**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

MARCELO FERREIRA CASSINI

**CORRELAÇÃO ENTRE A ESPECTROSCOPIA DE
FLUORESCÊNCIA INDUZIDA PELO LASER E AS ALTERAÇÕES
HISTOLÓGICAS NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO
RENAL EM RATOS**

Ribeirão Preto

2012

MARCELO FERREIRA CASSINI

CORRELAÇÃO ENTRE A ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA PELO LASER E AS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO RENAL EM RATOS

Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo,
para obtenção do **Título de Doutor**.

Área de concentração: Clínica
Cirúrgica.

Orientador: **Prof. Dr. Silvio Tucci Junior**

Ribeirão Preto

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Cassini, Marcelo Ferreira

Correlação entre a espectroscopia de fluorescência induzida pelo laser e as alterações histológicas na isquemia e reperfusão renal em ratos, 2012.

108 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Orientador: Tucci Jr., Silvio.

1. Espectroscopia de fluorescência. 2. Isquemia e reperfusão renais. 3. Achados histológicos. 4. Transplante renal.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marcelo Ferreira Cassini

Correlação entre a espectroscopia de fluorescência induzida pelo laser e as alterações histológicas na isquemia e reperfusão renal em ratos.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do **Título de Doutor**.
Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Valdemar Ortiz

Instituição: _____ UNIFESP _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. José Genilson Alves Ribeiro

Instituição: _____ UFF _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Luis Fernando Tirapelli

Instituição: _____ FMRP-USP _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva

Instituição: _____ FMRP-USP _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Sílvio Tucci Júnior

Instituição: _____ FMRP-USP _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à **Patrícia** e **Mariana**, pelo
companheirismo, paciência e incentivo incondicionais.*

Vocês são a razão e as principais conquistas da minha vida.

*Aos meus pais **Celuta** e **Amâncio**(*in memoriam*) pelo amor,
carinho e dedicação, exemplos que ajudam a vencer quaisquer obstáculos da
vida.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Sabedoria atinge o seu ápice na Simplicidade.

*Agradeço ao **Prof. Sílvio**, fotógrafo talentoso, pianista nato, professor e médico nas horas vagas, por compartilhar uma pequena amostra do seu profundo Saber na realização deste trabalho.*

Registro aqui o meu respeito e admiração pela sua serenidade e bom humor.

Obrigado pela confiança em mim depositada.

AGRADECIMENTOS

A realização de um projeto de pesquisa como este só foi possível com o apoio de vários colaboradores.

*Aquí, o meu reconhecimento e gratidão pela importante e irretocável contribuição, aos membros do **Laboratório de Cirurgia Experimental** do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP-USP e do **Instituto de Física da USP de São Carlos**, bem como aos **Professores Luís Fernando Tirapelli, Antônio Carlos P. Martins e Gyl Eanes B. Silva**.*

Sem vocês este trabalho jamais seria concluído.

*À **Laucéa, Tânia e Juliana**, pela solicitude, prontidão e suporte administrativo.*

“Nunca confunda movimento com ação.”

Ernest Hemingway

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo.”

Winston Churchill

“Jamais haverá Ano Novo se cometer os mesmos erros dos Anos Velhos”

Luís Vaz de Camões

RESUMO

Cassini, MF. **Correlação entre a espectroscopia de fluorescência induzida pelo laser e alterações histológicas na isquemia e reperfusão renal em ratos.** 108 p. Tese de (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2012.

Introdução: O transplante renal é amplamente reconhecido como a melhor forma de tratamento para os pacientes que necessitam de terapia de substituição renal. Frequentemente a equipe transplantadora se depara com a difícil questão de determinar se órgãos, provenientes de doadores falecidos e limítrofes ou em parada cardíaca, estão aptos para serem transplantados. É difícil quantificar a intensidade do dano provocado pela isquemia no enxerto a ser utilizado, especialmente se o doador apresentou quadro de instabilidade hemodinâmica com queda significativa da perfusão tecidual e aumento do risco de diminuir a função do enxerto e afetar adversamente sua sobrevida. Desta forma torna-se justificável a utilização da técnica de espectroscopia de fluorescência induzida pelo laser, na tentativa de se avaliar a correlação entre os seus achados e o grau de lesão histológica renal experimental, uma vez que se trata de um método objetivo, não invasivo, rápido e em tempo real que, futuramente, pode ser aplicada nos transplantes renais em humanos.

Objetivos: Avaliar a correlação entre os dados da espectroscopia de fluorescência induzida pelo laser e alterações histológicas na isquemia e reperfusão renal em ratos, e se existe diferença significativa na leitura da espectroscopia entre os polos superior, inferior e o terço médio.

Materiais e Métodos: Foram utilizados 33 ratos (*Rattus norvegicus*) machos adultos da linhagem Wistar que, depois de anestesiados, tiveram seus rins esquerdos abordados. Inicialmente os rins foram submetidos à detecção da espectroscopia de fluorescência dos polos superiores, inferiores e terços médios. As excitações foram geradas por lasers com comprimentos de onda de 408, 442 e 532 nm. Em seguida os pedículos renais esquerdos foram dissecados, isolados e clampeados com auxílio de mini-pinça vascular. Então, os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos isquêmicos de 30, 60 e 120 minutos de isquemia quente. Em cada um dos grupos, os rins foram novamente analisados pela espectroscopia de fluorescência, bem como após 5 minutos de reperfusão, utilizando novamente feixes excitatórios com os mesmos comprimentos de onda, nas mesmas regiões renais. Posteriormente os rins esquerdos foram coletados e enviados para estudo histológico.

Resultados: O tempo de isquemia mostrou forte influência com a graduação histológica. Com 30 minutos de isquemia, nenhum comprimento de onda (408, 442 e 532 nm) apresentou correlação com a graduação histológica ($p = 0,81$; $p = 0,11$; $p = 0,21$, respectivamente). Com 60 minutos de isquemia, o laser de excitação de 532 nm (na fase de reperfusão) apresentou coeficiente de correlação negativa significativa ($r = -0,61$) com a graduação histológica. Na isquemia de 120 minutos, o laser com 442 nm de comprimento de onda (na fase de reperfusão) mostrou o coeficiente de correlação negativa

significativa ($r = - 0,73$) com a graduação histológica. O terço médio renal apresentou média estatística superior à dos polos ($p < 0,001$) na leitura da espectroscopia de fluorescência.

