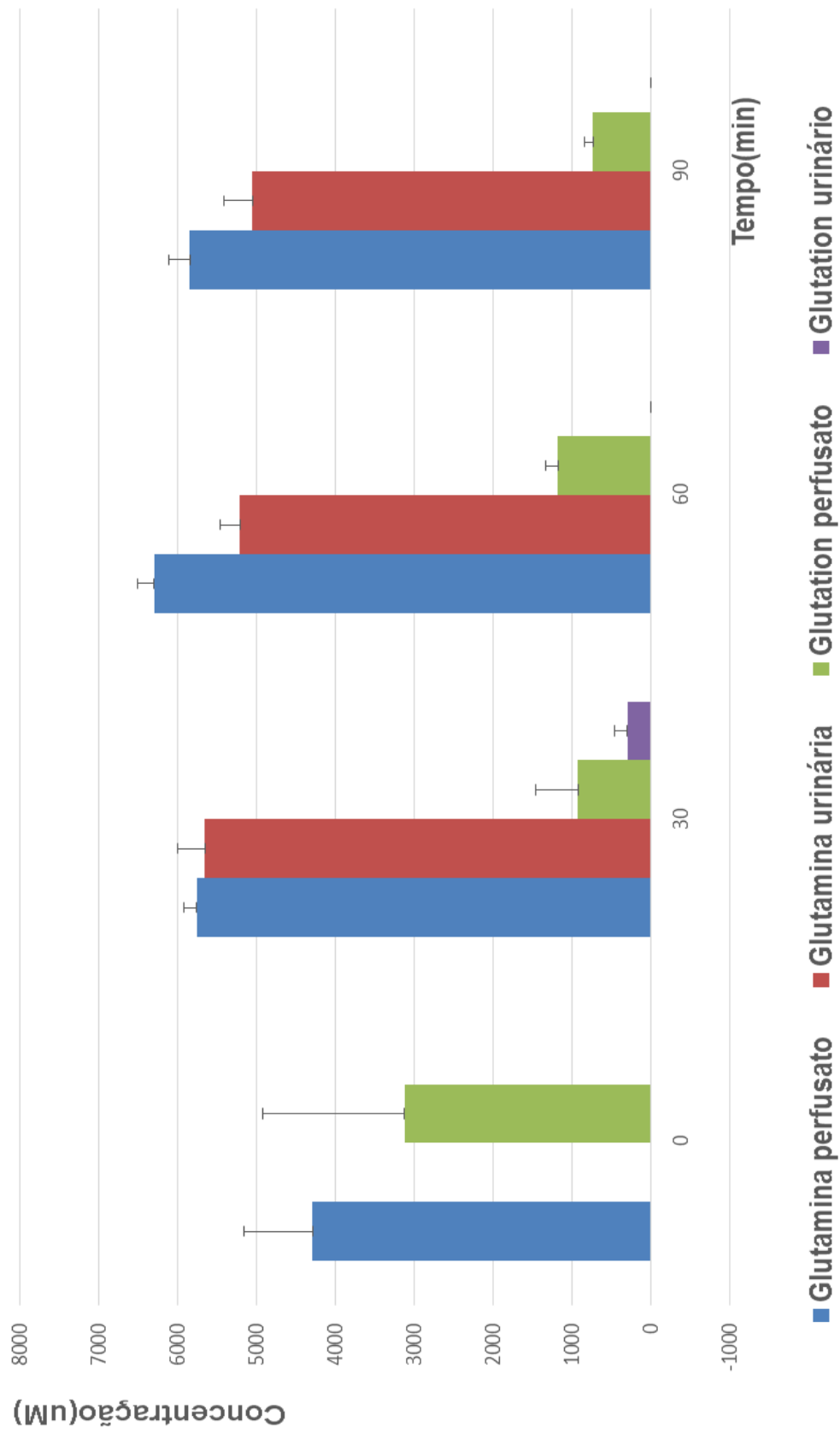


Gráfico 7A. Cinética da resistência vascular de rins perfundidos com diferentes soluções de preservação.

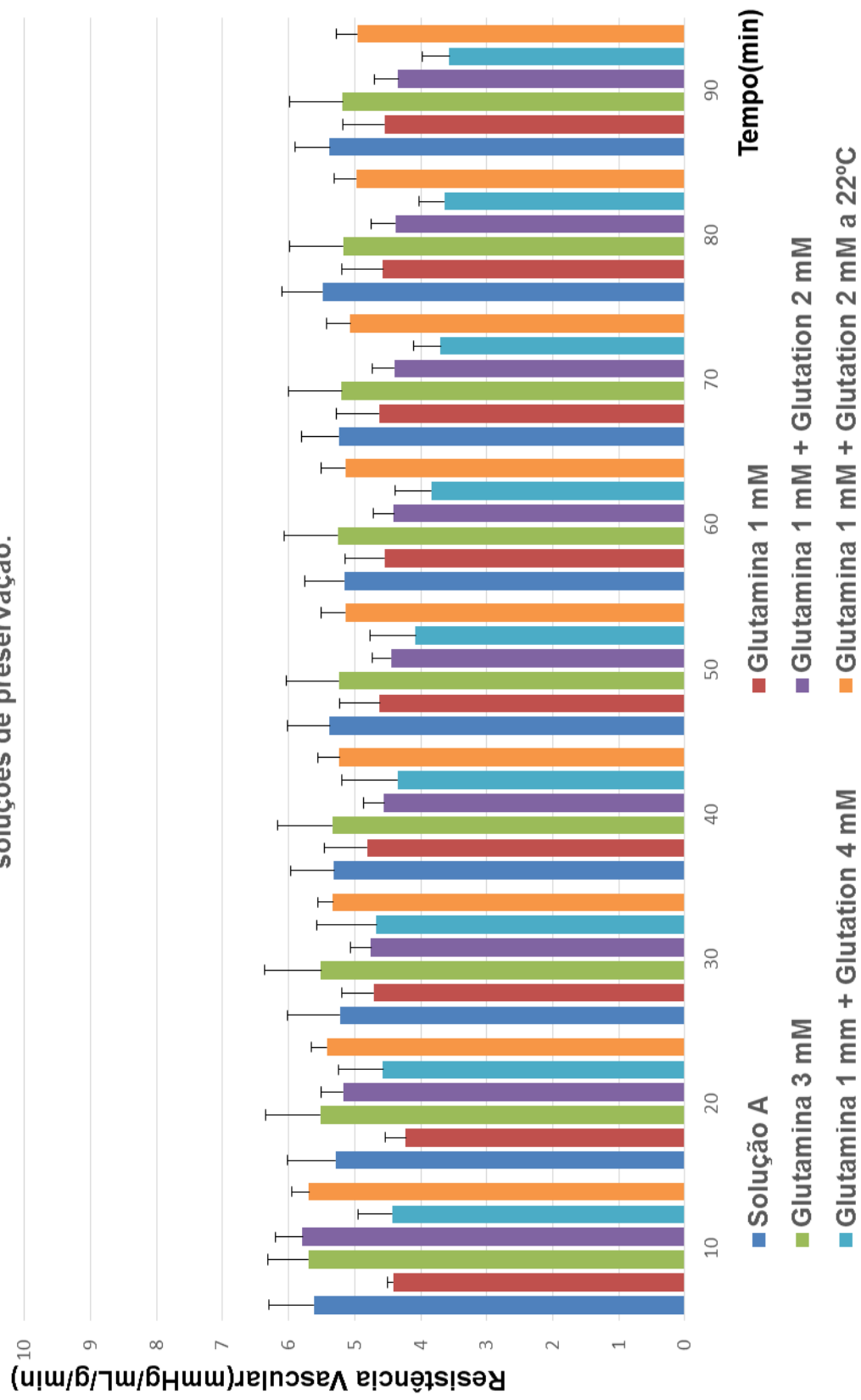
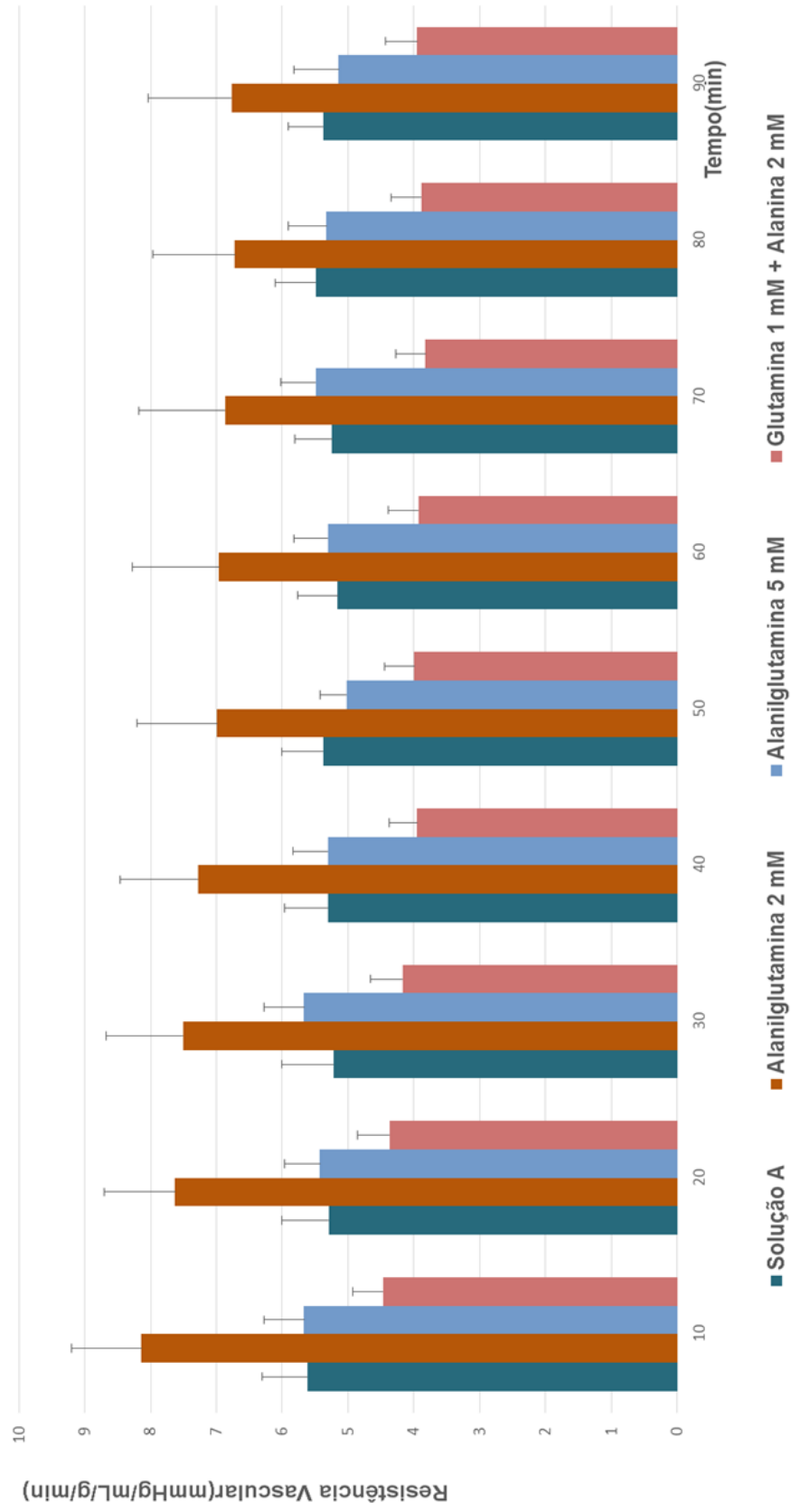


Gráfico 7B. Cinética da resistência vascular de rins perfundidos com diferentes soluções de preservação a 37 °C.



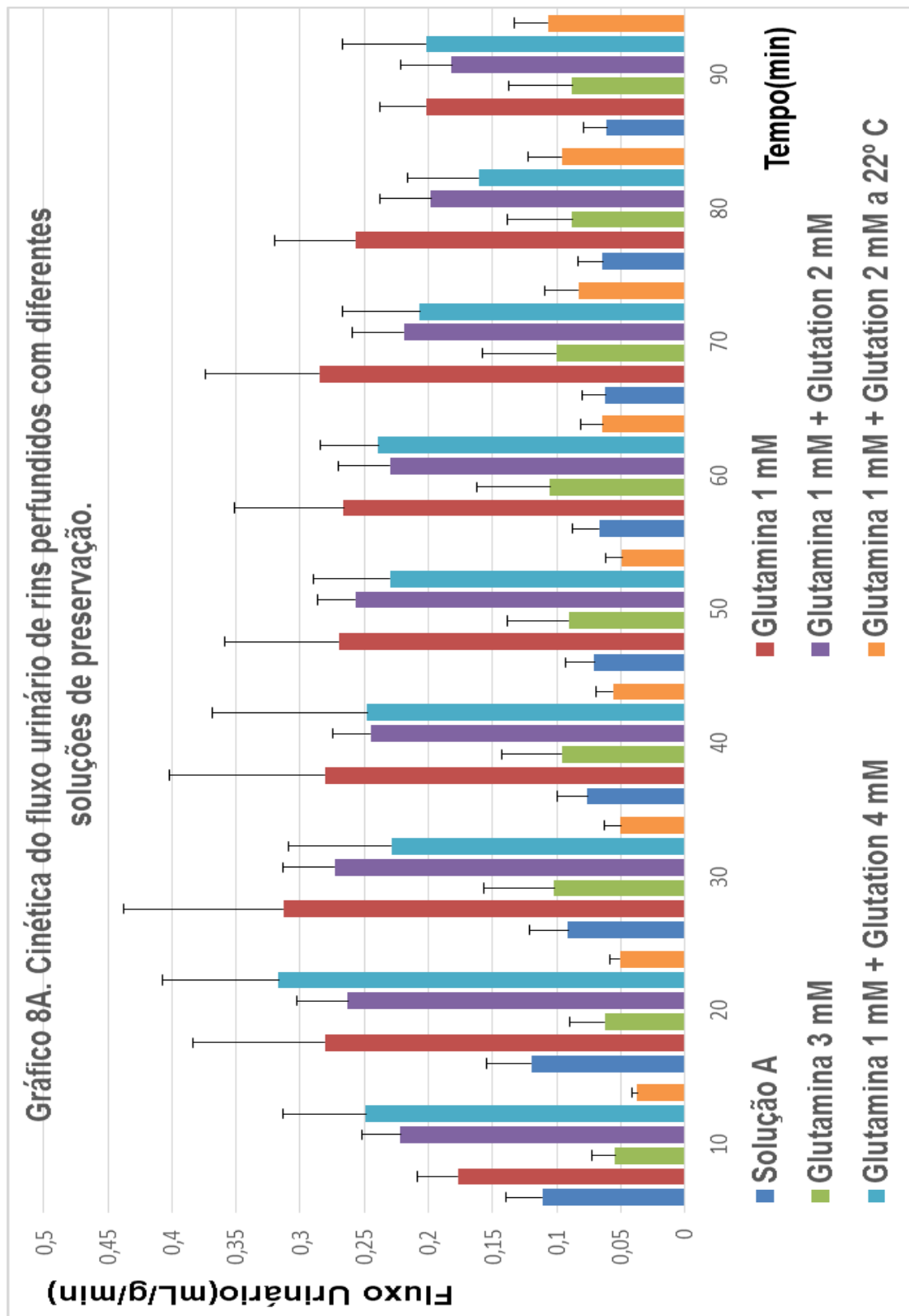


Gráfico 8B. Cinética do fluxo urinário de rins perfundidos com diferentes soluções de preservação a 37° C.

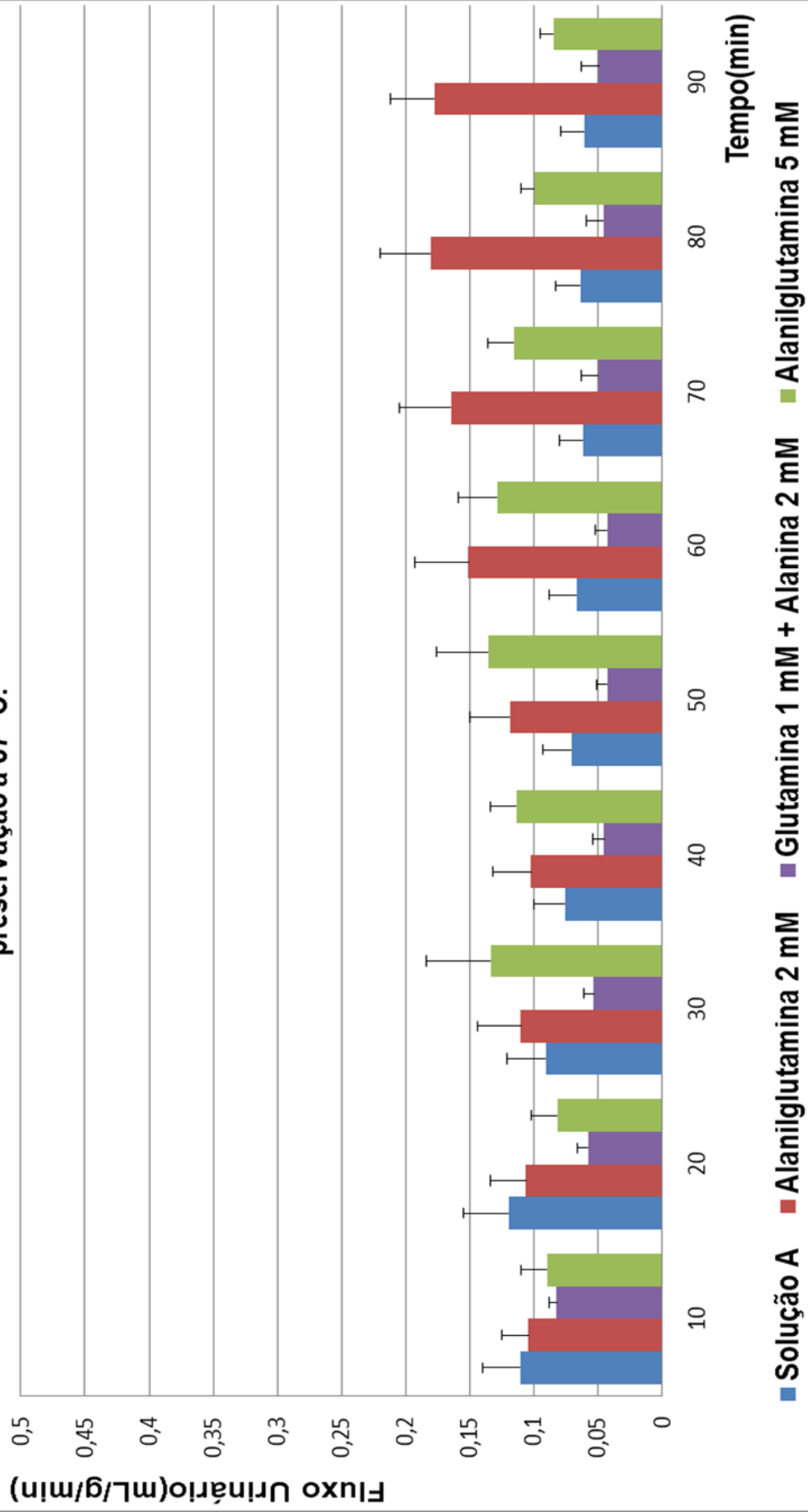


Gráfico 9A. Cinética do ritmo de filtração glomerular de rins perfundidos com diferentes soluções de preservação.