Conclusões: Há correlação entre os dados da espectroscopia de fluorescência induzida pelo laser e as alterações histológicas na isquemia renal em ratos, sendo necessário, durante a investigação, analisar apenas o terço médio renal.

Palavras chaves: Espectroscopia de fluorescência, isquemia e reperfusão renais, achados histológicos, transplante renal.

ABSTRACT

Cassini, MF. **Correlations between the laser-induced fluorescence spectroscopy and histological changes in kidney ischemia and reperfusion in rats.** 108 p. Tese de (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2012.

Introduction: Renal transplantation is widely recognized as the best form of treatment for patients who require renal replacement therapy. Often, the transplant team is faced with a difficult question, if organs from deceased marginal donors or non-heart beating donors are able to be transplanted. It is difficult to quantify the intensity of damage caused by ischemia in the graft to be used, especially if the donor had hemodynamic instability with a significant decrease of the tissue perfusion and an increased of the risk of diminishing the graft function which could affect adversely its survival. Thus it is justified to use the technique of laser-induced fluorescence spectroscopy, to assess the correlations between its results and the histological grade in experimental renal injury, since it is an objective, non-invasive, fast and in real-time analysis, which can be applied, in the future, in human kidney transplants.

Objectives: To evaluate the correlation between the data of laser-induced fluorescence spectroscopy and histological changes in kidney ischemia and reperfusion in rats, and if there are significant differences of reading between the upper and lower poles and the middle area of such kidneys.

Materials and Methods: We used 33 adults' male rats (*Rattus norvegicus*) of Wistar strain, which after anesthetized, had their left kidney addressed. Initially such kidneys were submitted to detection of the fluorescence spectroscopy of the upper pole, lower pole and the middle area. Excitations were generated by lasers having wavelengths of 408, 442 and 532 nm. Then the left renal pedicles were dissected, isolated and clamped. Then the animals were randomized into three ischemic groups of 30, 60 and 120 minutes. In each group, the kidneys were analyzed by fluorescence spectroscopy for the second time, and again after 5 minutes of reperfusion, using excitatory beam with same wavelength, at the poles (upper and lower) and the middle area of the kidneys. Later, the left kidney were collected and sent for histological examination.

Results: The ischemia time showed a strong influence on the histological grade. With 30 minutes of ischemia, no wavelength (408, 442 and 532 nm) was correlated with the histological lesions ($p = 0.81$, $p = 0.11$, $p = 0.21$, respectively). With 60 minutes of ischemia, the laser excitation of 532 nm (in the reperfusion phase) showed a significant negative correlation coefficient ($r = - 0.61$) with the histological grading. In 120 minutes of ischemia, laser with 442 nm wavelength (in the reperfusion phase) showed a significant negative correlation coefficient ($r = - 0.73$) with the histological grade. The middle area of the kidneys showed a higher average statistically ($p < 0,001$) than the poles in the reading of fluorescence spectroscopy.

Conclusions: There is a strong correlation between the data of laser-induced fluorescence spectroscopy and the histological changes in rat's renal ischemia, being necessary, during the investigation, to analyze only the middle area of the kidneys.

Keywords: Fluorescence spectroscopy, renal ischemia-reperfusion, histological finding, renal transplant.

LISTA DE ABREVIATURAS e SÍMBOLOS

ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
AUTO	Autofluorescência
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i> (dispositivo de carga acoplada)
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
°C	Graus Celsius (símbolo que designa unidade de temperatura)
(c)	Coeficiente de matriz
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EEM	Excitation-Emission Matrices (matrizes de excitação e emissão)
(E)	Espectro de fluorescência do rim
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo
G	O grama – símbolo da unidade de medida de massa - milésima parte do quilo
GC	Grupo controle
GCH	Grupo para controle histológico
G1	Grupo experimental de número 1
G2	Grupo experimental de número 2
G3	Grupo experimental de número 3
H&E ou HE	Coloração de Hematoxilina e Eosina (histologia).
HeCd	Símbolo químico do Helium-Cadmium laser
H ₂ O ₂	Fórmula química da água oxigenada
ICAM	Moléculas de adesão intracelular
IRA	Insuficiência renal aguda
ISQ	Isquemia
I/R	Isquemia e reperfusão
K	Símbolo químico do potássio
M	Terço médio

Min. ou min	Minuto – unidade de tempo
Mm	Milímetro (unidade de comprimento – milésima parte do metro)
mm ²	Milímetro quadrado (unidade de área – quadrado cujos lados têm 0,001m)
mW	Miliwatts (unidade da grandeza física potência – milésima parte do watt)
(M)	Matriz
Na	Símbolo químico do sódio
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
Na-K-ATPase	Enzima degradadora do ATP relacionada à bomba de sódio e potássio
Nd ³⁺ :YAG	Neodymium-doped: Yttrium Aluminium Garnet laser
Nm	Nanômetro (unidade de comprimento – 10 ⁻⁹ m)
NO	Símbolo químico do óxido nítrico
NTA	Necrose tubular aguda
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Polo inferior
PS	Polo superior
PVC	Policloreto de vinila
REP	Reperfusão
S	<i>Spin</i> (giro – no texto, relacionado à órbita do elétron)
TGF-β	Fator transformador de crescimento – beta
Ua	Unidade arbitrária
UV	Ultravioleta
X	Sinal matemático que indica multiplicação
X ²	Teste do Qui-quadrado
μm	Micrômetro (unidade de comprimento – 10 ⁻⁶ m)
λ _{ex.}	Símbolo grego lambda – comprimento de onda de excitação
λ _{em}	Símbolo grego lambda – comprimento de onda de emissão

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-	Relação entre o tempo de isquemia e o número de rins avaliados pela espectroscopia de fluorescência	43
Tabela 2	-	Análise das fases de autofluorescência, isquemia e reperfusão. (Espectroscopia de Fluorescência).....	56
Tabela 3	-	Correlação entre as regiões renais entre si de acordo com os dados da espectroscopia de fluorescência	58
Tabela 4	-	Correlação entre o tempo de isquemia e a graduação histological.....	59
Tabela 5	-	Correlação entre a Graduação Histológica e o Tempo de Isquemia	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Acesso transperitoneal do rim esquerdo; incisão abdominal mediana.....	42
Figura 2.	Identificação, dissecação e isolamento do pedículo renal	44
Figura 3.	Clampeamento do pedículo renal esquerdo (isquemia).....	44
Figura 4.	Aplicação do laser durante a fase de isquemia	45
Figura 5.	Liberação do pedículo renal e início da reperfusão ...	46
Figura 6.	Aplicação laser após reperfusão completa do córtex renal	46
Figura 7.	Esquema do sistema de diagnóstico do espectrofotômetro “Spectr-Cluster”. (Dissertação de Mestrado – José Dirceu Vollet Filho – Física da USP de São Carlos, 2007)	47
Figura 8.	Mostrando a sonda em “Y” com os trajetos percorridos pela luz (a), e o detalhe da caneta emitindo o laser (b) de 532 nm (verde).....	48
Figura 9.	Representação dos espectros de emissão de fluorescência e dos coeficientes de contribuição para obtenção do espectro do tecido renal. (Modificada da Dissertação de Mestrado – José Dirceu Vollet Filho – Física da USP de São Carlos, 2007).....	49
Figura 10.	Ponteira do Laser (532 nm) sendo aplicada no córtex renal do rato (autofluorescência)	51
Figura 11.	Gráficos das médias das fluorescências renais - autofluorescência (AUTO), isquemia (ISQ) e reperfusão (REP) obtidas, independente do comprimento de onda do laser de excitação	55
Figura 12.	Mostrando queda não significativa da curva de reperfusão com 30 minutos de isquemia, em relação à curva de controle (autofluorescência). (p = 0,21).....	56
Figura 13.	Mostrando queda significativa da curva de reperfusão com 60 minutos de isquemia, em relação à curva de controle (autofluorescência). (p < 0,001).....	57

Figura 14.	Glomérulo (seta) e túbulos renais proximais normais com células altas, citoplasma eosinofílico abundante. (H&E, 400x)	60
Figura 15.	Túbulos proximais normais (A), com núcleos basais e o epitélio com borda em escova (em destaque – seta) (H&E 400x) e o aspecto túbulo-glomerular normal (B) visto com o Tricômico de Masson (630x)	61
Figura 16.	Mostrando a Necrose Tubular Aguda (NTA) com descamação celular para a luz dos túbulos proximais (setas), e dilatação tubular. (H&E 400x)...	62
Figura 17.	Dilatação dos túbulos proximais com perda da borda em escova, típico da necrose tubular aguda (NTA). (Tricrômico de Masson, 400x)	62
Figura 18.	Necrose tubular aguda. Fragmentos celulares se projetando para a luz tubular (seta), perda da borda em escova e dilatação tubular. (T. Masson, 800x).....	63
Figura 19.	Necrose tubular aguda (NTA) acentuada com queda maciça de fragmentos celulares na luz dos túbulos causando obstrução luminar. (Tricrômico de Masson, 800x)	63
Figura 20.	Com 30 minutos de isquemia, o laser de 408 nm não apresentou correlação com o grau de lesão histological.....	64
Figura 21.	Com 30 minutos de isquemia, o laser de 532 nm não apresentou correlação com o grau de lesão histological.....	65
Figura 22.	Com 30 minutos de isquemia, o laser de 442 nm não apresentou correlação com o grau de lesão histological.....	65
Figura 23.	Com 60 minutos de isquemia, o laser de 532 nm apresentou correlação significativa (na reperfusão) com o grau de lesão histológica ($r = - 0,61$)	66
Figura 24.	Na isquemia de 120 minutos, o laser de 442 nm mostrou coeficiente de correlação significativa (na reperfusão) com o grau de lesão histological	66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Isquemia.....	20
1.2 Lesão Celular na Reperusão.....	25
1.3 Foto detecção por Fluorescência e Espectroscopia.....	29
 2 OBJETIVOS.....	 38
 3 MATERIAIS E MÉTODOS	 40
3.1 Animais	40
3.2 Grupos experimentais	42
3.3 Espectroscopia de Fluorescência.....	47
3.4 Fluorescência das substâncias endógenas.....	49
3.5 Análise Histológica.....	52
3.6 Análise Estatística	53
 4 RESULTADOS.....	 55
 5 DISCUSSÃO.....	 68
 6 CONCLUSÕES	 79
 REFERÊNCIAS	 81
 ANEXO.....	 95
 APENDICES.....	 97

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O transplante renal é amplamente reconhecido como a melhor forma de tratamento para os pacientes que necessitam de terapia de substituição renal (NANKIVELL e KUYPERS, 2011), tanto do ponto de vista clínico, quanto na avaliação dos custos (MENDELOFF et al., 2004). O crescimento contínuo das listas de espera por órgãos para transplante faz com que haja necessidade de se desenvolver métodos para aumentar o número de doadores. Frequentemente a equipe transplantadora se depara com a difícil questão de determinar se órgãos provenientes de doadores falecidos e limítrofes estão aptos para serem transplantados. Não é fácil quantificar a intensidade do dano provocado pela isquemia no enxerto a ser utilizado, especialmente se o doador apresentou quadro de instabilidade hemodinâmica significativa. A procura por receptores ideais para órgãos de doadores com morte encefálica e em parada cardíaca causa aumentos adicionais e variáveis no tempo de isquemia, com dano tissular significativo que pode diminuir a função do enxerto e afetar adversamente sua sobrevida, bem como a sobrevida global do receptor. Não apenas a isquemia pode causar dano celular, mas também e principalmente, a restauração do fluxo sanguíneo, embora necessária para resgatar o órgão da necrose e da permanente perda funcional, a reperfusão pode causar injúria celular aguda e disfunção renal (PERICO et al., 2004; SCHRIER et al., 2004; THADHANI et al., 1996).

Nos transplantes renais, dependendo da gravidade da injúria causada pela isquemia e reperfusão, cerca de 20 a 80% dos receptores podem necessitar de diálise temporária nas primeiras semanas após o transplante, fato conhecido como retardo na retomada da função do enxerto (OJO et al., 1997). Este retardo complica o manejo clínico do paciente transplantado, dificultando por vezes, o reconhecimento e o diagnóstico da rejeição aguda. Além disso, uma metanálise recente de estudos observacionais mostra que o retardo na retomada da função do enxerto está

associada ao aumento de 40% no risco de falência definitiva do transplante com perda irreversível do órgão (YARLAGADDA et al., 2009).