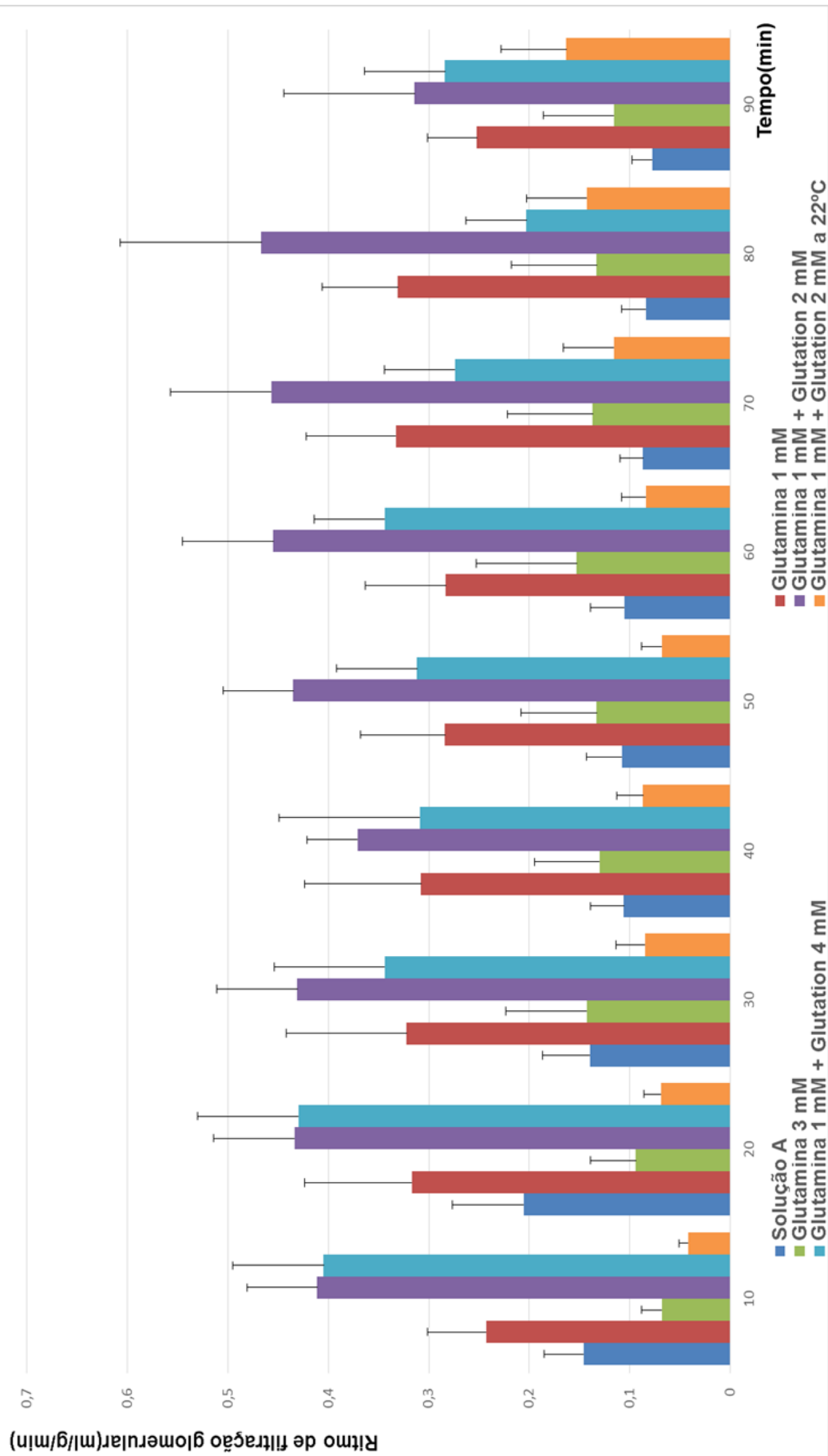


Gráfico 9B. Cinética do ritmo de filtração glomerular de rins perfundidos com diferentes soluções de preservação a 37° C.

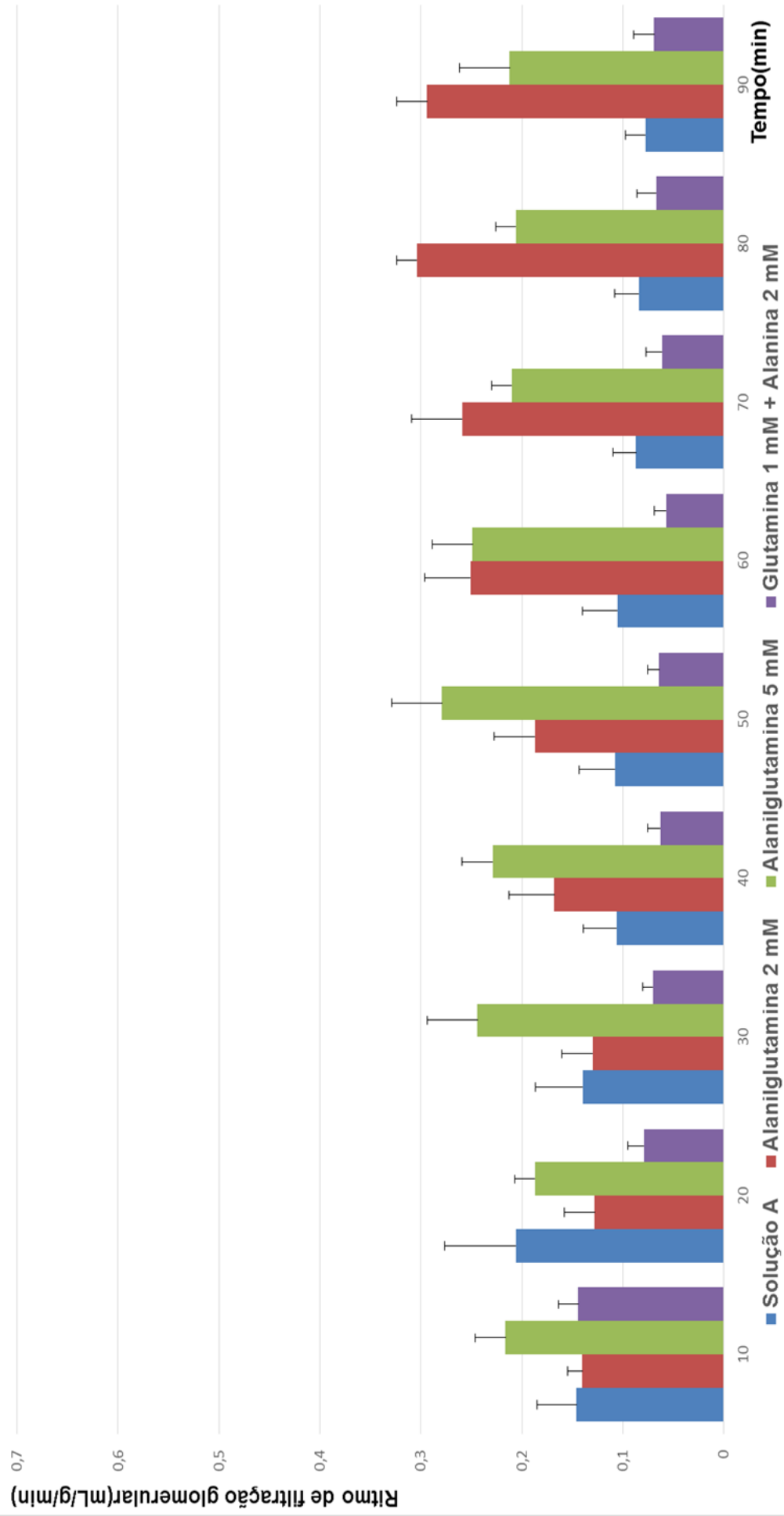


Gráfico 10A. Cinética do transporte absoluto de sódio de rins perfundidos com diferentes soluções de preservação.

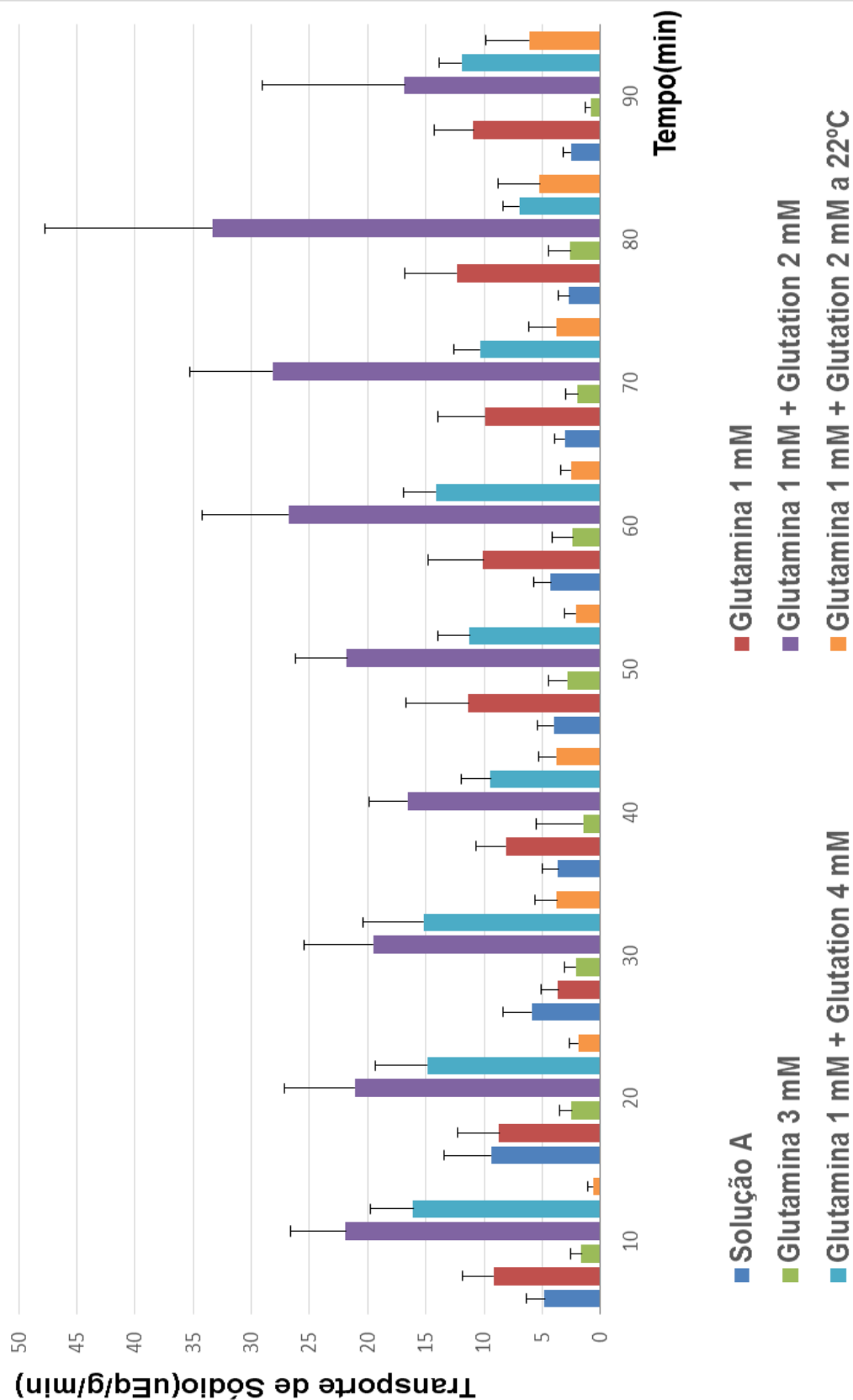
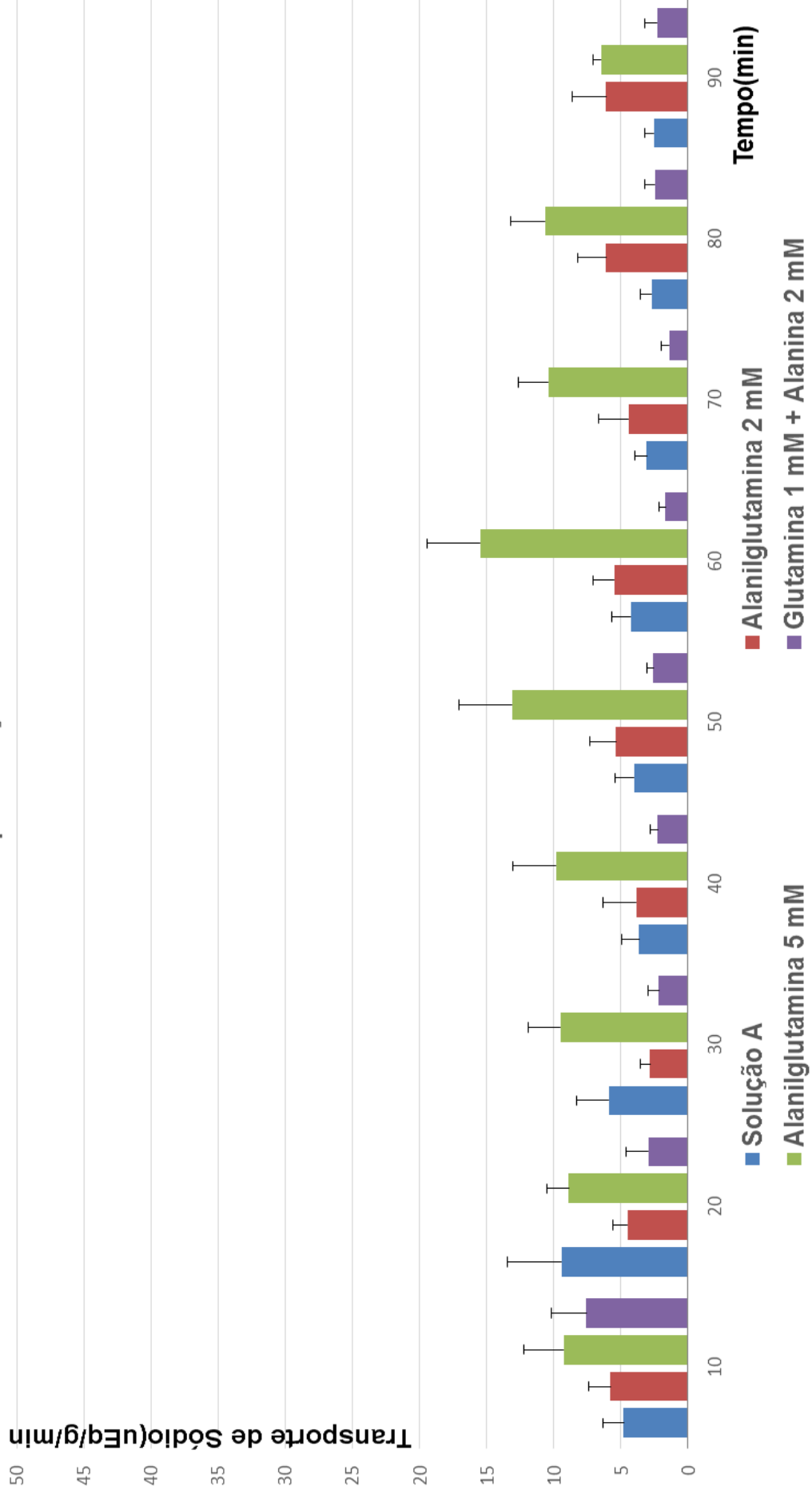
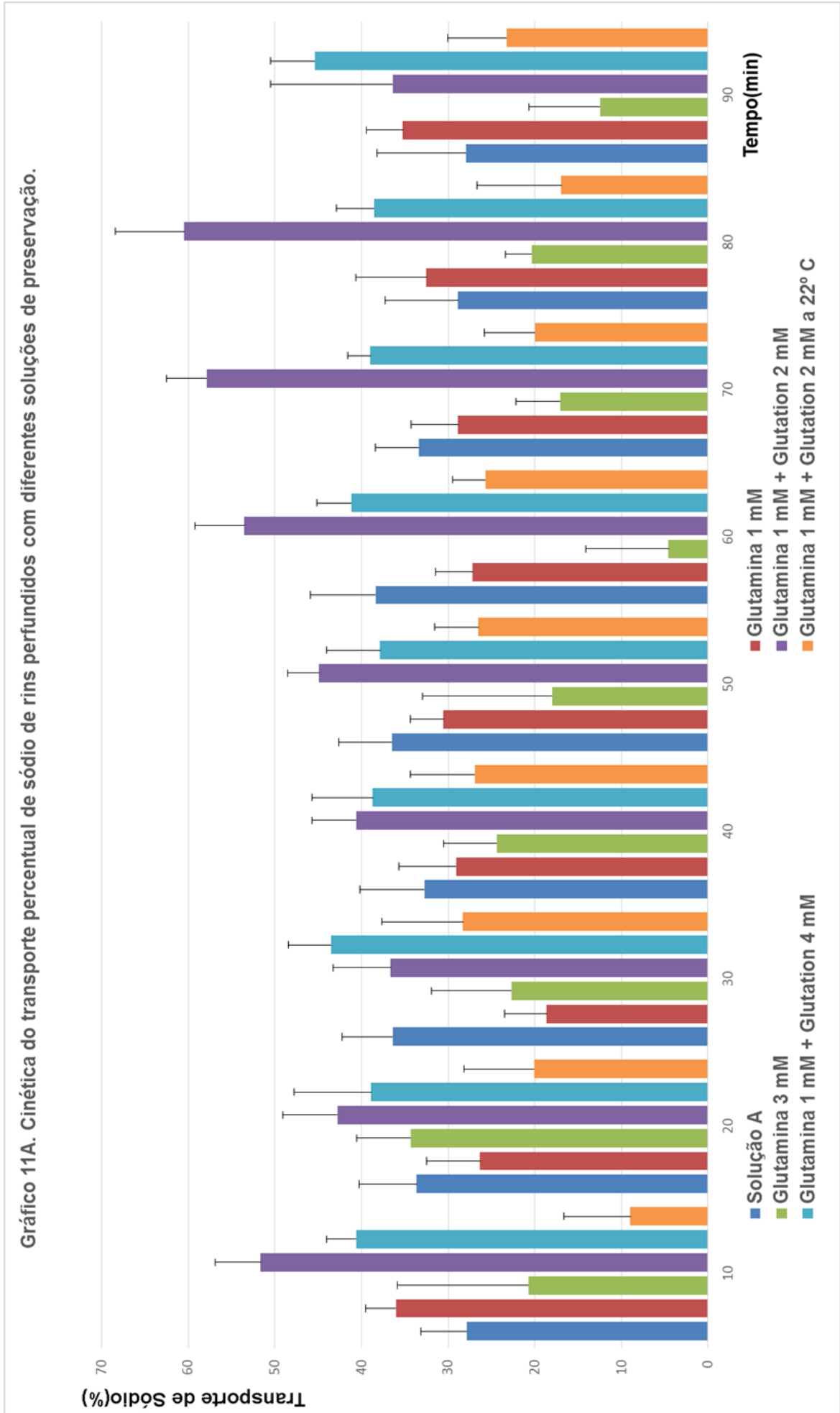


Gráfico 10B. Cinética do transporte absoluto de sódio de rins perfundidos com diferentes soluções de preservação a 37° C.





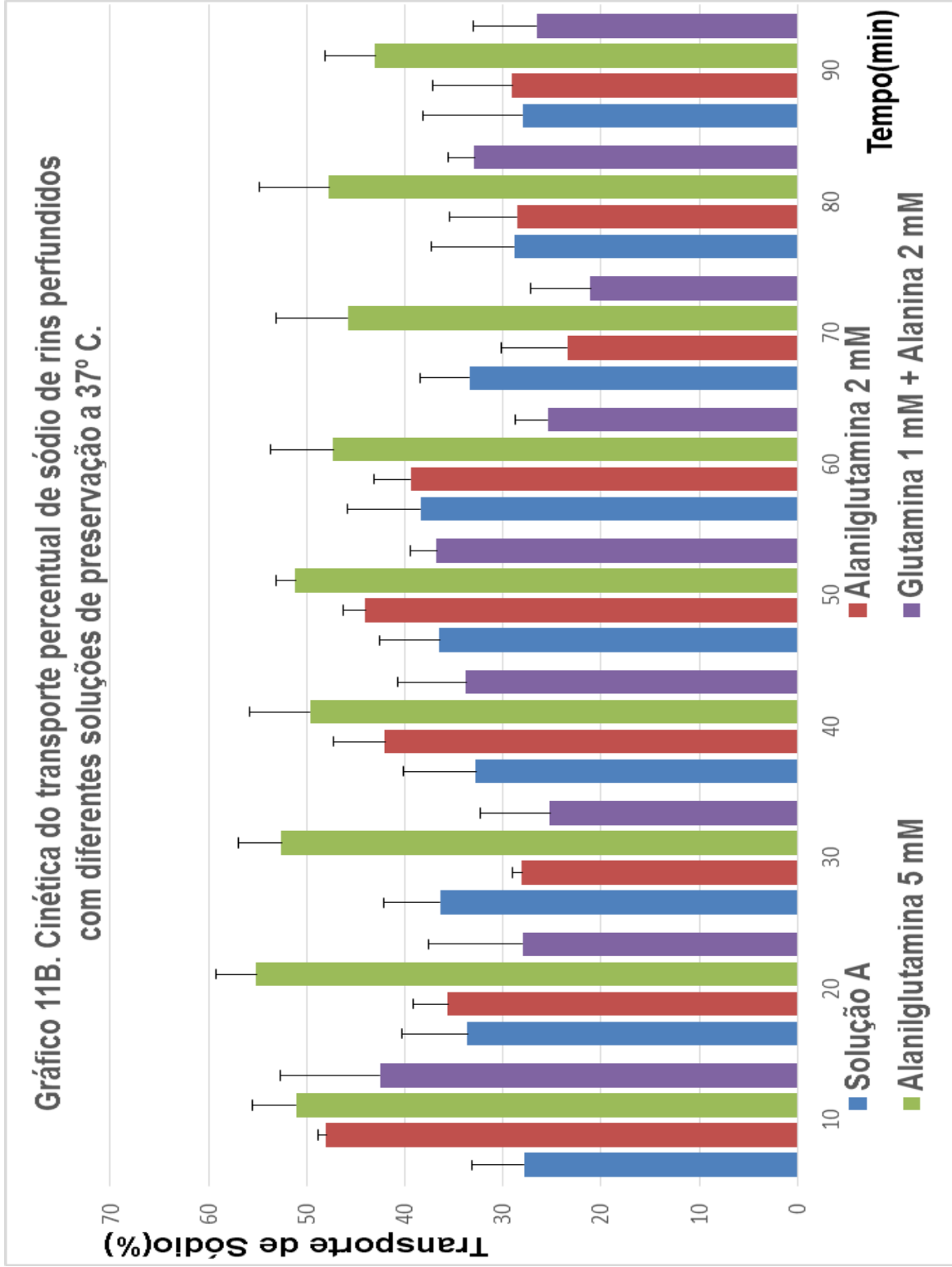


Gráfico 12A. Cinética do transporte absoluto de potássio de rins perfundidos com diferentes soluções de preservação.