Em contraste com a doação após a morte encefálica, os rins provenientes de doadores com parada cardíaca sofrem ainda mais com a injúria provocada pela isquemia quente até a preservação adequada. Como resultado, a grande maioria destes rins evolui com retardo na retomada da sua função e até 25% deles jamais apresentarão recuperação adequada, fato conhecido como falência primária do enxerto (WIJNEN et al., 1997).

Com a intenção de se reduzir a incidência do retardo na retomada da função renal e de minimizar os danos provocados pela isquemia/reperfusão, várias ações objetivando a melhoria da preservação hipotérmica por meio de soluções de perfusão mais adequadas e nefroprotetoras, bem como a diminuição dos efeitos tóxicos dos imunossupressores, têm sido o foco dos atuais ensaios clínicos e experimentais (MOERS et al., 2009). Para isso, torna-se fundamental o conhecimento detalhado dos mecanismos fisiopatológicos da injúria tecidual provocados pela isquemia e posterior reperfusão, como descritos a seguir.

1.1 Isquemia

A oferta de nutrientes e de sangue oxigenado por meio da perfusão de um órgão é necessária para a manutenção da função tecidual bem como para sua sobrevivência. Assim, a isquemia tissular é definida como sendo o fluxo arterial restrito ou insuficiente para manter as funções teciduais normais, por meio da diminuição da oferta de nutrientes tais como, glicose, oxigênio, proteínas, vitaminas, dentre outros, e o retardo na retirada dos seus respectivos metabólitos. Constitui um dos mais importantes problemas enfrentados pela medicina, incluindo o infarto agudo do miocárdio, a oclusão arterial aguda, a insuficiência vascular periférica, eventos decisivos na cirurgia cardíaca e no transplante de órgãos, entre outras (MAXWELL e LIP, 1997).

A isquemia resulta de uma alteração potencialmente reversível, caracterizada pela falta de aporte sanguíneo adequado (ABELA; HOMER-VANNIASINKHAM, 2003), que pode ser total, quando o fluxo arterial é insuficiente para manter a vida celular, ou parcial, quando mantém a viabilidade, mas com risco de evoluir para a morte celular dependendo da nobreza do tecido, do tempo de duração da isquemia, da demanda metabólica dos tecidos atingidos e da ausência de circulação colateral compensatória (BLANTZ et al., 2007; BULLDEY, 1987; KUSUNOKI et al., 2000; LONGO et al., 1995). Existem vários graus de isquemia os quais podem trazer diferentes consequências para o tecido, variando de simples adaptações teciduais ao novo nível de oxigênio (comum nas isquemias relativas e transitórias), passando por alterações funcionais manifestadas por degenerações (como a esteatose hepática), até quadros de morte celular.

A isquemia leva à hipóxia tecidual e ao metabolismo anaeróbico. A diminuição da fosforilação oxidativa leva ao consumo das reservas de ATP (trifosfato de adenosina) e interrupção de todas as funções celulares dependentes de energia (NETTO et al., 2001). A diminuição da energia celular resulta em distúrbios da bomba de sódio e potássio, acúmulo de metabólitos citoplasmáticos, incluindo aumento significativo do cálcio intracelular, NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), hipoxantina, lactato e consequente acidose metabólica. O cálcio intracelular ativa várias enzimas cruciais na produção de diversos mediadores inflamatórios (Al-QATTAN, 1998), e o acúmulo excessivo de metabólitos atua como carga osmótica intracelular, causando edema e dano na membrana citoplasmática (MAXWELL e LIP, 1997; PANG, 1990).

A hipoperfusão é considerada a principal causa pré-renal de insuficiência renal aguda (IRA), contribuindo para a ocorrência de aproximadamente 50% dos casos da doença. A IRA é caracterizada pela redução súbita da função renal, geralmente com queda de volume urinário e incapacidade renal de excretar metabólitos nitrogenados, assim como de manter a homeostase de fluidos e eletrólitos. Apresenta diversas etiologias, sendo as principais responsáveis, as causas pré-renais (queda da perfusão

renal) e a consequente necrose tubular aguda (NTA), (BOCK, 1998; KUSUNOKI et al., 2000).

A diminuição da perfusão renal, dependendo do tempo e da intensidade, causa diversas alterações bioquímicas, aumento desproporcional da uréia em relação à creatinina, edema e vacuolização das células tubulares, congestão medular e necrose (CHANDER; CHOPRA, 2006; LEMAY et al., 2000; SENER et al., 2006; SINGH; CHOPRA, 2004).

A necrose tubular aguda (NTA) representa a característica mais marcante do dano renal isquêmico, embora seja passível de recuperação completa graças à capacidade de regeneração das células tubulares (LEMAY et al., 2000; TORRAS; CRUZADO; GRINYO, 1999). O tratamento da NTA engloba medidas de suporte clínico e pode consistir na substituição da função renal pela diálise se a falência for grave. Não há terapia específica para se acelerar a recuperação e, apesar da reversibilidade da NTA em muitos pacientes que sobrevivem, a taxa de mortalidade da insuficiência renal permanece elevada, variando de 35 a 53% dependendo das comorbidades associadas (ORTIZ et al., 2003; BALBI et al., 2005).

Fisiologicamente, um evento importante é a perda da polaridade celular. A depleção do gradiente energético celular provoca rápida perda de polaridade nas células tubulares proximais. Estudos bioquímicos, histoquímicos, imunohistoquímicos e por imunofluorescência demonstram que a depleção do ATP intracelular provoca a rápida redistribuição da Na-K-ATPase (bomba de sódio-potássio) na membrana apical das células tubulares, sendo esta enzima essencial para a reabsorção de sódio, e que normalmente se encontra acoplada em um complexo de actina/citoesqueleto (MOLITORIS, 1991).

Histologicamente, os achados mais evidentes da isquemia são o edema, vacuolização celular e, nas células do epitélio tubular proximal, as alterações na "borda em escova" com perda da polaridade celular e alterações do citoesqueleto, lesões relacionadas, por exemplo, à poliúria pós-transplante, devido à redução da área disponível para absorção hídrica (ROSE; RENNKE, 1999; SPENCER et al., 1991; YU, 1998). No entanto, o edema celular não é um evento fatal para o tecido renal, sendo fase

reversível do processo de isquemia celular. Achados histológicos de dano celular irreversível, tais como em outros tipos de tecidos, classicamente são caracterizados por picnose nuclear, calcificações mitocondriais, e ruptura da membrana citoplasmática. Alguns destes processos podem ser relacionados à apoptose (morte celular programada), sendo o desaparecimento completo da célula uma opção para facilitar sua reposição através da divisão de células adjacentes.

O achatamento do epitélio tubular também pode ser observado, o qual provoca descamação das células epiteliais que caem na luz do túbulo causando obstrução e dilatação, contribuindo assim para a diminuição do ritmo de filtração glomerular (RACUSEN et al., 1991).

O aparecimento da necrose cortical irreversível pode ocorrer na vigência de isquemia grave, particularmente se o processo fisiopatológico incluir coagulação microvascular, como nas complicações obstétricas, nos acidentes ofídicos e na síndrome hemolítico-urêmica (ZAAK et. al., 2002).

A morte celular ocasionada pela lesão isquêmica é um processo complexo induzido de dois modos: apoptose e necrose. Contudo, é difícil determinar o modo da morte celular, pois somente a ausência da célula tubular é notada. A contribuição relativa dos dois mecanismos para a perda inicial da célula tubular é incerta, e pode depender da gravidade do insulto (ORTIZ et. al., 2003).

A apoptose, morte celular programada, é um mecanismo fisiológico de remoção de células envelhecidas, danificadas ou anormais. É iniciada por uma endonuclease e caracterizada pela fragmentação do DNA em múltiplos pares de bases. Células apoptóticas são ingeridas por macrófagos ou por células vizinhas sem a liberação de enzimas proteolíticas, processo não acompanhado de inflamação (KROEMER; DALLAPORTA; RESCHE-RIGON, 1998; SAVILL, 2000; TORONYI et. al., 2001).

Em contraste, a necrose é um processo patológico que afeta uma população de células e resulta na destruição focal tecidual, inflamação e geralmente sérias consequências sistêmicas (BREZIS, 1993; GOMES, 1999; GUELER et al., 2004; KROEMER; DALLAPORTA; MUHLBACHER et al., 1999; RESCHE-RIGON, 1998).

A restauração da função renal após lesão isquêmica aguda depende da regeneração funcional e estrutural dos túbulos renais. Células tubulares se proliferam e migram para as áreas expostas da membrana basal, reestabelecendo um novo epitélio. Vários fatores de regulação, como o TGF- β (fator transformador de crescimento - beta), são responsáveis pela restauração da estrutura tubular que sucede a lesão isquêmica (BASILE et al., 1996), processo pode durar aproximadamente seis semanas. Entretanto, dependendo da duração e da gravidade da isquemia, essa restauração pode ser indefinidamente prolongada e levar a um estado de irreversibilidade se houver destruição da membrana basal da célula tubular, causando morte celular e fibrose (AZUMA et al., 1997).

Quando se utiliza órgãos provenientes de doadores falecidos, a função precoce do enxerto irá depender da lesão celular ocorrida durante o período de isquemia. As consequências da lesão isquêmica aguda no rim transplantado podem ter implicações graves que se manifestam por meio do retardo na recuperação da função do enxerto, o qual permanece como um problema clínico significativo, caracterizado pela necessidade de diálise nas primeiras semanas após a cirurgia, por diversas alterações laboratoriais (McLAREN et al., 1999), tempo de internação prolongado, várias avaliações por métodos de imagem, biópsias adicionais, e correções do esquema de imunossupressão. Além disso, o retardo da função renal pode iniciar um processo “programado de nefropatia” do enxerto que leva às alterações crônicas, diminuindo a massa renal funcionante (TILNEY et al., 1998).

O tempo de isquemia fria também está fortemente associado, com aumento de 23% do risco de retardo da recuperação da função renal para cada 6 horas de isquemia fria (OJO et al., 1997). Vários autores sugerem que o tempo de isquemia fria seja um fator independente para o prognóstico do enxerto a médio e longo prazo e deveria ser idealmente, menor que 24 horas, principalmente se não for utilizada a bomba de perfusão (RAMASWAMY et al., 2002).

1.2 Lesão Celular na Reperfusão

A reperfusão de áreas isquêmicas, em particular a readmissão do oxigênio, pode contribuir para o dano tecidual denominado lesão de reperfusão. Esta lesão causa no órgão um dano maior que o gerado pela isquemia (ABELA; HOMER-VANNIASINKHAM, 2003; MAXWELL; LIP, 1997). As consequências da lesão originada pela isquemia/reperfusão (I/R) na função de um determinado órgão dependem da duração da isquemia, da temperatura e da natureza do órgão (TORRAS; CRUZADO; GRINYO, 1999). O transtorno do metabolismo energético causado pela restrição de oxigênio e nutrientes, associado ao acúmulo de resíduos do catabolismo, exigirá do tecido uma grande capacidade de adaptação como a transição aeróbica – anaeróbica – aeróbica do metabolismo da glicose. A manutenção das suas funções dependerá também das lesões de reperfusão, ou seja, a passagem pelas novas desordens produzidas pelo retorno do suprimento sanguíneo (CARDEN; GRANGER, 2000).

Como já mencionado, o tempo de interrupção do fluxo sanguíneo, a intensidade, a natureza do órgão, a temperatura a que está submetido o tecido e até o tipo de anestesia utilizada, são fatores que determinarão os diferentes graus de lesão celular. Estas lesões são decorrentes da diminuição das reservas energéticas de ATP e glicose, com produção de lactato e acidose. O ATP é degradado em AMP (monofosfato de adenosina) e em seguida transformado em hipoxantina. Com o aumento do cálcio intracelular, ocorre ativação de proteases intracelulares, como por exemplo, a xantina-oxidase que durante a reperfusão oxida a hipoxantina em xantina com a formação de radicais livres (H_2O_2 e superóxidos). O H_2O_2 reage com o ferro livre que se encontra aumentado durante o processo de metabolismo anaeróbico, formando o radical hidroxil, extremamente reativo e lesivo para a membrana celular (PINCEMAIL et al., 2000), aumentando sua permeabilidade com piora do edema, acúmulo de metabólitos tóxicos gerados durante o período isquêmico.