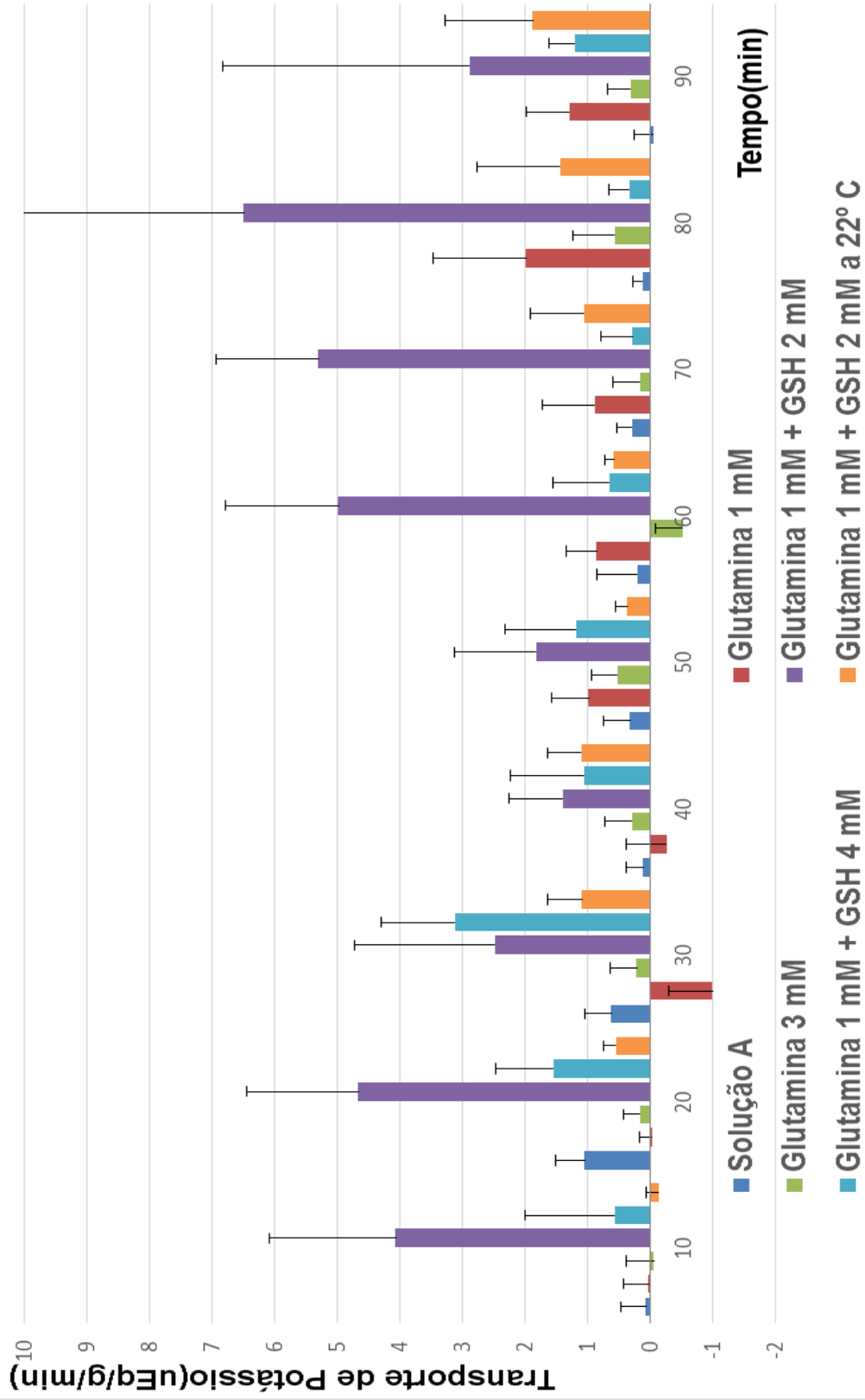


Gráfico 12B. Cinética do transporte absoluto de potássio de rins perfundidos com diferentes soluções de preservação a 37° C.

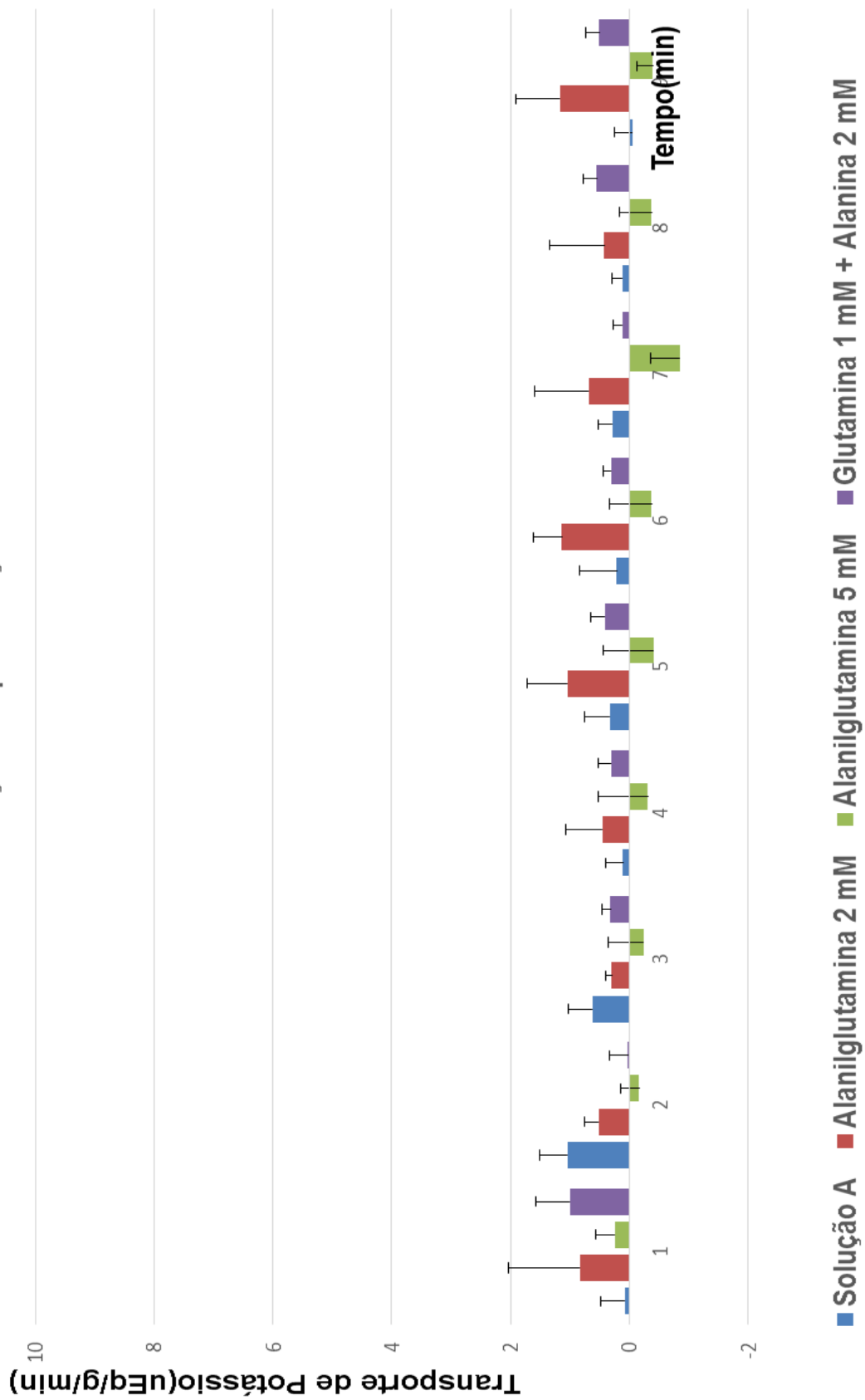


Figura 13A. Cinética do transporte percentual de potássio de rins perfundidos com diferentes soluções de preservação.

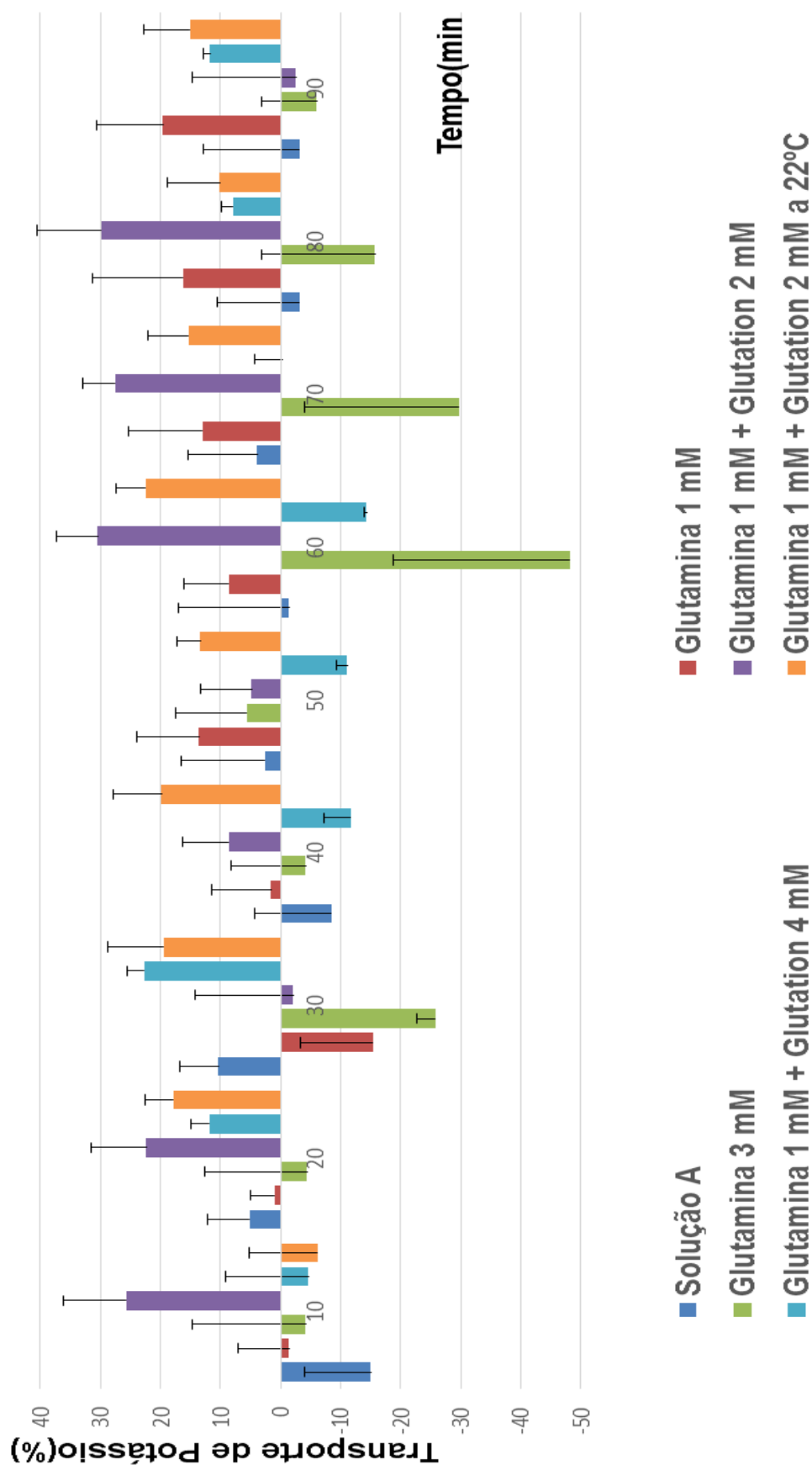


Figura 13B. Cinética do transporte percentual de potássio de rins perfundidos com diferentes soluções de preservação a 37° C.

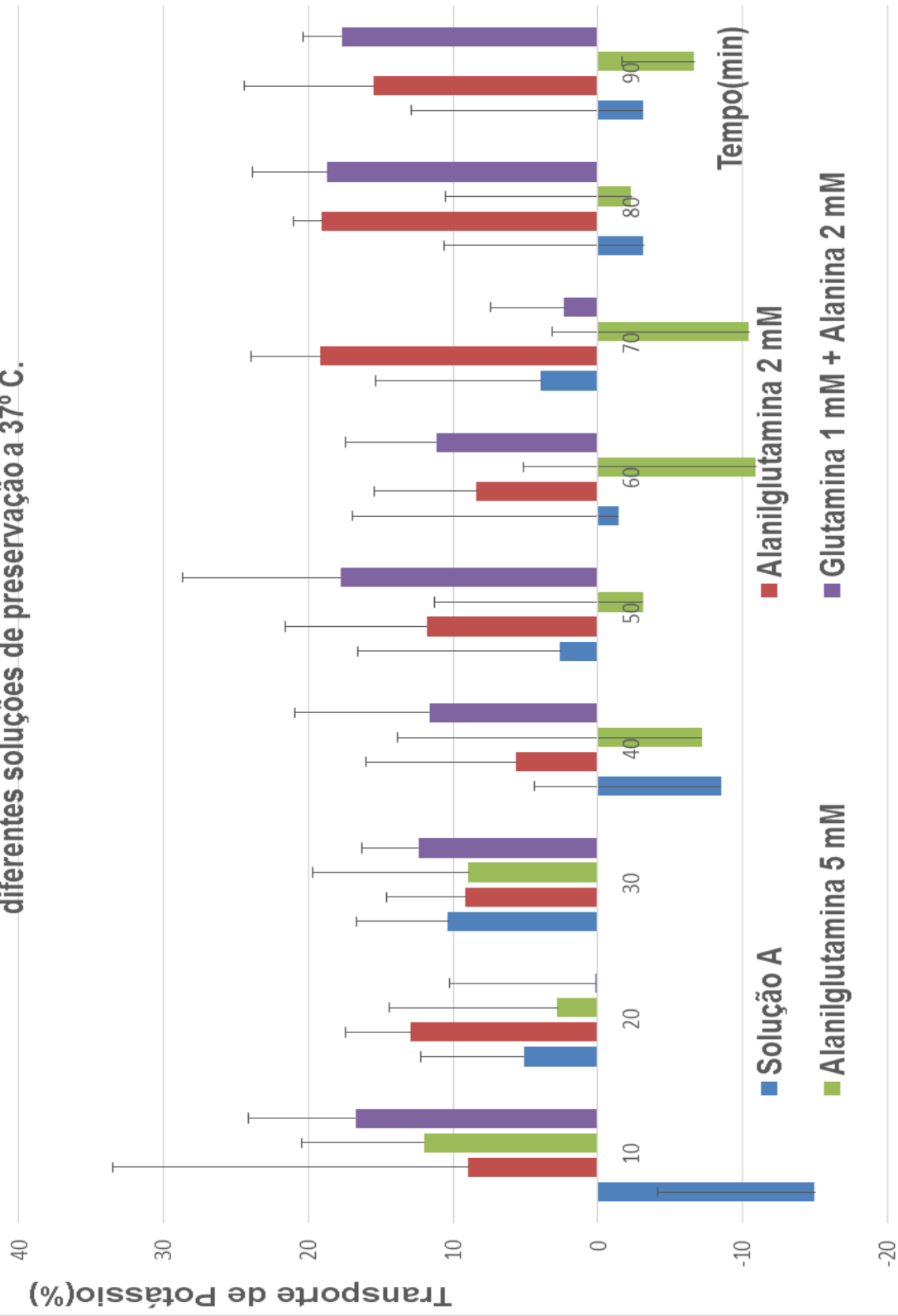


Gráfico 14A. Cinética do transporte absoluto de cloreto de rins perfundidos com diferentes soluções de preservação.

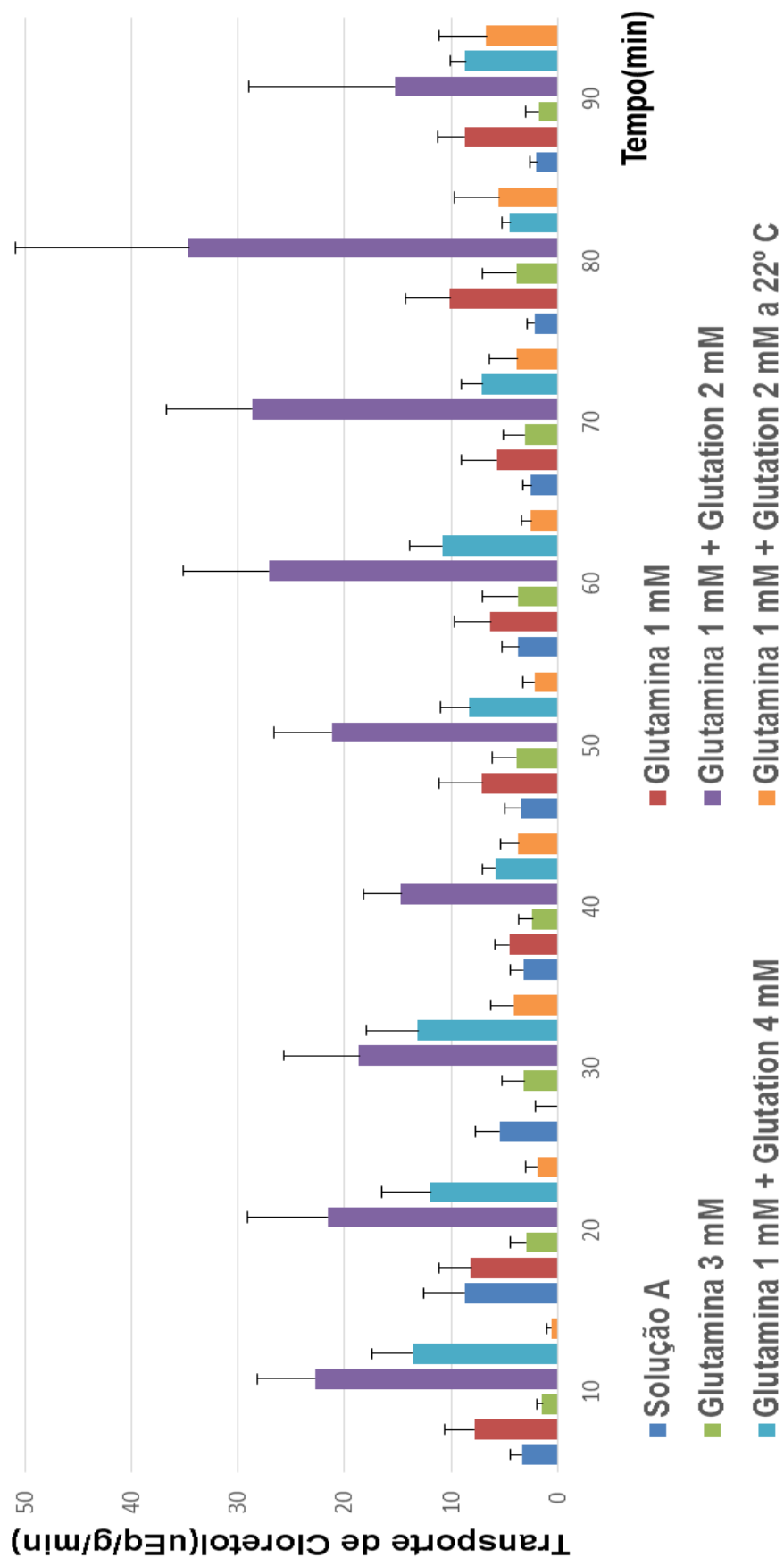


Gráfico 14B. Cinética do transporte absoluto de cloreto de rins perfundidos com diferentes soluções de preservação a 37° C.