Em uma etapa posterior, observa-se a exacerbação do quadro pela disseminação das substâncias tóxicas acumuladas ou recém-

produzidas, aumento da permeabilidade celular aos íons, e pelas tentativas de restauração do pH após período de acidose decorrente da produção de ácido láctico (BALAKIREV; ZIMMER, 1998; ÉVORA et. al., 1998; HEIJNEN et al., 2001; JABLONSKI et al., 1983; PELKEY et al., 1992).

Pesquisas têm avaliado o envolvimento dos radicais livres na lesão endotelial e ativação de neutrófilos, como elementos da insuficiência microcirculatória que se segue após a isquemia (BECKMAN et al., 1990; HELLBERG et al., 1990; OSSWALD; SCHNERMANN, 2011; SCHULMAN et al., 1991; YOKOYAMA et al., 1990). Estes agentes oxidantes são capazes de danificar estruturas celulares importantes, particularmente a molécula de DNA que pode ser oxidada e sofrer danos irrecuperáveis que levam à morte celular em consequência da apoptose ou necrose (VANNUCCHI; IGLESIAS; MORANDI, 1998).

A reperfusão inicia um processo inflamatório não imune que aparece aproximadamente 24 horas após a instalação da isquemia, coincidindo com o surgimento da NTA (BONVENTRE; ZUK, 2004), mas que se acentua na fase de regeneração dos túbulos após a reperfusão. Corresponde a um infiltrado onde predominam os leucócitos mononucleados que promovem aumento dos níveis de reação imunológica no receptor (GEDDES et al., 2002; ROSE; RENNKE, 1999; TILNEY et. al., 1997). A reperfusão pode aumentar também a lesão isquêmica uma vez que promove a liberação de várias citocinas, que estimulam a expressão de moléculas de adesão (ICAM – moléculas de adesão intracelular), particularmente as selectinas, que ativam a adesão de leucócitos ao endotélio vascular, aumentando a inflamação. Os leucócitos aderidos liberam radicais livres e mediadores inflamatórios, incluindo fatores de ativação plaquetários e leucotrienos (GOES et al., 1995; TILNEY et al., 1997).

As ICAM parecem ser determinantes no desenvolvimento da IRA isquêmica potencializando as interações entre neutrófilos e células endoteliais. O mecanismo que explique a lesão isquêmica pelos leucócitos aderidos parece envolver a liberação de substâncias vasoconstritoras potentes (leucotrienos, tromboxanos, PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas), bem como a lesão direta da célula endotelial que está

comumente associada com a liberação de endotelina e uma redução do NO (óxido nítrico), favorecendo a vasoconstrição (LIEBERTHAL, 1997; THADANI et al., 1996).

A mitocôndria é considerada um dos principais alvos da denominada injúria de reperfusão (GOBE; CRANE, 2010). Têm sido reportadas, em diferentes sistemas experimentais de I/R após preservação hipotérmica (BARTELS-STRINGER et al., 2003) e na cadeia respiratória mitocondrial (GONZÁLEZ-FLECHA e BOVERIS, 1995), alterações estruturais (FERREIRA et al., 1989; HALESTRAP, 1991) e funcionais (MITTNATCH, SHERMAN e FARBER, 1979; HENKE e NICKEL, 1992). Essas lesões entre outros fatores, decorrem da depleção das reservas energéticas de ATP e glicose, da acidose (produção de lactato), e da ativação de proteases intracelulares (MARZZOCO; TORRES, 1990). A ativação enzimática e a presença de novas enzimas podem desencadear novas reações levando à formação de produtos de difícil degradação ou tóxicos para as células, como é o caso dos radicais livres (VANNUCCHI; IGLESIAS; MORANDI, 1998). Estes agentes oxidantes ou espécies reativas do oxigênio são capazes de danificar estruturas celulares importantes como membranas (peroxidação lipídica da membrana celular), proteínas, macromoléculas não protéicas (despolimerização de mucopolissacarídeos ácidos), lipídios e, particularmente, a molécula do DNA (MURPHY, 2009; PERALTA et al., 1997) que uma vez oxidada, pode sofrer danos irreversíveis que levam à morte celular (CECCHI, 1996).

O ADP (difosfato de adenosina) e o AMP, produtos de hidrólise do ATP, são encontrados no citosol (material coloidal e semi-fluído que preenche o citoplasma), no núcleo e nas mitocôndrias, onde o aproveitamento máximo de energia química depende do oxigênio e ocorre através do catabolismo de reações de óxido-redução, acompanhado da transferência de energia por meio das coenzimas NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídeo - oxidada) e FAD (flavina adenina dinucleotídeo) e das forças redutoras ligadas a átomos de hidrogênio (GILL e WILCOX, 2006). Durante o período de isquemia, há rápida perda da atividade mitocondrial, em função da depleção do oxigênio e dos danos às enzimas necessárias ao

transporte de elétrons. O tempo prolongado de isquemia resulta na formação de concentrações elevadas de adenosina e hipoxantina, que se difundem rapidamente através da membrana plasmática, reduzindo as reservas de adenina utilizada na ressíntese de nucleotídeos durante a reperfusão (FINN, 1990).

Portanto, a lesão celular causada pela isquemia é um processo bifásico, uma vez que a isquemia inicia a lesão por meio da privação da energia necessária para a manutenção do gradiente iônico e da homeostase celular, enquanto a reperfusão agrava esta lesão ativando reações inflamatórias envolvendo radicais livres de oxigênio, fatores endoteliais e atrapalha o balanço que mantém a homeostase na microcirculação por atração, ativação, adesão e migração de neutrófilos causando a destruição tecidual local por meio de proteases e radicais livres de oxigênio (CLAVIEN; HARVEY; STRASBERG, 1992).

Além disso, ocorre redistribuição inadequada do fluxo na rede vascular durante a reperfusão, por causas locais ou à distância, em consequência do fenômeno inflamatório desencadeado. O baixo fluxo tecidual favorece a disfunção da microcirculação com degeneração do endotélio, alteração da função de relaxamento das arteríolas, adesão de leucócitos às paredes capilares e extravasamento de plasma com saída de leucócitos através das vênulas.