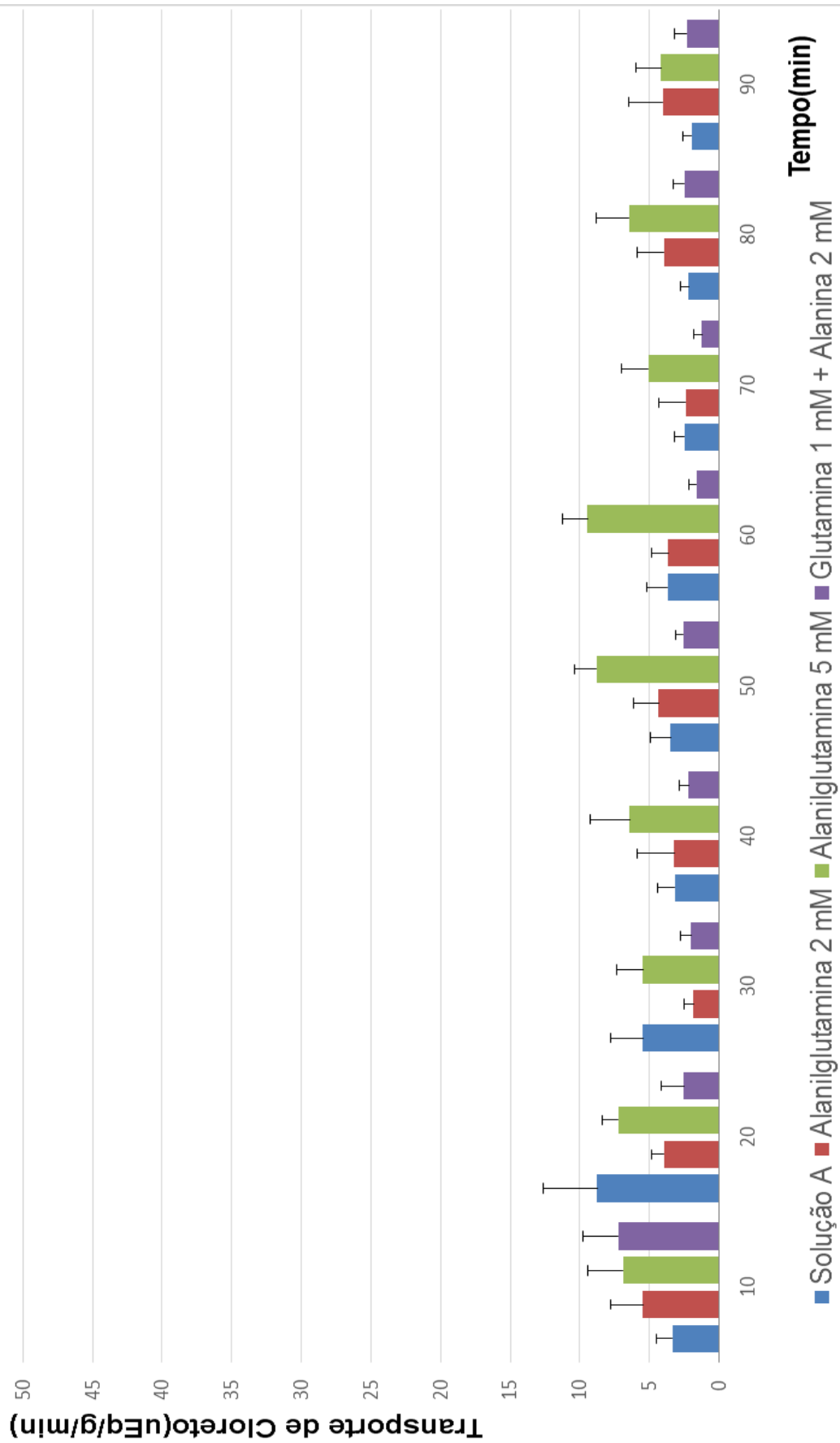


Gráfico 15A. Cinética do transporte percentual de cloreto de rins perfundidos com diferentes soluções de preservação.

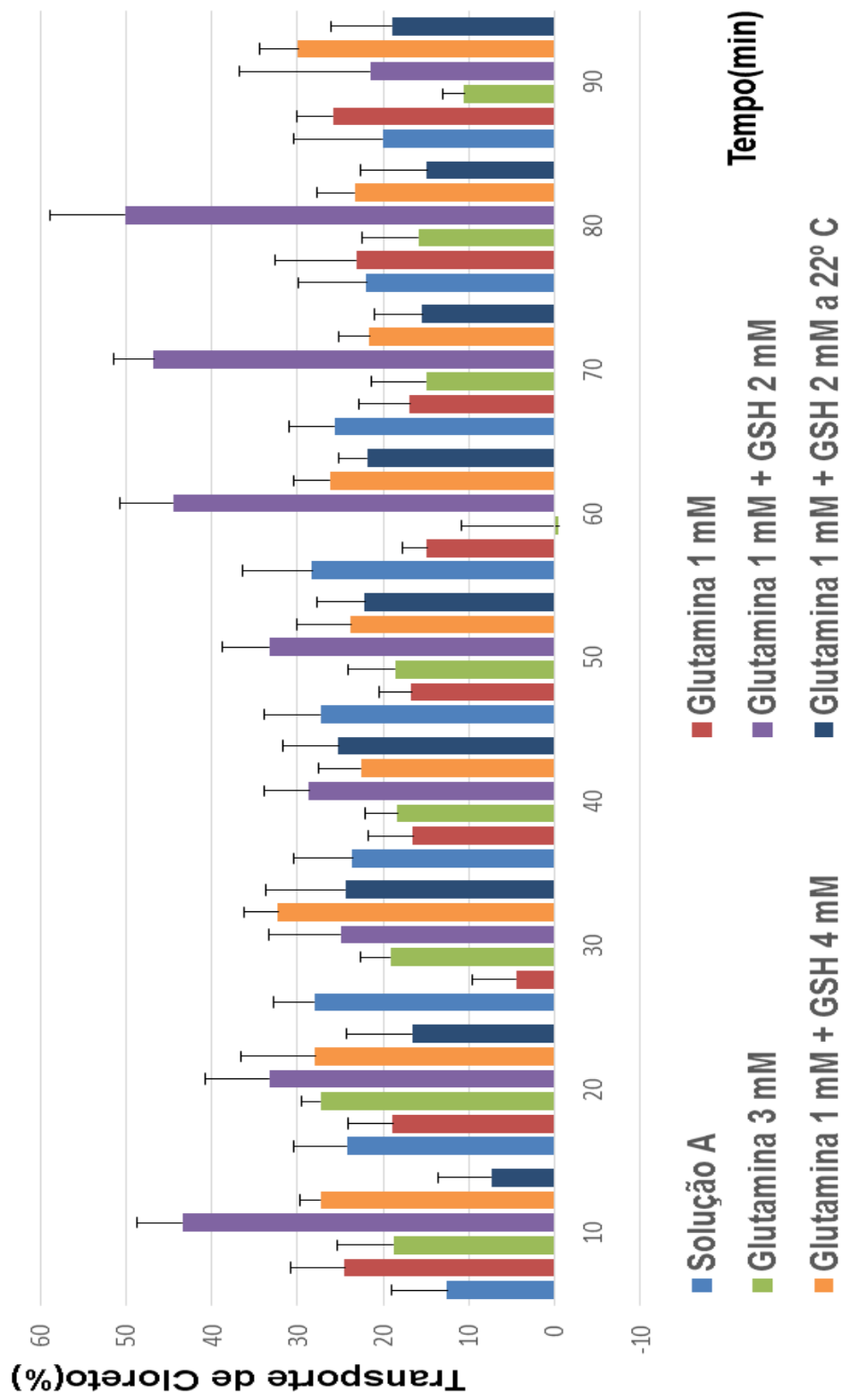
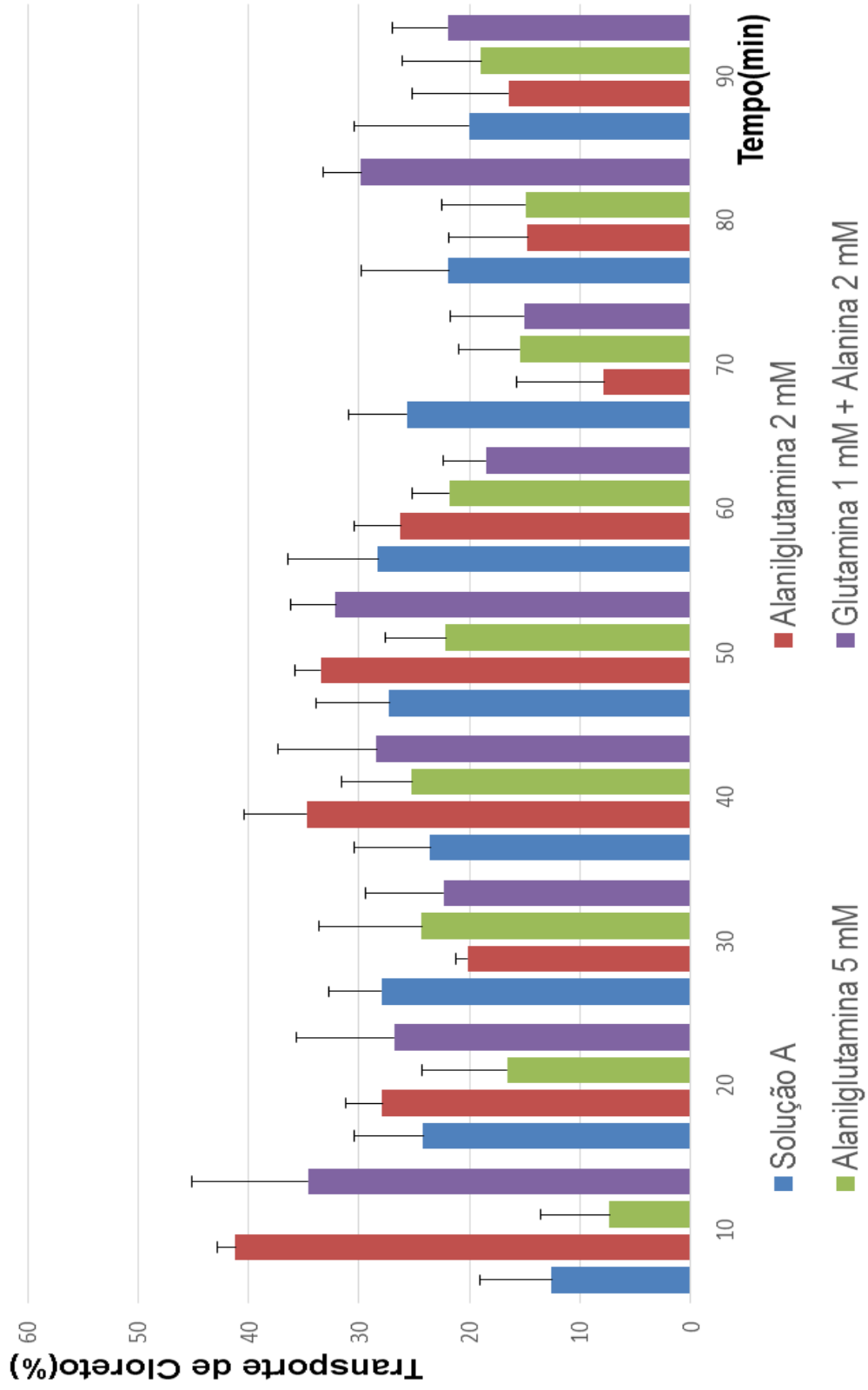


Gráfico 15B. Cinética do transporte percentual de cloreto de rins perfundidos com diferentes soluções de preservação a 37° C.



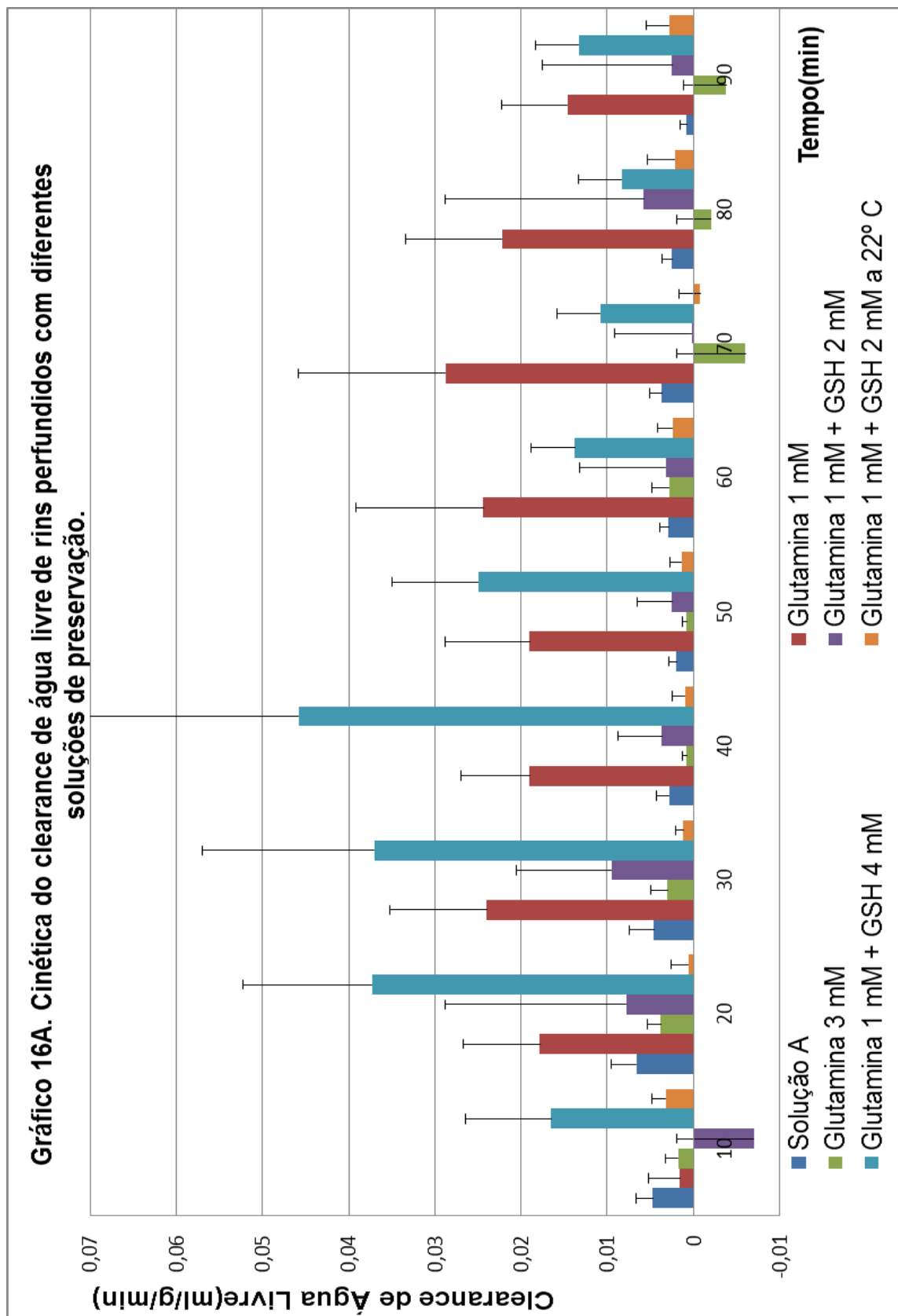
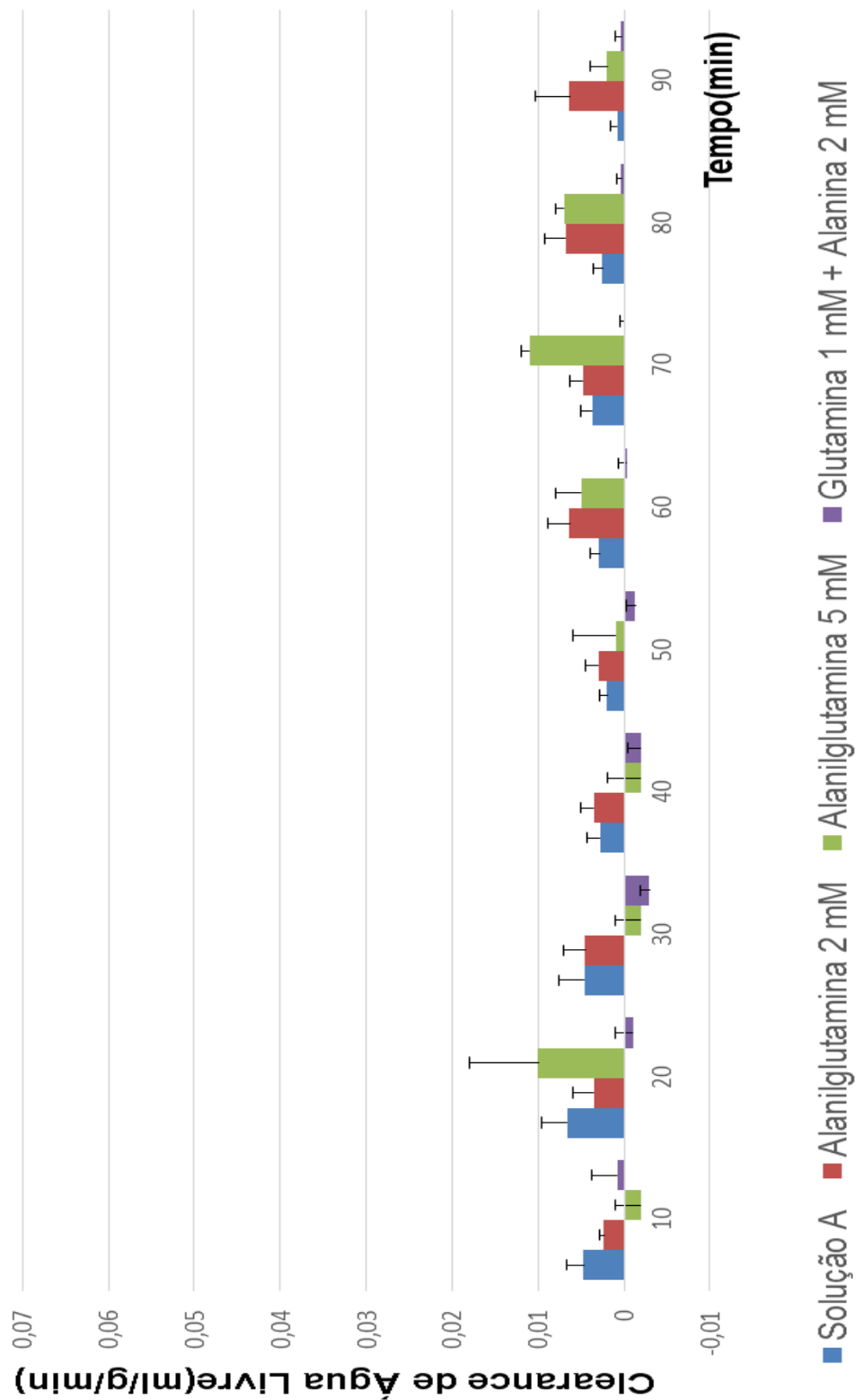


Gráfico 16B. Cinética do clearance de água livre de rins perfundidos com diferentes soluções de preservação a 37° C.