A vasoconstrição resultante agrava a lesão endotelial e produz mais adesão celular, perpetuando o processo isquêmico ou mantendo-o até que os vasos e o fluxo sanguíneo sejam restaurados, ou que haja necrose celular. A lesão do endotélio promove trombose vascular, principalmente na microcirculação, agravando a isquemia por meio da má distribuição do fluxo e estimulando a fase inflamatória através da ação dos leucócitos que, ao se empilharem nos vasos, contribuem para o aumento da pressão nos capilares, favorecendo o aparecimento do edema e agravando a hipóxia tecidual (ÁLVAREZ et al., 2004; CARDEN; GRANGER, 2000; ÉVORA et al., 1998; RAW; HO, 1999).

Assim, o dano de I/R é a causa mais comum de retardo funcional do transplante renal e está associado ao comprometimento

funcional no longo prazo e à sobrevida do transplante, sendo a maior causa de lesão renal aguda (CHEN et al., 2007). Apesar das inúmeras pesquisas realizadas, dúvidas, no mecanismo de necrose celular causada pela reperfusão, permanecem, em função das constatações relacionadas às alterações vasculares (vasoconstrição e trombose na microcirculação) subsequentes à isquemia, como fatores desencadeantes do dano celular (ÁLVAREZ et al., 2004; CARDEN; GRANGER, 2000; ÉVORA et al., 1998; RAW; HO, 1999).

1.3 Foto detecção por Fluorescência e Espectroscopia

A descoberta da fluorescência é atribuída a Nicolás Monardes (1577), um médico e botânico espanhol que descreveu o surgimento da opalescência azul a partir de água e da madeira de uma pequena árvore mexicana (*Lignum Nephriticum*). Em 1640, o padre jesuíta alemão Athanasius Kircher observou que a luz que atravessava a infusão aquosa desta madeira apresentava cor amarelada, enquanto a luz refletida por esta solução tinha coloração azulada. Mais tarde Robert Boyle (BOYLE, 1644) investigou este fenômeno mais profundamente, descobrindo que a adição de um ácido abolia tal cor, enquanto a adição de uma base permitia restaurá-la. Assim, Boyle foi o primeiro a utilizar a fluorescência como indicador de pH.

Entende-se por fluorescência a propriedade que algumas substâncias possuem, as quais, após serem excitadas com radiação de baixo comprimento de onda, emitem radiação com comprimento de onda maior. Desta forma, tais substâncias absorvem a energia da luz ultravioleta (UV) e emitem em seguida, radiação dentro do espectro de luz visível.

A foto detecção por fluorescência vem sendo apontada como uma técnica alternativa para a diferenciação dos tecidos biológicos, não apenas para o diagnóstico de lesões tumorais, como também para a investigação de alterações no estado metabólico das células (ZULUAGA et al.,

1999; GEORGAKOUDI et al., 2002; MÜLLER et al., 2003; TSAI et al., 2003; WANG et al., 2003).

Quando um material é foto-excitado, a energia recebida na forma de fótons faz com que os elétrons sejam transferidos de uma camada de menor energia para uma de maior energia. Esse estado não é estável e os elétrons excitados decairão retornando à camada de menor energia em seguida, liberando o excesso de energia. Uma das formas permitidas do processo de decaimento é um fenômeno radioativo denominado fluorescência, ou seja, a reemissão de fótons (LAKOWICZ, 1999; RAMANUJAM, 2000; GEORGAKOUDI et al., 2003).

A espectroscopia de fluorescência é baseada na detecção dos fótons emitidos por espécies fluorescentes quando excitadas a partir de uma fonte de fótons de energia bem conhecida, em geral o laser, devido a uma de suas principais características: a monocromaticidade – característica de uma fonte que emite fótons com comprimento de onda bem determinado.

As moléculas em estados excitados que surgem devido à absorção de um fóton são pouco estáveis energeticamente, e por isso tendem a liberar a energia absorvida novamente na forma de fótons. Portanto, quando a fluorescência ocorre, a energia do fóton liberado pelas moléculas é menor que a dos fótons absorvidos e, conseqüentemente, seu comprimento de onda é maior que o dos absorvidos (LAKOWICZ, 1999; RAMANUJAM, 2000; GEORGAKOUDI et al., 2003).

Segundo Lakowicz, uma vez que o espectro de emissão resultante da fluorescência reflete os níveis vibracionais dos estados eletrônicos fundamentais das moléculas excitadas, é possível empregar determinados espectros de emissão para a caracterização e identificação de certas moléculas (LAKOWICZ, 1999; GEORGAKOUDI et al., 2003).

Nas ciências dos materiais, a espectroscopia de fluorescência é bastante utilizada para a determinação de composições químicas, o que é possível uma vez que cada composto químico tem uma fluorescência característica relacionada com o comprimento de onda de excitação. Num material cristalino ou num meio transparente, é possível quantificar a concentração de um dado composto que dele faça parte, posto que a

intensidade de fluorescência é diretamente proporcional à quantidade do composto investigado no material ou meio, desde que não sejam atingidas as condições de saturação do sistema (SINGH e RAI, 2011). Entretanto, fazer o mesmo em meios turvos, como é o caso dos tecidos biológicos, é extremamente mais complicado, visto que tanto a luz da excitação quanto a da fluorescência sofrem a influência de variados efeitos físicos decorrentes da própria constituição e estrutura desses tecidos (BISWAL, 2003; GEORGAKOUDI, 2006; ISHIMARU, 1989; MÜLLER, 2001; RAMANUJAM, 2000; WU et al., 1993; ZHANG, 2000).

No tecido biológico, onde a complexidade química e estrutural é bem maior, a avaliação passa a ser bastante difícil. Os tecidos possuem imensa quantidade de moléculas que interagem diferentemente com a luz, sendo tais moléculas denominadas cromóforos. Os cromóforos presentes no tecido biológico são de três tipos principais: fluoróforos (grupos químicos que podem converter a luz absorvida em fluorescência), os absorvedores (grupos químicos que absorvem a luz e não produzem fluorescência) e espalhadores (estruturas que alteram a direção do fóton incidente, mas conservam sua energia). As propriedades ópticas de cada cromóforo dependerão do comprimento de onda de excitação e do tipo de tecido, uma vez que a maioria dos cromóforos é sensível ao ambiente em que se encontra, e em particular ao estado metabólico tecidual (GEORGAKOUDI et al., 2003; LAKOWICZ, 1999; RAMANUJAN, 2000).