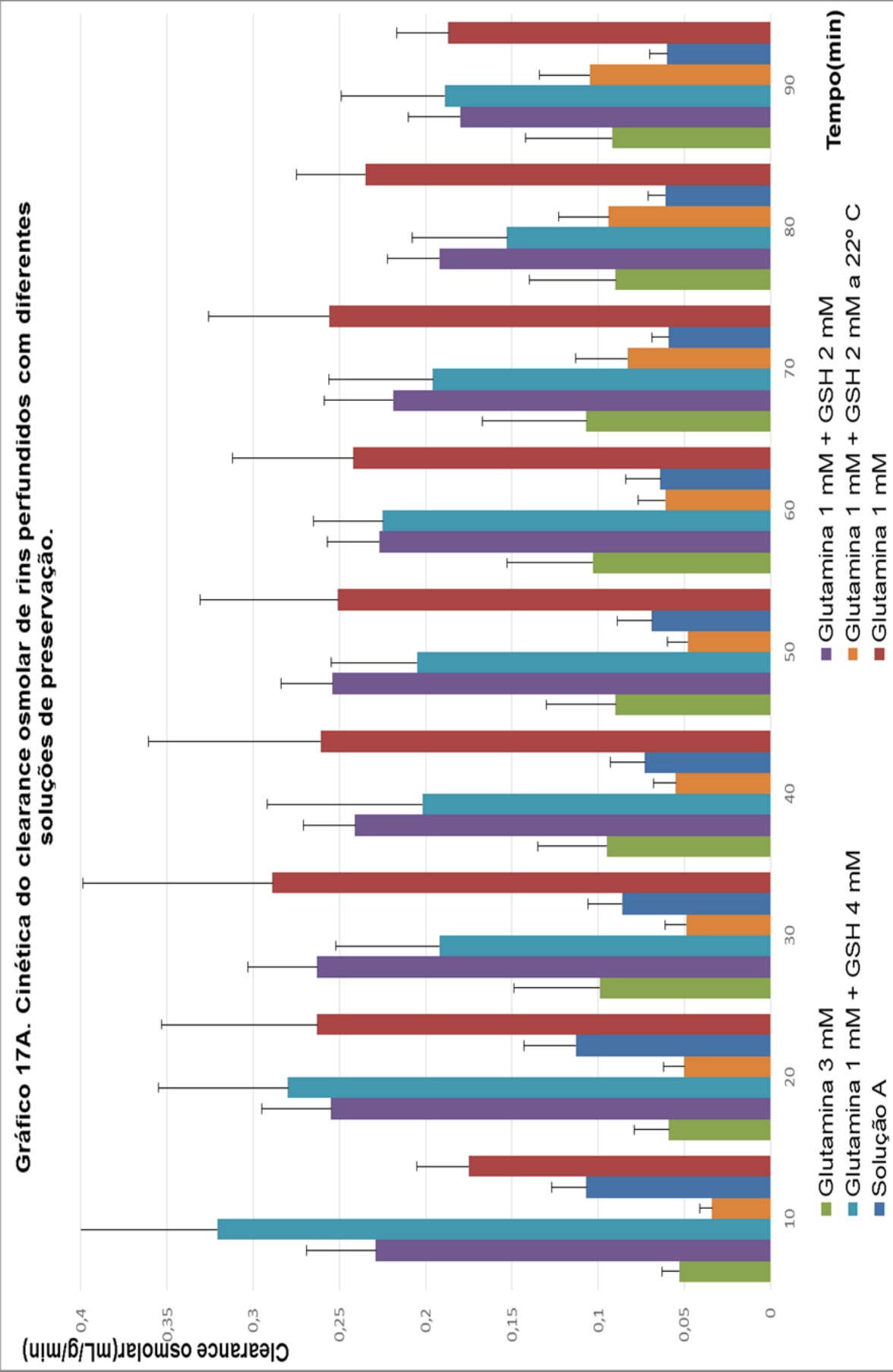
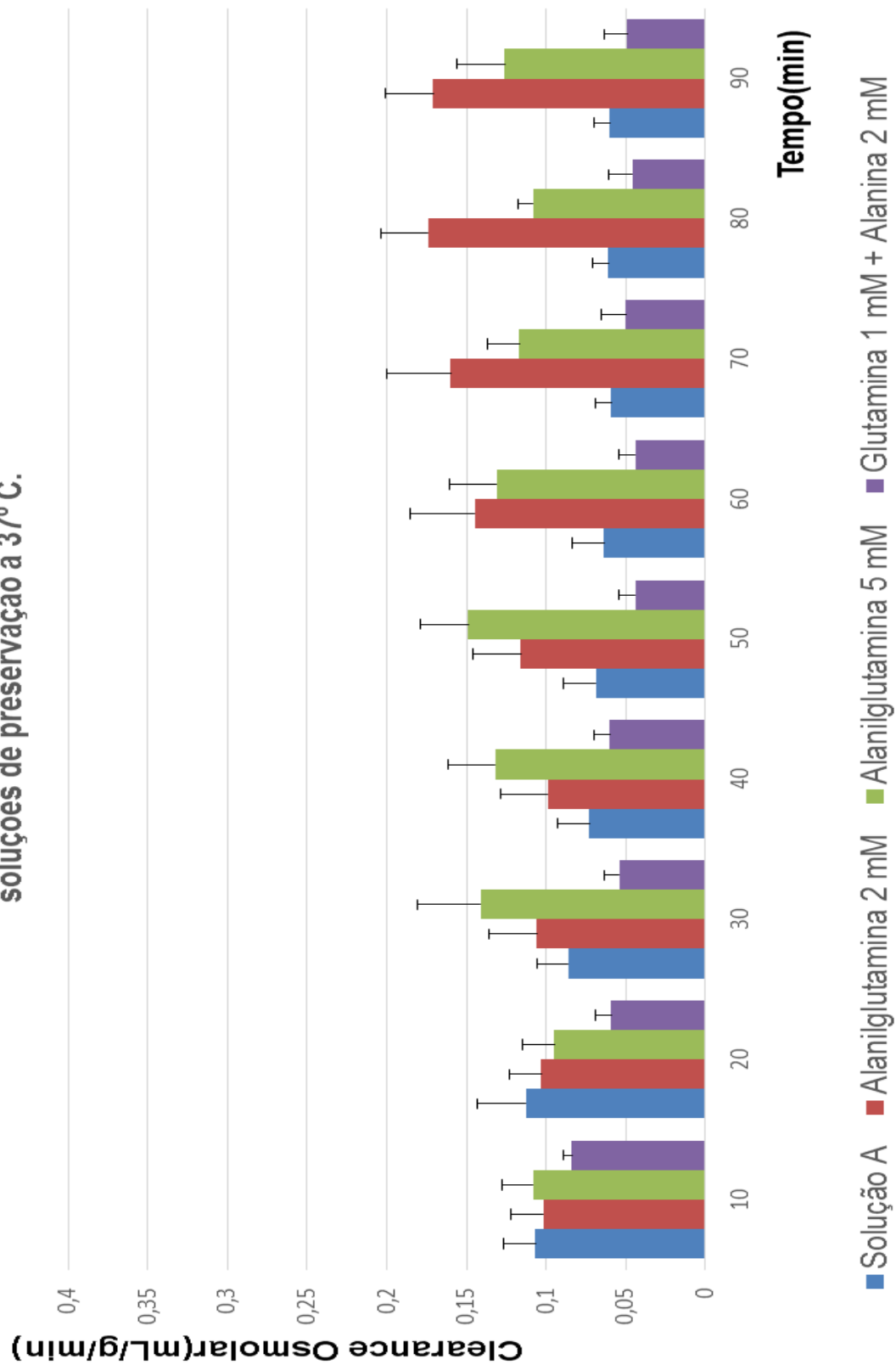


Gráfico 17B. Cinética do clearance osmolar de rins perfundidos com diferentes soluções de preservação a 37° C.



6. DISCUSSÃO

A perfusão do rim isolado ganhou significado clínico como um meio para a conservação para transplante. O rim perfundido e isolado tem se tornado um método popular, para estudar os efeitos das condições na função renal da preservação hipotérmica (Southard e cols., 1985). O perfusato ideal tem sido considerado aquele que mimetiza a composição do fluido extracelular e da osmolaridade com substratos de glicose, ácidos graxos ligados a albumina e oxigênio (Marshall, 1984). Os primeiros perfusatos foram constituídos para mimetizar o sangue e por este motivo tinham uma concentração de sódio em torno de 140mM e uma concentração de potássio de 4mM (Pegg e Farrant, 1969).

O rim perfundido e isolado de coelho tem sido usado por muitos pesquisadores, com o objetivo de testar as soluções de preservação. Desenvolvimentos recentes em preservação de órgãos e em transplantes têm renovado o interesse pelas preparações de modelos ex-vivo como uma alternativa para o estudo das técnicas que promovam a viabilidade de órgãos a longo prazo (Rice e cols., 1985; Berkowitz e cols., 1968). O modelo in vitro de perfusão renal normotérmica com um meio definido tem fornecido uma útil alternativa nos estudos de preservação renal de ratos e de coelhos (Segal e Guttman, 1983). Este modelo fornece ao investigador a oportunidade de determinar os efeitos das condições de preservação na função renal incluindo o ritmo de filtração glomerular e a reabsorção de sódio. Com esta técnica, muitas condições de preservação podem ser rapidamente analisadas em termos dos efeitos na função renal, resultando na geração de dados que podem ser relevantes para a obtenção de melhores preservação de órgãos (Southard e cols., 1985).

Duas ações se tornaram importantes nesta pesquisa, a avaliação das funções fisiológicas e o uso de substratos necessários para o funcionamento do órgão, numa solução rica em potássio e em magnésio. Tem-se adicionado diversos substratos às soluções de preservação com o objetivo de manter a integridade celular ex-vivo. 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 a cisteína maximiza o progresso alcançado pela solução (Marshall, 1984).

Uma das primeiras observações sobre este tema foi publicada por Fonteles e colaboradores em 1985. Estes autores demonstraram num modelo limitado de substratos, que ácidos graxos eram extremamente importantes para o transporte de sódio. Tradicionalmente, o rim isolado e perfundido ofereceu um sistema informativo para investigar a biologia renal sem a interferência de outros órgãos. O rim isolado e perfundido foi estabelecido pela primeira vez em 1876 por Bunge e Schmeideberg e é comumente utilizado como uma ferramenta de triagem para o *clearance* renal e o seu metabolismo, correlacionando-os com a deposição de drogas renais para a função renal in vitro. A integridade funcional em todo o néfron é preservada, permitindo a determinação simultânea da filtração, a excreção urinária e a reabsorção, os três principais parâmetros da função renal. Portanto, o rim isolado e perfundido é uma ferramenta útil para investigar a manipulação biológica de compostos que de outra forma seriam difíceis de executar in vitro, já que é possível selecionar substratos específicos (Chang e cols., 2013).

O glutathione (GSH) está presente em rins frescos em concentrações muito elevadas com 9-10mM. O GSH está envolvido no processo de absorção de aminoácidos e açúcares em fatias de córtex de rim. Além disso, foi estabelecido que o rim de mamífero contém uma proteína quinase dependente de AMP cíclico, que pode ser inibida pela diamida promotor da oxidação do GSH. Dados mostram que o rim isolado e perfundido é capaz de extrair grandes quantidades de GSH do perfusato (Fonteles e cols., 1976). Por isso é importante fazer a reposição deste substrato às estas soluções (Fonteles e cols., 1978). A estocagem a frio das células tubulares renais, tem sido mostrada estar associada com a geração aumentada de espécies reativas de oxigênio e níveis reduzidos de glutathione celular, ambos levando a depleção de ATP, lesão de DNA e degradação de membrana. Foi confirmada a ocorrência de peroxidação lipídica durante a estocagem a frio (Ahlenstiel e cols., 2006).

Na presente pesquisa, resolveu-se de maneira sistemática fazer uma avaliação funcional de uma solução de preservação renal de composição intracelular, rica em potássio e em magnésio, descrita pela primeira vez em 1973-1974 por Fonteles e cols., 1973 e Jeske e cols., 1974. Acrescentamos a esta solução substratos importantes como o glutathione, a glutamina, a alanina ou a

alanilglutamina, um dipeptídeo com o intuito de suprir as suas necessidades metabólicas, e devido a um quadro de isquemia a que o órgão é submetido, muitas vezes por várias horas antes do transplante. Inicialmente, testamos a adição destes substratos num meio normotérmico e num meio subnormotérmico, no qual a demanda metabólica é maior quando comparada com o meio subnormotérmico, no qual esta demanda metabólica diminui.

Vários fatores têm sido postulados para regular a produção de amônia no rim. Um desses fatores reguladores da formação de amônia aumentada durante a acidose pode ser os níveis de glutamato no tecido renal. A análise dos metabólitos do rim demonstra uma queda no teor de glutamato tecidual no início deste quadro metabólico. Esta observação leva para a hipótese de que a queda no teor de glutamato durante a acidose, remove a inibição da glutaminase dependente de fosfato, promovendo assim uma maior absorção de glutamina com subsequente desamidação pelas mitocôndrias. O estímulo para a formação de amônia renal parece ser a queda dos níveis de ATP. A hidrólise do ATP provoca a reação facilitada pela mioquinase AMP desaminase para preservar os níveis de ATP. No rim, o ADP formado como resultado da hidrólise de ATP, pode também estimular o fluxo de glutamato através da glutamato desidrogenase e de α -cetoglutarato desidrogenase para a formação de amônia através desta via(Bogusky e Aoki, 1983).

Uma pesquisa revelou que a glutamina pode desempenhar um papel essencial na sinalização celular e induz a proteínas de choque térmico, que são estruturas proteicas moleculares adventícias importantes que podem diminuir as lesões celulares em uma variedade de condições de stress celular. No rim normal, as proteínas do choque térmico são expressas em níveis baixos. No entanto, elas são abundantemente induzidas especialmente na medula renal quando expostas a vários tipos de stress celular que pode representar um sistema de defesa molecular intrínseca para as células epiteliais tubulares renais. A glutamina é também um importante precursor do glutathione, regulando sua síntese(Labow e Souba, 2000; Hong e cols., 1991). Espécies reativas de oxigênio também desempenham um papel importante no desenvolvimento de lesão renal aguda. A glutamina pode ser benéfica em prevenir lesão renal aguda e seu efeito é induzido através da ativação das proteínas do choque térmico e/ou ação antioxidante, como sugerido(Peng e cols., 2013; Bessems e cols., 2005).

Os animais perfundidos usando uma solução A enriquecida com vários substratos não alteraram a resistência vascular, o transporte absoluto e percentual de potássio e o clearance de água livre. Foi evidenciado que a adição do glutathione causava uma redução da resistência vascular, fato não evidenciado neste trabalho(Araujo Filho, 1994). Para evitar lesões durante a perfusão normotérmica ex-vivo, é concebível que as pressões de perfusão mais baixas podem ser mais benéficas do que as pressões de perfusão mais elevadas para evitar o risco de maiores danos e otimizar a recuperação da função renal do enxerto logo após. Pegg e Farrant em 1969 mostraram que existe uma relação inversa entre concentração de colóides e resistência e entre fluxo e resistência. A relação entre fluxo e resistência poderia ser devido a uma progressiva dilatação dos vasos. Rins perfundidos sem colóides com uma pressão reduzida tinham uma resistência vascular estável(Segal e Guttman, 1983).

Quando comparamos os fluxos urinários observamos fluxos mais altos com diferença estatística até o minuto 80 nos grupos glutamina 1 mM, glutamina 1 mM + GSH 2 mM e glutamina 1 mM + GSH 4 mM($p = 0,035$). Com relação ao ritmo de filtração glomerular, o grupo com maior valor e estatisticamente diferente, é o que contém glutamina 1 mM e o grupo glutamina 1 mM + GSH 2 mM, durante toda a perfusão principalmente quando comparado com os grupos glutamina 3 mM, glutamina 1 mM + alanina 2 mM e com o grupo controle($p = 0,035$). Ao avaliarmos o transporte absoluto de sódio é mais importante observar que o melhor grupo é o que contém glutamina 1 mM + GSH 2 mM, glutamina 1 mM + glutathione 4 mM e o grupo alanilglutamina 5 mM, durante todos os noventa minutos principalmente quando comparado com os grupos glutamina 3 mM, em subnormotermia, glutamina 1mM + alanina 2 mM e alanilglutamina 2 mM($p = 0,032$). Os melhores grupos com transporte percentual de sódio estatisticamente diferentes são os grupos que contém alanilglutamina 5 mM e o grupo que contém glutamina 1 mM + GSH 2 mM principalmente quando comparado com os grupos subnormotermia e glutamina 3 mM($p = 0,044$). Ele é significativo praticamente em todo o período da perfusão(10, 30, 50, 60, 70 e 80 minutos).

A filtração renal e a reabsorção tubular são movidas pelo transporte ativo que requer um alto nível de oxigenação. A autoregulação é uma propriedade intrínseca, que é preservada, mesmo depois da desnervação no órgão isolado(Patel e cols., 2014). O aumento da concentração citosólica de sódio durante a hipóxia,

desempenha um papel crucial na patogênese da lesão hipóxica, e pode ser inibida pelo aminoácido glicina. Carini e colaboradores propuseram que este efeito resultava da inibição dos canais de cloreto dependente de ligações sensíveis a glicina, por causa do influxo de sódio e de cloreto estarem acoplados. Frank e colaboradores demonstraram que o influxo de sódio é cloreto independente, e que existe um componente não dependente de sódio, na lesão hipóxica. A alanina, estruturalmente relacionada com a glicina, parece exercer os seus efeitos protetores por interferir com o acúmulo de sódio induzido pela hipóxia (Bahde e cols., 2008). O glutathione atua como antioxidante, enquanto a glutamina, tanto é metabolizada a glutathione, prevenindo assim a oxidação, como servindo de substrato para a gliconeogênese, sinalização nervosa, síntese de proteínas, nucleotídeos, ácido nucléico e formação de óxido nítrico (Strzelecki e Schoolwerth, 1981). Weinberg e cols., em 1987 mostraram que o glutathione e a glicina fornecem substancial proteção contra a injúria hipóxica em túbulos isolados, e que o maior fator protetor parecia ser a glicina.

O transporte absoluto e percentual de potássio não mostrou alteração entre os grupos perfundidos. Os esforços para entender os benefícios das altas concentrações de potássio baseiam-se na hipótese de que como a função das bombas iônicas está prejudicada, durante a conservação. Já o conteúdo iônico intracelular, pode ser mantido usando uma solução de preservação com conteúdo iônico similar. Este conceito é compensado por várias observações: (i) teor elevado de potássio, induz a despolarização celular e acelera a diminuição do teor de ATP celular; (ii) canais dependentes da voltagem, tal como os canais de cálcio, são ativados; e (iii) o influxo consecutivo de cálcio depende da concentração de potássio da solução. Mais importante ainda, a concentração de potássio acima de 15 mmol/L é um potente estímulo de vasoconstrição que prejudica a perfusão dos órgãos durante a perfusão e a reperfusão (Hauet e Eugene, 2008).

A inclusão de níveis elevados de potássio no meio de preservação é importante na prevenção da perda de potássio durante a armazenagem a frio. Pensa-se também que uma alta concentração de potássio ajudaria a evitar o acúmulo de cálcio intracelular durante a isquemia. As propriedades essenciais da solução de conservação incluem a minimização do edema celular e do edema do espaço extracelular, induzida pela hipotermia, a restrição do desequilíbrio iônico, a prevenção da acidose intracelular e da lesão de radicais livres causada, após a

reperfusão bem como fornecimento de substratos necessários para a regeneração de fosfatos de alta energia durante a reperfusão(Ahmad e cols., 2004). Keeler e colaboradores em 1966 demonstraram que a lesão causada pela perfusão prolongada poderia ser prevenida usando soluções contendo altas concentrações de potássio e magnésio(Fonteles e cols., 1973).

O melhor transporte absoluto de cloreto foi observado no grupo glutamina 1 mM + GSH 2 mM nos minutos 10,50,60,70 e 80($p = 0,044$) e o melhor resultado do transporte percentual de cloreto foi também com o grupo glutamina 1 mM + GSH 2 mM nos minutos 10 e 60($p = 0,046$). Quanto aos melhores clearances de água livre foram observados nos grupos glutamina 1 mM e glutamina 1 mM + GSH 4 mM. Os melhores clearances osmolares foram do grupo glutamina 1 mM, glutamina 1 mM + GSH 4 mM e do grupo glutamina 1 mM + GSH 2 mM observados nos minutos 10, 20, 30, 40, 50, 70 e 80($p = 0,027$).

O rim apresenta um importante papel no metabolismo dos pequenos peptídios circulantes. A concentração destes peptídios no filtrado tubular pode ser muita vezes maior do que no sangue por causa de que as células tubulares da membrana em borda em escova contem alta atividade de endopeptidases e de dipeptidil peptidase, que agem nas proteínas do filtrado para produzir pequenos peptídios(Fonteles e cols., 1983). Tem sido demonstrado que os dipeptídios que contêm glutamina podem atuar como um substituto para a glutamina(Calde, 1994).

Como o fluxo de sangue oxigenado no momento da retirada do órgão é encerrado, o fornecimento de oxigênio, os cofatores e os nutrientes param ou diminuem concomitantemente sua atividade. No entanto, a atividade metabólica da célula não é interrompida à baixa temperatura. O metabolismo anaeróbico continua, com depleção resultante das reservas de energia e o acúmulo de produtos metabólicos, incluindo compostos de degradação do trifosfato de adenosina (ATP). A depleção do ATP provoca perda de gradiente transcelular de eletrólitos, influxo de cálcio livre e subsequente ativação das fosfolipases; este é um dos principais contribuintes para o edema e a lise celular(Ahmad e cols., 2004). Além disso, o acúmulo de produtos metabólicos durante a isquemia constitui a base para a produção de moléculas tóxicas após a reperfusão, as quais promovem vias de lesão devido à injúria da isquemia e de reperfusão. Durante a isquemia, os mecanismos de transporte ativos de adenosina trifosfatase(ATPase) envolvendo o sódio, o potássio, o cálcio, o magnésio são inibidos, o que conduz a um fluxo constante de

sódio, cloreto e cálcio para dentro da célula, com o subsequente influxo osmótico de água aumentando o edema celular. A perfusão contínua proporciona um fornecimento de substratos metabólicos e remove subprodutos, recriando a circulação normal(Ahmad e cols., 2004; Haisch e cols., 1997).

A perfusão normotérmica, sem oxigenação adequada, cria resultados inferiores com relação ao armazenamento a frio simples. Embora haja uma falta de dados comparativos, há evidências de que a hipotermia induz lesão através de várias vias; é, portanto, lógico postular que a normotermia, ou perto de uma perfusão normotérmica fornecendo oxigênio e outros substratos fisiológicos será o método ideal para manter os órgãos em um estado viável por períodos mais prolongados. A alternativa à preservação hipotérmica é a utilização da preservação numa temperatura normal do corpo(Yong e cols., 2016; ST Peter e cols., 2002).

O termo perfusão normotérmica refere à perfusão de um órgão a temperatura normal fisiológica, cerca de 37°C. O metabolismo continuado nas temperaturas hipotérmicas leva ao acúmulo de metabólitos, que formam os substratos para a subsequente injúria de isquemia e de reperfusão. As perfusões por máquina hipotérmica melhoram a situação, provavelmente pela remoção dos produtos metabólicos, e isto pode ser a base destes benefícios em mais órgãos marginais. A normotermia com fluxo contínuo ou pulsátil oferece a oportunidade para restaurar o metabolismo aeróbico normal a uma temperatura fisiológica. Durante a perfusão normotérmica por máquina, o órgão é perfundido e preservado a uma temperatura corporal de 37°C. Em teoria, a perfusão normotérmica por máquina permite que o órgão mantenha o metabolismo em níveis fisiológicos, minimizando assim o acúmulo de substratos tóxicos e de formação de radicais livres(Kaths e cols., 2016).

A composição do perfusato é vital para assegurar a entrega adequada de nutrientes e de oxigênio para manter a integridade celular e os processos vasculares. Os primeiros estudos verificaram que a hemólise, a ativação de plaquetas e os produtos de degradação durante a perfusão causou um aumento da resistência e de edema nos tecidos durante períodos prolongados de preservação. Com a restauração do metabolismo, as técnicas de preservação normotérmica oferecem o potencial para avaliar a viabilidade antes do transplante. Isto pode ser particularmente vantajoso para a preservação dos órgãos doados por critérios expandidos ou de rins de doadores após morte cardíaca, sendo capaz de prevenir o transplante de rins não funcionantes(Hosgood e Nicholson, 2011).

As soluções de preservação são concebidas para neutralizar os efeitos da hipotermia e prolongar o tempo em que o órgão pode ser mantido sem oxigênio. Elas contêm componentes diferentes com base em três princípios essenciais: uma composição adequada de eletrólitos (alto ou baixo nível de sódio/potássio), um impermeabilizante para evitar o edema celular e um tampão para prevenir a acidose(O'Callaghan e cols., 2012).

Faltam dados clínicos para demonstrar efetivamente a solução ideal para usar na preservação renal e assim promover uma melhor sobrevivência do enxerto. Atualmente, na prática clínica são usadas três tipos de composição da solução para a preservação a frio: intracelulares, intermediários e extracelulares. Cada uma destas soluções contém um impermeabilizante (lactobionato ou a rafinose) e/ou colóides (hidroxietilamido ou o polietilenoglicol), para limitar o edema. Soluções livres de impermeabilizantes ou livres de colóides originam resultados medíocres para os transplantes de rim, fígado, intestino e pâncreas. Southard em 1989 observou a importância de prevenir a perda celular de glutathione, vários outros cofatores, precursores purínicos da biossíntese de DNA e prevenir a ativação dos sistemas enzimáticos que podem danificar os órgãos quando forem reperfundidos.

Não podemos esquecer as observações sobre os efeitos da velocidade de resfriamento, nas respostas do receptor alfa-adrenérgico, como preconizado por Fonteles e Karow em 1977, em que o resfriamento rápido provocou um bloqueio visível deste receptor, durante o resfriamento em alta velocidade(6°C/min), como aconteceu também a disfuncionalidade imposta por esta condição física, no rim de coelho.

A solução usada em nosso trabalho foi uma solução de composição intracelular rica em potássio e magnésio que foi acrescida de vários substratos em diferentes concentrações. Observamos uma perspectiva futura promissora com resultados importantes em parâmetros fisiológicos e metabólicos quando adicionamos à solução A dois substratos(a glutamina na concentração de 1 mM e o glutathione na concentração de 2 mM).

7. CONCLUSÕES

Utilizando-se um modelo de perfusão de rim isolado de coelhos, analisou-se várias soluções de preservação tendo como base a solução A (uma solução rica em potássio e em magnésio) acrescidas de vários substratos como o glutatión, a glutamina, a alanina e a alanilglutamina em diferentes concentrações.

Chegamos as seguintes conclusões:

- 1) A glutamina e o glutatión parecem ser importantes substratos na manutenção da atividade celular e nas necessidades metabólicas do rim;
- 2) A adição de 1 mM de glutamina associada a 2 mM de glutatión apresenta o melhores resultados do grupo com a dose ideal;
- 3) A adição de 1 mM de glutamina e de 2 mM de glutatión causa efeitos significativos na manutenção do fluxo urinário, no ritmo de filtração glomerular, no transporte de sódio e no clearance osmolar;
- 4) O dipeptídeo alanilglutamina na dose de 5 mM apresenta efeitos benéficos importantes principalmente com o transporte absoluto e percentual de sódio;
- 5) A adição de glutamina à solução A protege o consumo renal de glutatión conforme demonstrado em nossos resultados.

8. BIBLIOGRAFIA

ABDENNEBI, H.B.; STEGHENS, J.; MARGONARI, J.; RAMELLA-VIRIEUX, S.; BARBIEUX, A.; BOILLOT, O. High- Na^+ low- K^+ UW cold storage solution reduces reperfusion injuries of the rat liver graft. *Transplant International*. 1998, 11: 223-230.

AGARWAL, A.; GOGGINS, W.C.; PESCOVITZ, M.D.; MILGRON, M.L.; MURDOCK, P.; FRIDELL, J.A. Comparison of Histidine-Tryptophan Ketoglutarate and University of Wisconsin Solutions as Primary Preservation in Renal Allografts Undergoing Pulsatile Perfusion. *Transplantation Proceedings*. 2005, 37: 2016-2019.

AGARWAL, A.; MURDOCK, P.; FRIDELL, J. Comparison of Histidine-Tryptophan Ketoglutarate solution and university of Wisconsin solution in prolonged cold preservation of kidney allografts. *Transplantation*. 2006, 81(3): 480-482.

AHLENSTIEL, T; BURKHARDT, G; KOHLER, H; KUHLMANN, M.K. Improved cold preservation of kidney tubular cells by means of adding bioflavonoids to organ preservation solutions. *Transplantation*. 2006, 81(2):231-239.

ALSHAIBANI, K.; NIZAMUDDIN, N.; RAZA, S.; ALFURAYH, O.; ALMESHARI, K.; QUNIBI, W.; SANJAD, E. University of Wisconsin versus Eurocollins solution for kidney preservation: analysis of clinical outcome. *Transplantation Proceedings*. 1998, 30: 3681-3682.

ARAÚJO FILHO, R.M. Efeitos comparativos do glutation em dois modelos de solução preservadora no rim perfundido de coelho. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Ceará. 1995.

ARMAD, N.; POTTS, D.J.; LODGE, J.P.A. Effective protection against prolonged warm ischemia of rat kidney using a simple preservation solution. *Transplantation Proceedings*. 1999, 31: 1031-1032.

AHMAD, N; HOSTERT, L; PRATT, J.R.; BILLAR, K.J.; POTTS, D.J.; LODGE, J.P.A. A pathophysiologic study of the kidney tubule to optimize organ preservation solutions. *Kidney International*. 2004, 66: 77-90.

BADET, L.; ABDENNEBI, H.B.; PETRUZZO, P.; MCGREGOR, B., ESPA, M.; HADJ-AISSA, A.; RAMELLA-VIRIEUX, S., STEGHENS, J.P.; PORTOGHESE, F.; MARTIN, X. Effect of IGL-1, a new preservation solution, on kidney grafts(a pre-clinical study). *Transplant International*. 2005, 17: 815-821.

BADET, L.; PETRUZZO, P.; LEFRANÇOIS, N.; MCGREGOR, B.; ESPA, M.; BERTHILLOT, C.; DANJOU, F.; CONTU, P.; AISSA, A.H.; VIRIEUX, S.R.; COLPART, J.J.; MARTIN, X. Kidney Preservation With IGL-1 Solution: A Preliminary Report. *Transplantation Proceedings*. 2005, 37: 308-311.

BAHDE, R.; PALMES, D.; GEMSA, O.; MININ, E.; STRATMANN, U.; DE GROOT, H.; RAUEN, U.; SPIEGEL, H. Attenuated cold storage injury of rat livers using a modified HTK solution. *Journal of Surgical Research*. 2008, 146: 49-56.

BAICU, S.C.; TAYLOR, M.J.; BROCKBANK, K.G.M. The role of preservation solution on acid-base regulation during machine perfusion of kidneys. *Clinical Transplantation*. 2005: 113-121.

BAKER, R.J; WATSON, C.J.E. Renal Transplantation. *Medicine*. 2015, 43(9): 497-506.

BARR, M.L.; NISHANIAN, G.P.; SAKAMAKI, Y.; CAREY, J.N.; CHANG, J.; STARNES, V.A. A new organ preservation solution, Celsior, is superior to Euro-Collins and University of Wisconsin Solutions in decreasing lung reperfusion injury. *Transplantation Proceedings*. 1997, 29: 1357-1358.

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

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

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

BESSEMS, M.; DOORSCHODT, B.M.; MARLE, J.V.; VREELING, H.; MEIJER, A.J.; VAN GULIK, T.M. Improved machine perfusion preservation of the non-heart-beating donor rat liver using Polysol: a new machine perfusion preservation solution. *Liver Transplantation*. 2005, 11(11): 1379-1388

BIGUZAS, M.; JABLONSKI, P.; THOMAS, A.C.; WALLS, K.; HOWDEN, B.O.; SCOTT, D.F.; MARSHALL, V.C. Evaluation of UW solution in a rat kidney preservation model. I. Effect of hydroxyethyl starch and electrolyte composition. *Transplantation*. 1990, 49(5): 872-875.

BOGUSKY, R.T.; AOKI, T.T. Early events in the initiation of ammonia formation in kidney. *The Journal of Biological Chemistry*. 1983, 258(5): 2795-2801.

BON, D.; CHATAURET, N.; GIRAUD, S.; THUILLIER, R.; FAVREAU, F.; HAUET, T. New strategies to optimize kidney recovery and preservation in transplantation. *Nature Reviews*. 2012, 8: 339-347.

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

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

BROOK, N.R.; KNIGHT, A.J.; NICHOLSON, M.L. Intra-renal resistance reflects warm ischaemic damage, and is further increased by static cold storage: a model of non-heart-beating donor kidneys. *Med. Sci. Monit.* 2003, 9(7): 271-275.

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

BUNEGIN, L.; TOLSTYKH, G.P.; GELINEAU, J. F.; COSIMI, A. B.; ANDERSON, L. M. Oxygen consumption during oxygenated hypothermic perfusion as a measure of donor organ viability. ASAIO J. 2013, 59(4): 427-32.

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

CALDER, P.C. Glutamine and the immune system. Clinical Nutrition. 1994, 13: 2-8.

CALNE, R.Y.; PEGG, D.E.; PRYSE-DAVIES, J.; BROWN, F.L. Renal preservation by ice-cooling: an experimental study relating to kidney transplantation from cadavers. Br. Med. J. 1963, 2:651-655.

CAMPOS, H.H. Efeitos renais da ciclosporina isolada ou associada a um antagonista do PAF(BN52021): avaliação de parâmetros funcionais do rim de coelho isolado e artificialmente perfundido. Tese de Doutorado. Escola Paulista de Medicina. São Paulo, 1989.

CANNON, R.M; BROCK, G.N; GARRISON, R.N; MARVIN, M.R; FRANKLIN, G.A; DAVIS, E.G. Machine perfusion: not just for marginal kidney donors. Am. Surg. 2015, 81(6): 550-556.

CATENA, F.; GAZZOTTI, F.; AMADUZZI, A.; FUGA, G.; MONTORI, G.; CUCCHETTI, A.; COCCOLINI, F.; VALLICELLI, C.; PINNA, A.D. Pulsatile Perfusion of Kidney Allografts With Celsior Solution. Transplantation Proceedings. 2010, 42: 3971-3972.

CATENA, F.; COCCOLINI, F.; MONTORI, G.; VALLICELLI, C.; AMADUZZI, A.; ERCOLANI, G.; RAVAIOLI, M.; DEL GAUDIO, M.; SCHIAVINA, R.; BRUNOCILIA,

E.; LIVIANO, G.; FELICIANGLI, G.; PINHA, A.D. Kidney Preservation: Review of Present and Future Perspective. Transplantation Proceedings. 2013, 45: 3170-3177.

CHANDAK, P.; CALLAGHAN, C. The immunology of organ transplantation. Surgery. 2014, 32(7): 325-332.

CHANG, H.; CHOONG, B.; PHILLIPS, A.; LOOMES, K.M. The isolated perfused rat kidney: a technical update. Exp. Anim. 2013, 62(1): 19-23.

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

CHATAURET, N.; THUILLIER, R.; BARROU, B.; HAUET, T.; EUGENE, M. Machine perfusion in clinical trials: the preservation solution bias. Transplant International. 2011, 24: e81-e82.

CIERPKA, L.; RYSZKA, F.; DOLINSKA, B.; SMORAG, Z.; SLOMSKI, R.; WIADERKIEWICZ, R.; CABAN, A.; BUDZINSKI, G.; OCSKOWICZ, G.; WIECZOREK, J. Biolasol: Novel Perfusion and Preservation Solution for Kidneys. Transplantation Proceedings. 2014, 46: 2539-2541.

COLLINS, G.M.; HALASZ, N.A. Current aspects of renal preservation. Urology. 1977, 10(Suppl 1): 22-32.

COLLINS, G.M. What solutions are best? Overview of flush solutions. Transplantation Proceedings. 1997, 29: 3543-3544.

COLLINS, G.M.; BRAVO-SHUGARMAN, M.; TERASAKI, P.I. Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours' ice storage. The Lancet. 1969, 2: 1219-1222.

COOPER, J.E.; WISEMAN, A.C. Acute kidney injury in kidney transplantation. Transplantation Proceedings. 2013, 22(6): 698-703.

CRUZAT V.F.; PETRY, E.D; TIRAPEGUY, J. Glutamina, aspectos bioquímicos, metabólicos, moleculares e suplementação. Ver. Bras. Med. Esporte. 2009, 15(5):392-397.

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

DARMAUN, D. Biodisponibilité de la glutamine et réponse du métabolisme protéique à l'apport de glutamine chez l'homme. Nutr. Clin. Métabol. 1994, 8: 231-240.

DE BOER, J.; SMITS, J.M.A.; DE MEESTER, J.; VAN DER VELDE, O.; BOK, A.; PERSIJN, G.G.; RINGE, B. A randomized multicenter study on kidney preservation comparing HTK with UW. Transplantation Proceedings. 1999, 31: 2065-2066.

DE DEKEN, J.; KOCABAYOGLU, P.; MOERS, C. Hypothermic machine perfusion in kidney transplantation. Current Opinion in Organ Transplantation. 2016, 21: 294-300.

DENTON, M.D.; MAGEE, C.C.; SAYEGH, M.H. Immunosuppressive strategies in transplantation. The Lancet. 1999, 353: 1083-1091.

DE ROUGEMONT, O.; DUTKOWSKI, P.; CLAVIEN, P. Biological modulation of liver ischemia – reperfusion injury. Current Opinion in Organ Transplantation. 2010, 15: 183-189.

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

DIKDAN, G.S.; MORA-ESTEVEZ, C.; KONERU, B. Review of randomized clinical trials of donor management and organ preservation in deceased donors: opportunities and issues. Transplantation. 2012, 94(5): 425-441.

DITONNO, P.; IMPEDOVO, S.V.; PALAZZO, S.; BETOCHI, C.; GESUALDO, L.; GRANDALIANO, G.; SELVAGI, F.P.; BATAGLIA, M. Effects of ischemia-reperfusion

injury in kidney transplantation: risk factors and early and long-term outcomes in a single center. *Transplantation Proceedings*. 2013, 45(7): 2641-2644.

DOORSCHODT, B.M.; SCHREINEMACHERS, M. C.; FLORQUIN, S.; LAI, W.; SITZIA, M.; ZERNECKE, A.; TOLBA, R.H. Evaluation of a novel system for hypothermic oxygenated pulsatile perfusion preservation. *Int. J. Artif. Organs*. 2009, 32(10): 728-38.

DRYER, S.E. Glutamate receptors in the kidney. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2015, 30(10): 1630-1638.

ENDRE, Z.H.; COWIN, G.J.; STEWART-RICHARDSON, P.; CROSS, M.; WILLGOSS, D.A.; DUGGLEBY, R.G. ²³Na NMR Detects Protection by Glycine and Alanine against Hypoxic injury in the isolated perfused rat kidney. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1994, 202(3): 1639-1644.

FAENZA, A.; CATENA, F.; NARDO, B.; MONTALTI, R.; CAPOCASALE, E.; BUSI, N.; BOGGI, U.; VISTOLI, F.; DI NARO, A.; ALBERTAZZI, A.; MOSCA, F.; CAVALLARI, A. Kidney preservation with university of wisconsin and celsior solution: a prospective multicenter randomized study. *Transplantation*. 2001, 72: 1274-1277.

FERRO, L.A.R. Basic Principles for Preservation of Organs for Transplant. *Revista Inspirer*. 2009, 1(1).

FONTELES, M.C.; JESKE, A.; KAROW, A.M.Jr. Vascular response to autonomic drugs in isolated perfused rabbit kidney at 37°C, 25°C and 15°C. *Proc. V Int. Cong. Pharmacol. Abst. Volunteer Papers*. 1972, 70.

FONTELES, M.C.; GANAPATHY, V.; PASHLEY, D.H.; LEIBACH, F.H. Dipeptide metabolism in the isolated perfused rat kidney. *Life Sciences*, 1983, 33: 431-436.

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

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

FONTELES, M.C.; KAROW JR., A.M. Vascular alpha adrenotropic responses of the isolated rabbit kidney. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*. 1977, 227(2): 195-205.

FONTELES, M.C.; MACHADO, A.L.; CAMPOS, A.B.; MARQUES, R.B. Um estudo do dextran e do haemaccel na preservação renal através de perfusão simples e reimplante. *Revista de Medicina da Universidade Federal do Ceará*. 1977/1978, 17/18: 65-70.

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.; Lima, A.A.M. Functional comparison of kidney perfused with fatty acid-free and rich albumin. *Bras. Med. Bios. Res*. 1982, 15(4-5): 296.

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

FONTELES, M.C., COHEN, J.J., BLACK, A.J.; WERTHEIM, S.J. Support of renal kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. *American Journal of Physiology*. 1983, 244: 235-246.

FORDE, J.C.; SHIELDS, W.P.; AZHAR, M.; DALY, P.J.; ZIMMERMANN, J.A.; SMYTH, G.P.; ENG, M.P.; POWER, R.E.; MOHAN, P.; HICKEY, D.P.; LITTLE, D.M. Single centre experience of hypothermic machine perfusion of kidneys from extended criteria deceased heart-beating donors: a comparative study. *Ir. J. Med. Sci*. 2016, 185: 121-125.

FRANCO-GOU, R.; MOSBAH, I.B.; SERAFIN, A.; ABDENNEBI, H.B. New preservation strategies for preventing liver grafts against cold ischemia reperfusion injury. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2007, 22:1120-1126.

FULLER, T.F.; ROSE, F.R.; SINGLETON, K.D.; LINDE, Y.; HOFF, U.; FREISE, C.E.; DRAGUN, D.; NIEMANN, C. Glutamine donor pretreatment in rat kidney transplants with severe preservation reperfusion injury. *Journal of Surgical Research*. 2007, 140: 77-83.

FULLER, B.J.; LEE, C.Y. Hypothermic perfusion preservation: The future of organ preservation revisited? *Cryobiology*. 2007, 54: 129-145.

GALLINAT, A.; LUER, B.; SWOBODA, S.; RAUEN, U.; PAUL, A.; MINOR, T. Use of the new preservation solution Custodiol-N supplemented with dextran for hypothermic machine perfusion of the kidney. *Cryobiology*. 2013, 66: 131-135.

GALLINAT, A.; FOX, M.; LUER, B.; EFFERZ, P.; PAUL, A. MINOR, T. Role of pulsatility in hypothermic reconditioning of porcine kidney grafts by machine perfusion after cold storage. *Transplantation*. 2013, 96(6): 538-542.

GERALDO JÚNIOR, G.R.; AMARAL, J.L.G.; CASTIGLIA, Y.M.M.; MARQUES, M.E.A. Eficácia da Solução de Cloreto de Sódio a 7,5% com e sem Dextran 70 a 6% na Preservação da Função Renal de Cães Hipovolêmicos Submetidos à Isquemia-Reperfusão. *Rev. Bras. Anesthesiol*. 2002, 52(1): 41-54.

GERBER, D.A.; BONHAM, C.A.; THOMSON, A.W. Immunosuppressive agents: recent developments in molecular action and clinical application. *Transplantation Proceedings*. 1998, 30: 1573-1579.

GNAIGER, E.; KUZNETSOV, A.V.; KONIGSRAINER, A.; MARGREITER, R. Autooxidation of Glutathione in Organ Preservation Solutions. *Transplantation Proceedings*. 2000, 32:14.

GOLDSTEIN, L. α -Ketoglutarate regulation of glutamine transport and deamidation by renal mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1976, 70(4): 1136-1141.

GOLRIZ, M.; FONOUNI, H.; KUTTYMURATOV, G.; ESMAEILZADEH, M.; RAD, M.T.; JARAHIAN, P.; LONGERICH, T.; FARIDAR, A.; ABBASI, S.; MEHRABI, A.; GEBHARD, M.M. Influence of a modified preservation solution in kidney preservation: a comparative experimental study in a porcine model. *Asian Journal of Surgery*. 2015, 1-10.

GOMEZ, V.; GALEANO, C.; DIEZ, V.; BUENO, C.; DIAZ, F.; BURGOS, F.J. Economic Impact of the Introduction of Machine Perfusion Preservation in a kidney transplantation program in the Expanded Donor Era: Cost-Effectiveness Assessment. *Transplantation Proceedings*. 2012, 44: 2521-2524.

GRAMS, M.E.; SANG, Y.; LEVEY, A.S.; MATSUSHITA, K.; BALLEW, S.; CHANG, A.R.; CHOW, E.K.H.; KASISKE, B.L.; KOVESDY, C.P.; NADKARNI, G.N.; SHALEV, V.; SEGEV, D.L.; CORESH, J.; LENTINE, K.L.; GARG, A.X. Kidney-failure risk projection for the living kidney-donor candidate. *The New England Journal of Medicine*. 2016, 374(5): 411-421.

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*. 1979, 76(12): 6319-6322.

GRIFFITH, O.W. Biologic and pharmacology regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999, 27(9/10): 922-935.

GUARRERA, J.V.; HENRY, S.D.; CHEN, S.W.C.; BROWN, T.; NACHBER, E.; ARRINGTON, B.; BOYKIN, J.; SAMSTEIN, B.; BROWN, R.S.; EMOND, J.C.; LEE, H.T. Hypothermic machine preservation attenuates ischemia/reperfusion markers after liver transplantation: preliminary results. *Journal of Surgical Research*. 2011, 167: e365-e373.

HABERLE, D.; WAHLLANDER, A.; SIES, H. Assessment of the kidney function in maintenance of plasma glutathione concentration and redox state in anaesthetized rats. *Febs Letters*. 1979, 108(2): 335-340.

HAISCH, C.; BRASILE, L.; GREEN, E.M. Diuresis in an ex vivo renal perfusion model. *Transplantation Proceedings*. 1997, 29: 1316-1317.

HARPER, S.J.F.; HOSGOOD, S.A.; WALLER, H.L.; YANG, B.; KAY, M.D.; GONÇALVES, I.; NICHOLSON, M.L. The effect of warm ischemic time on renal function and injury in the isolated haemoperfused kidney. *Transplantation*. 2008, 86(3): 445-451.

HART, N.A.; LEUVENINK, H.G.D.; PLOEG, R.J. New solutions in organ preservation. *Transplantation Reviews*. 2002, 16(3): 131-141.

HAUET, T.; EUGENE, M. A new approach in organ preservation: potential role of new polymers. *Kidney International*. 2008, 74: 998-1003.

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

HERNANDEZ, C.F.; LLEDO, E.G.; TEJEDOR, A.J.; ESCRIBANO, G.P. New perspectives in the preservation of kidney grafts. *Arch. Esp. Urol*. 1996, 49(10): 1121-1125.

HERRERO, F.; MORALES, D.; BAAMONDE, C.; SALAS, E.; BERRAZUETA, J.R.; CASANOVA, D. Ischemic preconditioning and kidney transplantation: in vivo nitric oxide monitoring in a rat ischemia-reperfusion experimental model. *Transplantation Proceedings*. 2006, 38: 2600-2602.

HEYLEN, L.; NAESENS, M.; JOCHMANS, I.; MONBALIU, D.; LERUT, E.; CLAES, K.; HEYE, S.; VERHAMME, P.; COOSEMANS, W.; BAMMENS, B.; EVENEPOEL, P.; MEIJERS, B.; KUYPERS, D.; SPRANGERS, B.; PIRENNE, J. The effect of

anastomosis time on outcome in recipients of kidneys donated after brain death: a cohort study. *American Journal of Transplantation*. 2015, 15: 2900-2907.

HONG, R.W.; ROUNDS, J.D.; HELTON, W.S.; ROBINSON, M.K.; WILMORE, D.W. Glutamine preserves liver glutathione after lethal hepatic injury. *Ann. Surg.* 1992, 215(2): 114-119.

HOSGOOD, S.A.; YANG, B.; BAGUL, A.; MORAMED, I.H.; NICHOLSON, M.L. A comparison of hypothermic machine perfusion versus static cold storage in an experimental model of renal ischemia reperfusion injury. *Transplantation*. 2010, 89(7): 830-837.

HOSGOOD, S.A.; NICHOLSON, M.L. The role of perfluorocarbon in organ preservation. *Transplantation*. 2010, 89(10): 1169-1175.

HOSGOOD, S.A.; NICHOLSON, M.L. First in man renal transplantation after ex vivo normothermic perfusion. *Transplantation*. 2011, 92(7): 735-738.

HOSGOOD, S.A.; NICHOLSON, M.L. Normothermic kidney preservation. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2011, 16: 169-173.

HOSGOOD, S.A.; BARLOW, A.D.; YATES, P.J.; SNOEIJIS, M.G.J.; VAN HEURN, E.L.W.; NICHOLSON, M.L. A Pilot study assessing the feasibility of a short period of normothermic preservation in an experimental model of non heart beating donor kidneys. *Journal of Surgical Research*. 2011, 171: 283-290.

HOSGOOD, S.A.; BAGUL, A.; NICHOLSON, M.L. Minimising cold ischaemic injury in an experimental model of kidney transplantation. *European Journal of Clinical Investigation*. 2011, 41(3): 233-240.

HOSGOOD, S.A.; HUNTER, J.P.; NICHOLSON, M.L. Early urinary biomarkers of warm and cold ischemic injury in an experimental kidney model. *Journal of Surgical Research*. 2012, 174: e85-e90.

HOSGOOD, S.A.; PATEL, M.; NICHOLSON, M.L. The conditioning effect of ex vivo normothermic perfusion in an experimental kidney model. *Journal of Surgical Research*. 2013, 182: 153-160.

HOSGOOD, S.A.; NICHOLSON, M.L. Ex vivo normothermic perfusion of declined human kidneys after inadequate in situ perfusion. *American Journal of Transplantation*. 2014, 14:490-491.

HOSGOOD, S.A.; NICHOLSON, M.L. Organ retrieval and preservation. *Surgery*. 2014, 32(7):338-343.

HOSGOOD, S.A.; VAN HEURN, E.; NICHOLSON, M.L. Normothermic machine perfusion of the kidney: better conditioning and repair? *Transplant International*. 2015, 28: 657-664.

HOSGOOD, S.A.; SHAH, K.; NICHOLSON, M.L. The effect of prolonged of warm ischaemic injury on renal function in an experimental ex vivo normothermic perfusion system. *Journal of Translational Medicine*. 2015, 13: 207-212.

HOYER, D.P.; GALLINAT, A.; SWOBODA, S.; WOHLSCHLÄGER, J.; RAUEN, U.; PAUL, A.; MINOR, T. Subnormothermic machine perfusion for preservation of porcine kidneys in a donation after circulatory death model. *Transplant International*. 2014, 27(10): 1097-1106.

IANHEZ, L.E. Transplante renal no Brasil: história, evolução e problemas atuais. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. 1994, 16(1): 5-16.

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

JAMART, J.; LAMBOTTE, L. Efficiency and limitation of Euro-Collins solution in kidney preservation. *Journal of Surgical Research*. 1983, 34: 195-204.

JAMIESON, N.V. Kidney preservation times, donor types and long-term outcomes. *Transplantation*. 2007, 83(3): 255-256.

JESKE, A.H.; FONTELES, M.C.; KAROW, J.R. Functional preservation of the mammalian kidney. *Journal of Surgical Research*. 1973, 15: 4-13.

JOCHMANS, I.; MOERS, C.; SMITS, M.; LEUVENINKH.G.D.; TRECKMANN, J.; PAUL, A.; RAHMEL, A.; SQUIFFLET, J-P.; VAN HEURN, E.; MONBALIU, D.; PLOEG, R.J.; PIRENNE, J. The prognostic value of renal resistance during hypothermic machine perfusion of deceased donor kidneys. *American Journal of Transplantation*. 2011, 11: 2214-2220.

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

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

KATHS, J.M.; SPETZLER, V.N.; GOLDARACENA, N.; ECHEVERRI, J.; LOUIS, K.S.; FOLTYS, D.B.; STREMPER, M.; YIP, P.; JOHN, R.; MUCSI, I.; GHANEKAR, A.; BAGLI, D.; ROBINSON, L.; SELZNER, M. Normothermic ex vivo kidney perfusion for the preservation of kidney grafts prior to transplantation. *Journal of Visualized Experiments*. 2015, 101: 1-13.

KATHS, J.M.; ECHEVERRI, J.; GOLDARACENA, N.; LOUIS, K.S.; CHUN, Y-M.; LINARES, I.; WIEBE, A.; FOLTYS, D.B.; YIP, P.M.; JOHN, R.; MUCSI, I.; GHANEKAR, A.; BAGLI, D.J.; GRANT, D.R.; ROBINSON, L.A.; SELZNER, M. Eight-hour continuous normothermic ex vivo kidney perfusion is a safe preservation technique for kidney transplantation: a new opportunity for the storage, assessment, and repair of kidney grafts. *Transplantation*. 2016, 100(9): 1862-1870.

KAY, M.D.; HOSGOOD, S.A.; HARPER, S.J.F.; BAGUL, A.; WALTER, H.L.; REES, D.; NICHOLSON, M.L. Static normothermic preservation of renal allografts using a

novel nonphosphate buffered preservation solution. *Transplant International*. 2007, 20: 88-92.

KAY, M.D.; HOSGOOD, S.A.; NICHOLSON, M.L. Comparison of preservation solutions in an experimental model of organ cooling in kidney transplantation. *British Journal of Surgery*. 2009, 96: 1215-1221.

KAY, M.D.; HOSGOOD, S.A.; HARPER, S.J.F.; BAGUL, A.; WALLER, H.L.; NICHOLSON, M.L. Normothermic versus hypothermic ex vivo flush using a novel phosphate-free preservation solution(AQIX) in porcine kidneys. *Journal of Surgical Research*. 2011, 171: 275-282.

KIBONDO, A.; TALBOT, D.; CULLIS-HILL, D.; MAAG, K.; CUNNINGHAM, A.C.; CARTER, N.M. Perfusates: their properties and usage for the maintenance and storage of organs for transplantation. *Current Anaesthesia & Critical Care*. 2010, 21: 216-219.

KIRCHNER, C.; LUER, B.; EFFERZ, P.; WOHLSCHAEGER, J.; PAUL, A.; MINOR, T. Ex vivo use of a Rho-kinase inhibitor during renal preservation improves graft function upon reperfusion. *Cryobiology*. 2015, 70: 71-75.

KLAR, E.; ANGELESCU, M.; ZAPLETAL, C.; KRAUS, T.; BREDT, M.; HERFARTH, C. Definition of maximum cold ischemia time without reduction of graft quality in clinical liver transplantation. *Transplantation Proceedings*. 1998, 30: 3683-3685.

KNIGHT, A.J.; NICHOLSON, L.N. Methods of renal preservation. *Transplantation Reviews*. 2001, 15(2): 68-81.

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

LABOW, B.I.; SOUBA, W.W. Glutamine. *World Journal of Surgery*. 2000, 24: 1503-1513.

LAM, V.W.T.; LAURENCE, J.M.; RICHARDSON, A.J.; PLEASS, H.C.C.; ALLEN, R.D.M. Hypothermic machine perfusion in deceased donor kidney transplantation: a systematic review. *Journal of Surgical Research*. 2013, 180: 176-182.

LASH, L.H.; VISARIUS, T.M.; SALL, J.M.; QIAN, W.; TOKARZ, J.J. Cellular and subcellular heterogeneity of glutathione metabolism and transport in rat kidney cells. *Toxicology*. 1998, 130: 1-15.

LASH, L.H.; JONES, D.P. Renal glutathione transport. *The Journal of Biological Chemistry*. 1984, 259(23): 14508-14514.

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

LEIBACH, F.H.; FONTELES, M.C.; PILLION, D.; KAROW, A.M. Glutathione in the isolated perfused rabbit kidney. *Journal of Surgical Research*. 1974, 17: 228-231.

LI, S.; CONSTANTINESCU, I.; GUAN, Q.; KALATHOTTUKAREN, M.T.; BROOKS, D.; NGUAN, C.Y.C.; KIZHAKKEDATHU, J.N.; DU, C. Advantages of replacing hydroxyethyl starch in University of Wisconsin solution with hyperbranched polyglycerol for cold kidney perfusion. *Journal of Surgical Research*. 2016, 205: 59-69.

LINDELL, S.L.; MUIR, H.; BRASSIL, J.; MANGINO, M.J. Hypothermic machine perfusion preservation of the DCD kidney: machine effects. *Journal of Transplantation*. 2013: 1-7.

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

LOPEZ-NEBLINA, F.; TOLEDO, A.H.; TOLEDO-PEREYRA, L.H. Evaluation of a novel cold storage solution(HBS) in a rat kidney transplant model. *Journal of Investigative Surgery*. 2007, 20: 257-263.

MAATHUIS, MH. J.; LEUVENINK, H. G. D.; PLOEG, R.J. Perspectives in organ preservations. *Transplantation*. 2007, 83(10):1289-1298.

MAK, I.T.; BOEHME, P.; WEGLICKI, 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*. 1992, 70(6): 1099-1103.

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

MALINOSKI, D.J.; PATEL, M.S.; AHMED, O.; DALY, M.C.; MOONEY, S.; GRAYBILL, C.O.; FOSTER, C.E.; SALIM, A. The impact of meeting donor management goals on the development of delayed graft function in kidney transplant recipients. *American Journal of Transplantation*. 2013, 13: 993-1000.

MALUF, D.G.; MAS, V.R.; YANEK, K.; STONE, J.J.; WEIS, R.; MASSEY, D.; SPIESS, B.; POSNER, M.P.; FISHER, R.A. Molecular markers in stored kidneys using perfluorocarbon-based preservation solution: preliminary results. *Transplantation Proceedings*. 2006, 38: 1243-1246.

MANEKELLER, S.; LEUVENINK, H.; SITZIA, M.; MINOR, T. Oxygenated machine perfusion preservation of predamaged kidneys with HTK and Belzer machine perfusion solution: an experimental study in pigs. *Transplantation Proceedings*. 2005, 37: 3274-3275.

MANGUS, R.S.; TECTOR, A.J.; AGARWAL, A.; VIANNA, R.; MURDOCK, P.; FRIDELL, J.A. Comparison of Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate solution(HTK) and University of Wisconsin solution(UW) in adult liver transplantation. *Liver Transplantation*. 2006, 12: 226-230.

MARCEN, R.; BURGOS, F.J.; OCANA, J.; PASCUAL, J.; PEREZ-SANZ, P.; GALEANO, C.; TERUEL, J.L.; LOPEZ-MATEOS, M.; ALARCON, C.; ORTUNO, J. Winsconsin and Celsior solutions in renal preservation: a comparative preliminary study. *Transplantation Proceedings*. 2005, 37: 1419-1420.

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

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

MASAKI, Y.; TAMURA, A.; ENDO, T.; YOSHIDA, K.; OKUBO, M.; BABA, S. Effect on rat kidney preservation in the cold of various sugars added to Euro-Collins solution to adjust osmolarity. *Transplantation Proceedings*. 2000, 32: 1623-1625.

MATOS, A.C.C.; REQUIÃO-MOURA, L.R.; CLARIZIA, G.; DURÃO JUNIOR, M.S.; TONATO, E.J.; CHINEN, R.; ARRUDA, E.F.; FILIPONI, T.C.; PIRES, L.M.M.B.; BERTOCCHI, A.P.F.; PACHECO-SILVA, A. Ampliando o pool de doadores de rim: utilização de órgãos com disfunção renal aguda. *Einstein*. 2015, 13(2):319-325.

MEINE, M.H.; LEIPNITZ, I.; ZANOTELLI, M.L.; SCHLINDWEIN, E.S.; KISS, G.; MARTINI, J.; FLECK JR, A.M.; MUCENIC, M.; BRANDÃO, A.M.; MARRONI, C.A.; CRACO CANTISANI, G.P. Comparison between IGL-1 and HTK preservation solutions in deceased donor liver transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2015, 47: 888-893.

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). 1982, 78-79.

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

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

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

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

MELLO, G.; MAACK, T. Nephron function of the isolated rat kidney. American Journal of Physiology. 1976, 231(6): 1699-1707.

MERKENS, L.S.; COHEN, J.J.; PETERSON, O.W. Tissue K⁺ loss from the perfused rat kidney: effects of lactate and albumin treatment. American Journal of Physiology. 253(3): F228-F233, 1978 or American Journal of Physiology.: Renal fluid electrolyte Physiol. 1978, 4(3): F228-F233.

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

MINOR, T.; SITZIA, M.; DOMBROWSKI, F. Kidney transplantation from non-heart-beating donos after oxygenated low-flow machine perfusion preservation with histidine-tryptophan-ketoglutarate solution. Transplant International. 2005, 17: 707-712.

MINOR, T.; PAUL, A.; EFFERZ, P.; WOHLSCHLAEGER, J.; RAUEN, U.; GALLINAT, A. Kidney transplantation after oxygenated machine perfusion preservation with custodial-N solution. Transplant International. 2015, 1102-1108.

MOERS, C.; SMITS, J.M.; MAATHUIS, M-H.J.; TRECKMANN, J.; VAN GELDER, F.; NAPIERALSKI, B.P.; VAN KASTEROP-KUTZ, M.; VAN DER HEIDE, J.J.H.; SQUIFFLET, J-P.; VAN HEURN, E.; KIG.R.; RAHMEL, A.; LEUVENINK, H.G.D.; PAUL, A.; PIRENNE, J.; PLOEG, R.J. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. The New England Journal of Medicine. 2009, 360(1): 7-19.

MONBALIU, D.; HEEDFELD, V.; LIU, Q.; WYLIN, T.; VAN PELT, J.; VEKEMANS, K.; PIRENNE, J. Hypothermic machine perfusion of the liver: is it more complex than for the kidney? Transplantation Proceedings. 2011, 43:3445-3450.

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

MOSBAH, I.B.; ROSELLÓ-CATAFAU, J.; FRANCO-GOU, R.; ABDENNEBI, H.B.; SAIDANE, D.; RAMELLA-VIRIEUX, S.; BOILLOT, O.; PERALTA, C. Preservation of steatotic livers in IGL-1 solution. Liver Transplantation. 2006, 12: 1215-1223.

MOSER, M.A.J.; ARCAND, S.; LIN, H-B.; WOJNAROWICZ, C.; SAWICKA, J.; BANERJEE, T.; LUO, Y.; BECK, G.R.; LUKE, P.P.; SAWICKI, G. Protection of the transplant kidney from preservation injury by inhibition of matrix metalloproteinases. Plos one. 2016, 1-20.

MOSKOVITZ, B.; KATZ, Y.; SINGER, P.; NATIV, O.; ROSENBERG, B. Glutamine metabolism and utilization: relevance to major problems in health care. Pharmacological Research. 1994, 30(1): 61-71.

MOTA, L.S.; OLIVEIRA, C.M.C.; PINHEIRO JÚNIOR, F.M.L.; SANTOS, L.C.O.; NÓBREGA, D.G.; FERNANDES, P.F.B.C.; COSTA, A.A.M.; SILVA, S.L. Comparative study between kidney transplantation with deceased donor expanded criteria and donor standart criteria in a single center in Brazil. Brazilian Journal of Nephrology. 2016, 38(3): 334-343.

MOUTABARRIK, A.; MOURID, M.; NAKANISHI, I. The effect of organ preservation solutions on kidney tubular and endothelial cells. Transplant International. 1998, 11:58-62.

MOZES, M.F.; SKOLEK, R.B.; KORF, B.C. Use of perfusion parameters in predicting outcomes of machine-preserved kidneys. Transplantation Proceedings. 2005, 37: 350-351.

MUHIBACHER, F.; LANGER, F.; MITTERMAYER, C. Preservation solutions for transplantation. *Transplantation Proceedings*. 1999, 31(5): 2069-2070.

NAFAR, M.; SAHRAEI, Z.; SALAMZADEH, J.; SAMAVAT, S.; VAZIN, N.D. Oxidative stress in kidney transplantation: causes, consequences and potential treatment. *Transplantation*. 2011, 5: 357-372.

NARDO, B.; BERTELLI, R.; MONTALTI, R.; BELTEMPO, P.; PUVIANI, L.; PACILE, V.; CAVALLARI, A. Preliminary results of a clinical randomized study comparing celsior and HTK solutions in liver preservation for transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2005, 37: 320-322.

NICHOLSON, M.L.; HOSGOOD, S.A. Renal transplantation after ex vivo normothermic perfusion: the first clinical study. *American Journal of Transplantation*. 2013, 13: 1246-1252.

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

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

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

O'CALLAGHAM, J.M.; KNIGHT, S.R.; MORGAN, R.D.; MORRIS, P.J. Preservation solutions for static cold storage of kidney allografts: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Transplantation*. 2012, 12: 896-906.

O'CALLAGHAM, J.M.; MORGAN, R.D.; KNIGHT, S.R.; MORRIS, P.J. Systematic review and meta-analysis of hypothermic machine perfusion versus static cold storage of kidney allografts on transplant outcomes. *British Journal of Surgery*. 2013, 100: 991-1001.

O'CALLAGHAN, J.; LEUVENINK, H.G.D.; FRIEND, P.J.; PLOEG, R.J. Kidney preservation – Principles and practice. 7th edition. Elsevier Inc. Chapter 9. 2013, 130-141.

OPELZ, G.; DOHLER, B. Multicenter analysis of kidney preservation. Transplantation. 2007, 83(3): 247-253.

ORMSTAD, K.; JONES, D.P.; ORRENIUS, S. Characteristics of glutathione biosynthesis by freshly isolated rat kidney cells. The Journal of Biological Chemistry. 1980, 25(1): 175-181.

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

PARSONS, R.F.; GUARRERA, J.V. Preservation solutions for static cold storage of abdominal allografts: which is best? Current Opinion in Organ Transplantation. 2014, 19:100-107.

PATEL, M.; HOSGOOD, S.; NICHOLSON, M.L. The effects of arterial pressure during normothermic kidney perfusion. Journal of Surgical Research. 2014, 463-468.

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

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

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

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

PEGG, D.E.; FARRANT, J. Vascular resistance and edema in the isolated rat kidney cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 1980, 255(1): 175-181.

PENG, Z.; ZHOU, F.; WANG, H.; WHEN, X.; NOLIN T.D.; BISHOP, J.V.; KELLUM, J.A. The anti-oxidant effects are not the main mechanism for glutamine's protective effects on acute kidney injury in mice. *European Journal of Pharmacology*. 2013, 705: 11-19.

PERES, L.A. B; MOCELIM, A.J; DELFINO, V.D.A. Injúria de isquemia/reperfusão: implicações no transplante renal. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. 2005, 207-214.

PLATA-MUNOZ, J. J.; MUTHUSAMY, A.; QUIROGA, I.; CONTRACTOR, H. H.; SINHA, S.; VAIDYA, A.; DARBY, C.; FUGGLE, S. V.; FRIEND, P.J. Impacto f pulsatile perfusion on postoperative outcome of kidneys from controlled donos after cardiac death. *Transplant International*. 2008, 21: 899-907.

PLOEG, R.J.; VAN BOCKEL, J.H.; LANGENDIJK, P.T.H.; GROENEWEGEN, M.; WOUDE, F.J.V.; PERSIN, G.G.; THOROGOOD, J.; HERMANS, J. Effect of preservation solution on results of cadaveric kidney transplantation. *The Lancet*. 1992, 340: 129-137.

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

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

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

REQUIÃO-MOURA, L.R.; DURÃO JUNIOR, M.S.; MATOS, A.C.C.; PACHECO-SILVA, A. Lesão de isquemia e reperfusão no transplante renal: paradigmas hemodinâmico e imunológico. *Einstein*. 2015, 13(1): 129-135.

REZNIK, O.N.; BAGNENKO, S.F.; LOGINOV, I.V.; IJINA, V.A.; ANANYEV, A.N.; MOYSYUK, Y.G. The use of oxygenated perfluorocarbonic emulsion for initial in situ kidney perfusion. *Transplantation Proceedings*. 2008, 40: 1027-1028.

RICE, M.J.; SOUTHARD, H.H.; HOFFMANN, R.M.; BELZER, F.O. Effects of hypothermic preservation on the isolated perfused kidney: a comparison of reperfusion methods. *Cryobiology*. 1985, 22: 161-167.

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

ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J.; PEDROSA, R.G.; DE CASTRO, I.A.; PIRES, I.S.O. Effect of alanyl-glutamine supplementation on plasma and tissue glutamine concentrations in rats submitted to exhaustive exercise. *Nutrition*. 2006, 22: 564-571.

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

ROSENFELD, S.; SELLERS, A.L. Pressure-flow studies in the isolated artificial heart-lung perfused mammalian kidney. *American Journal of Physiology*. 1960, 199(3): 499-502.

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

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

SADAVSKY, D.; KALACHIK, O.; OGANOVA, E.; FEDORUK, D.; KRUCHENOK, E.; RUMMO, O. Preservation solution effluent osmolality as a predictor of initial kidney transplant dysfunction. *Experimental and Clinical Transplantation*. 2015, 3: 84-87.

SALAHUDEEN, A.K.; HUANG, H.; PATEL, P.; JENKINS, J.K. Mechanism and prevention of cold storage-induced human renal tubular cell injury. *Transplantation*. 2000, 70(10): 1424-1431.

SANDES-FREITAS, T.V. Expanded donor criteria in kidney transplantation: a suitable option to increase the donor pool in Brazil? *Brazilian Journal of Nephrology*. 2016, 38(3): 273-274.

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*. 1975, 354: 349-365.

SCHUREK, H.J.; ALT, J. M. Effect of albumin on the function of perfused rat kidney. *American Journal of Physiology*. 1981, 240(6): F569-76.

SEGAL, N.B.; GUTTMAN, F.M. Rabbit kidney function in vitro: The effect of colloids, energy substrate, a vasodilator, perfusion pressure, and bovine serum albumin. *Cryobiology*. 1983, 20: 527-541.

SHOSKES, D.A.; HALLORAN, P.F. Delayed graft function in renal transplantation: etiology, management and long-term significance. *The Journal of Urology*. 1996, 155: 1831-1840.

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

SMAIL, N.; TCHERVENKOV, J.; PARASKEVAS, S.; BARAN, D.; MUCSI, I.; HASSANAIN, M.; CHAUDHLY, P.; CANTAROVICH, M. Impact of early graft function

on 10-year graft survival in recipients of kidneys from standard or expanded-criteria donors. *Transplantation*. 2013, 27(9)(2): 176-181.

SNOEIJIS, M.G.J.; VAAHTERA, L.; DE VRIES, E.E.; SCHURINK, G.W.H.; HAENEN, G.R.M.M.; PEUTZ-KOOTSTRA, C.J.; BUURMAN, W.A.; VAN HEURN, L.W.E.; PARKKINEN, J. Addition of a water-soluble propofol formulation to preservation solution in experimental kidney transplantation. *Basic and Experimental Research*. 2011, 92(3): 296-302.

SOUBA, W.W.; SMITH, R.J.; WILMORE, D.W. Effects of glucocorticoids on glutamine metabolism in visceral organs. *Metabolism*. 1985, 34(5): 450-456.

SOUSA JÚNIOR, W.O. Utilização de perfusão renal pulsátil para otimização do enxerto no transplante renal: revisão de literatura. Dissertação de Tese de Mestrado. Universidade Federal do Piauí. 2016.

SOUTHARD, J.H.; RICE, M.J.; BELZER, F.O. Preservation of renal function by adenosine-stimulated ATP synthesis in hypothermically perfused dog kidneys. *Cryobiology*. 1985, 22: 237-242.

SOUTHARD, J.H. Viability assays in organ preservation. *Cryobiology*. 1989, 26: 232-238.

SOUTHARD, J.H.; BELZER, F.O. Organ preservation. *Annu. Rev. Med.* 1995, 46: 235-247.

SOUTHARD, J.H. Improving Early Graft Function: Role of Preservation. *Transplantation Proceedings*. 1997, 29: 3510-3511.

STEGALL, M.D.; GASTON, R.S.; COSIO, F.G.; MATAS, A. Through a glass darkly: seeking clarity in preventing late kidney transplant failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2015, 26: 20-29.

STUMVOLL, M.; MEYER, C.; PERRIELLO, G.; KREIDER, M.; WELLE, S.; GERICH, J. Human kidney and liver gluconeogenesis: evidence for organ substrate selectivity. American Physiological Society. 1998, E817-E826.

STUMVOLL, M.; PERRIELLO, G.; MEYER, C.; GERICH, J. Role of glutamine in human carbohydrate metabolism in kidney and other tissues. Kidney International. 1999, 55:778-792.

ST PETER, S.D.; IMBER, C.J.; FRIEND, P.J. Liver and kidney preservation by perfusion. Lancet. 2002, 359: 604-613.

STRZELECKI, T.; SCHOOLWERTH, A. Ketoglutarate modulation of glutamine metabolism by rat renal mitochondria. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1981, 102(2): 588-593.

SUMMERS, D.M.; JOHNSON, R.J.; ALLEN, J.; FUGGLE, S.V.; COLLETT, D.; WATSON, C.J.; BRADLEY, J.A. Analysis of factors that affect outcome after transplantation of kidneys donated after cardiac death in the UK: a cohort study. Lancet. 2010, 376: 1303-1311.

SZAJER, M.; SHAH, G.; DILIP, K.; SEARLES B.; LI L.; BRUCH, D.; DARLING, E. A novel extracorporeal kidney perfusion system: a concept model. Perfusion. 2004, 19: 305-310.

THIRUCHELVAM, P.T.R.; WILLICOMBE, M.; HAKIM, N.; TAUBE, D.; PAPALOIS, V. Renal Transplantation. BMJ. 2011, 1-8.

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

TIMSIT, M.; TULLIUS, S.G. Hypothermic kidney preservation: a remembrance of the past in the future? Current Opinion in Organ Transplantation. 2011, 16: 162-168.

TRECKMANN, J.; MOERS, C.; SMITS, J.M.; GALLINAT, A.; MAATHUIS, M-H.J.; KASTEROP-KUTZ, M.V.; JOCHMANS, I.; VAN DER HEIDE, J.J.H.; SQUIFFLET, J-P.; VAN HEURN, E.; KIRSTE, G.R.; RAHMEL, A.; LEUVENINK, H.G.D.; PIRENNE, J.; PLOEG, R.J.; PAUL, A. Machine perfusion versus cold storage for preservation of kidneys from expanded criteria donors after brain death. *Transplant International*. 2011, 24: 548-554.

THUILLIER, R.; RENARD, C.; ROGEL-GAILLARD-ROGEL, C.; DEMARS, J.; MILAN, D.; FORESTIER, L.; MOULENE, A.; GOUJON, J.M.; BADET, L.; HAUET, T. Effect of polyethylene glycol-based preservation solutions on graft injury in experimental kidney transplantation. *British Journal of Surgery*. 2011, 98: 368-378.

TRUSHKOV, S.; BICANS, J.; SHEVELEV, V.; JUSHINSKIS, J.; SUHORUKOV, V.; ROZENTAL, R. Use of HTK solution in kidney preservation. *Transplantation Proceedings*. 2003, 35: 766.

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

VAN BREUSSEGEM, A.; VAN PELT, J.; WYLIN, T.; HEEDFELD, V.; ZEEGERS, M.; MONBALIU, D.; PIRENNE, J.; VEKEMANS, K. Presumed and actual concentrations of reduced glutathione in preservation solutions. *Transplantation Proceedings*. 2011, 43: 3451-3454.

VAN DE POLL, M.C.G.; SOETERS, P.B.; DEUTZ, N.E.P.; FEARON, K.C.H.; DEJONG, C.H.C. Renal metabolism of amino acids: its role in interorgan amino acid exchange. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004, 79: 185-197.

VAN DER PLAATS, A.; HART, N.A.; MORARIU, A.M.; VERKERKE, G.J.; LEUVENINK, H.G.D.; PLOEG, R.J.; RAKHORST, G. Effect of University of Wisconsin organ-preservation solution on haemorheology. *Transplant International*. 2004, 17: 227-233.

VAN DER VLIET, J.A.; WARLÉ, M.C. The need to reduce cold ischemia time in kidney transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2013, 18(2): 174-178.

VAN SMAALEN, T.C.; HOOGLAND, E. R.; VAN HEURN, L. W. Machine perfusion viability testing. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2013, 18(2): 168-173.

VAN STRAATEN, H.W.M.; YOUJI, H.E.; VAN DUIST, M.M.; LABRUYÈRE, W.T.; VERMEULEN, J.L.M.; VAN DIJK, P.J.; RUIJTER, J.M.; LAMERS, W.H.; HAKVOORT, T.B.M. Cellular concentrations of glutamine synthetase in murine organs. *Biochem. Cell*. 2006, 84: 215-231.

VAZIRI, N.; THUILLIER, R.; FAVREAU, F.D.; EUGENE, M.; MILIN, S.; CHATARET, N.P.; HAUET, T.; BARROU, B. Analysis of machine perfusion benefits in kidney grafts: a preclinical study. *Journal of Translational Medicine*. 2011, 9(15): 1-13.

VISARIUS, T.M.; PUTT, D.A.; SCHARE, J.M.; PEGOUSKE, D.M.; LASH, L.H. Pathways of glutathione: metabolism and transport in isolated proximal tubular cells from rat kidney. *Biochemical Pharmacology*. 1996, 52: 259-272.

VOGEL, T.; BROCKMANN, J.G.; COUSSIOS, C.; FRIEND, P.J. The role of normothermic extracorporeal perfusion in minimizing ischemia reperfusion injury. *Transplantation Reviews*. 2012, 26: 156-162.

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

WATSON, C.J.E.; WELLS, A.C.; ROBERTS, R.J.; AKOH, J.A.; FRIEND, P.J.; AKYOL, M.; CALDER, F.R.; ALLEN, J.E.; JONES, M.N.; COLLETT, D.; BRADLEY, J.A. Cold machine perfusion versus static cold storage of kidneys donated after cardiac death: a UK multicenter randomized controlled trial. *American Journal of Transplantation*. 2010, 10: 1991-1999.

WATSON, C.J.E.; BRADLEY, J.A. Cold storage of deceased donor kidneys: Does the solution matter or is the solution elsewhere? *American Journal of Transplantation*. 2012, 12: 806-807.

WATSON, C.J.E.; DARK, J.H. Organ transplantation: historical perspective and current practice. *British Journal of Anaesthesia*. 2012, 108(S1): i29-i42.

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

WALLER, H.L.; HARPER, S.J.F.; HOSGOOD, S.A.; BAGUL, A.; YANG, B.; KAY, M.D.; KAUSHIK, M.; NICHOLSON, M.L. Biomarkers of oxidative damage to predict ischaemia-reperfusion injury in an isolated organ perfusion model of the transplanted kidney. *Free Radical Research*. 2006, 40(11): 1218-1225.

WALLER, H.L.; HARPER, S.J.F.; HOSGOOD, S.A.; GAGUL, A.; KAY, M.D.; KAUSHIK, M.; YANG, B.; BICKNELL, G.R.; NICHOLSON, L. Differential expression of cytoprotective and apoptotic genes in an ischaemia-reperfusion isolated organ perfusion model of the transplanted kidney. *Transplant International*. 2007, 20: 625-631.

WEINBERG, J.M.; BUCHANAN, D.N.; DAVIS, J.A.; ABARZUA, M. Metabolic aspects of protection by glycine against hypoxic injury to isolated proximal tubules. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1991, 1: 949-958.

WEINBERG, J.M.; VENKATACHALAM, M.A.; GARZO-QUINTERO, R.; ROESER, N.F. DAVIS, J.A. Structural requirements for protection by small amino acids against injury in kidney proximal tubules. *FASEB Journal*. 1990, 4: 3347-3354.

WEINBERG, J.M.; DAVIS, J.A.; ABARZUA, M.; RAJAN, T. Cytoprotective effects of glycine and glutathione against hypoxic injury to renal tubules. *J. Clin. Invest.* 1987, 80: 1446-1454.

WEISS, S.D.; MCNAMARA, P.D.; PEPE, L.M.; SEGAL, S. Glutamine and glutamic acid uptake by rat renal brushborder membrane vesicles. *J. Membrane Biol.* 1978, 43: 91-105.

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

ZULUAGA, G.L.L.; AGUDELO, R.E.S.; TOBON, J.J.Z. Preservation solutions for liver transplantation in adults: Celsior versus custodial: a systematic review and meta-analysis with an indirect comparison of randomized trials. *Transplantation Proceedings.* 2013, 45: 25-32.

YADAV, S.S.; MARTIN, P.D.; CLAVIEN, P.A.; HARLAND, R.C. Comparison of techniques for rapid cooling of organs in a non-heart-beating porcine model. *Transplantation Proceedings.* 1997, 29: 3557-3558.

YAMAMOTO, N.; KONISHI, Y.; WAKASHIRO, S.; TAKAYASU, T.; TATSUMI, Y.; SHIMAHARA, Y.; TANAKA, K.; YAMAOKA, Y.; OZAWA, K. Seventy-two-hour preservation of porcine liver by continuous hypothermic perfusion with UW solution in comparison with simple cold storage. *Journal of Surgical Research.* 1991, 51: 288-292.

YONG, C.; HOSGOOD, S.A.; NICHOLSON, M.L. Ex-vivo normothermic perfusion in renal transplantation: past, present and future. *Current Opinion in Organ Transplantation.* 2016, 21: 301-307.

WOLFE, R.A.; ASHBY, V.B.; MILFORD, E.L.; OJO, A.O.; ETTINGER, R.E.; AGODOA, L.Y.C.; HELD, P.J.; PORT, F.K. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *The New England Journal of Medicine.* 1999, 341(23): 1725-1730.