Os tecidos biológicos são opticamente turvos e, em decorrência disso, os fenômenos de espalhamento e absorção têm maior probabilidade de ocorrer do que a conversão em fluorescência. Uma luz monocromática incidente na superfície do tecido perde intensidade (devido aos compostos absorvedores) e percorre um caminho tortuoso, difícil de ser previsto (devido ao efeito dos cromóforos espalhadores). Parte da fluorescência poderá ser absorvida por cromóforos absorvedores presentes no tecido (sendo a hemoglobina a principal nos tecidos biológicos), o que acaba modificando a intensidade de fluorescência observada; às vezes, chega mesmo a mascarar a existência de fluorescência em dadas regiões, podendo ser observado como depressões ou vales na representação do espectro.

Assim, a fluorescência reemitida detectada na superfície tecidual é resultado da contribuição não apenas dos fluoróforos, mas também dos absorvedores e espalhadores teciduais (GEORGAKOUDI et al., 2003; RICHARDS-KORTUM et al., 2003).

Além da composição química, outro fator relevante para a fluorescência é a arquitetura do tecido alvo e suas características ópticas, alterando a interação luz/tecido. Assim, a razão para a eficácia da biópsia óptica, é a de que a lesão, diferindo do tecido normal em composição química e em arquitetura, produzirá uma fluorescência distinta, possibilitando a discriminação dos tecidos.

A utilização de sistemas a laser para excitação do tecido a ser investigado pode ser interessante, uma vez que a monocromaticidade possibilita maior seletividade de excitação dos fluoróforos tornando o processo mais eficiente e, portanto, mais evidente a sua identificação. A região mais usada para excitação de tecidos biológicos é a região ultravioleta (UV) do espectro eletromagnético visível – violeta, azul e verde – com fótons de alta energia e elevada absorção pelos tecidos biológicos. A profundidade de penetração no tecido biológico é maior, quando comparado aos materiais não biológicos. Dependendo da luz de excitação empregada, a absorção pelos componentes teciduais será diferente e conseqüentemente haverá a contribuição de biomoléculas distintas para a fluorescência resultante.

Os principais fluoróforos endógenos são os nucleotídeos pirimídicos, os aminoácidos aromáticos, as proteínas estruturais e as porfirinas (RAMANUJAM, 2000; RICHARDS-KORTUM et al., 2003; WAGNIÈRES et al., 1998). DaCOSTA e colaboradores realizaram extenso estudo com a determinação das matrizes de emissão-excitação para os conhecidos e prováveis fluoróforos e cromóforos biologicamente relevantes (DaCOSTA et al., 2003).

A nicotinamida adenina dinucleotídeo é o principal receptor de elétrons, o anel nicotinamínico da sua forma reduzida (NADH) é fluorescente. A flavina adenina dinucleotídeo é outro importante receptor de elétrons, sua forma oxidada (FAD) é fluorescente. O NADH e as flavinas têm importante função no metabolismo energético da célula (DaCOSTA et al., 2003;

GEORGAKOUDI et al., 2003; RAMANUJAM, 2000; RICHARDS-KORTUM et al., 2003).

Dentre os aminoácidos aromáticos, o triptofano é o principal contribuinte da fluorescência emitida pelas proteínas, os outros são a tirosina e a fenilalanina. Para comprimentos de onda acima de 295 nm apenas o triptofano é excitado, sendo que sua emissão é sensível à polaridade do ambiente (DaCOSTA et al., 2003; GEORGAKOUDI et al., 2003; RAMANUJAM, 2000; RICHARDS-KORTUM et al., 2003;).

O colágeno e a elastina são as proteínas estruturais que contribuem para a fluorescência tecidual. A emissão está associada à presença das ligações cruzadas entre as cadeias de aminoácidos (DaCOSTA et al., 2003; GEORGAKOUDI et al., 2003; RAMANUJAM, 2000; RICHARDS-KORTUM et al., 2003). As porfirinas são comumente citadas especialmente na foto detecção de tecidos tumorais como um dos principais responsáveis pela fluorescência vermelha emitida. Isso pode ser explicado pela maior concentração das porfirinas em tecidos neoplásicos, em comparação com os tecidos normais (RAMANUJAM, 2000).

Lipopigmentos, produtos finais do metabolismo de lipídeos também são apontados como contribuintes da fluorescência dos tecidos biológicos (DaCOSTA et al., 2003; GEORGAKOUDI et al., 2003; RAMANUJAM, 2000; RICHARDS-KORTUM et al., 2003).

Os absorvedores que influenciam o espectro de fluorescência mensurado no tecido, na região ultravioleta (UV) e visível são as proteínas (não estruturais) e a hemoglobina, que podem absorver a fluorescência mascarando e minimizando a luz que será coletada da superfície tecidual investigada (GEORGAKOUDI et al., 2003).

O espalhamento da luz nos tecidos biológicos ocorre devido às heterogeneidades microscópicas dos índices de refração entre componentes extracelulares e celulares. O intenso espalhamento permite a propagação da luz visível de 0,5 a 1,0 mm dentro do tecido, e assim, a extração não invasiva de informação desse volume tecidual. A complexidade e variabilidade das estruturas celulares e dos componentes teciduais fazem com que seja muito

difícil prever o comportamento da luz no interior dos tecidos biológicos, e consequentemente da fluorescência produzida (GEORGAKOUDI et al., 2003).

A fluorescência pode ser utilizada para a obtenção de uma imagem ou então para avaliação espectroscópica. No primeiro caso, é possível a visualização macroscópica da lesão, e em algumas situações até a delimitação das margens com o tecido sadio adjacente (NAUTA et al., 1997; ONIZAWA et al., 1996; 2003; PATHAK et al., 1995). A imagem é obtida após a excitação do tecido com uma luz de comprimento de onda adequado e posteriormente coletada através de uma câmera com filtro, selecionando a região da fluorescência característica (RAMANUJAM, 2000; WAGNIÈRES et al., 1998).

A espectroscopia de fluorescência pontual (investigação feita em vários pontos da estrutura) permite análise mais detalhada da luz emitida, e usualmente utiliza um sistema composto por um laser de excitação, uma ponteira de aplicação para a entrega e coleta da luz e um monocromador. O contraste fornecido pela fluorescência é baixo, uma vez que outros fenômenos radioativos como o espalhamento e a absorção são muito mais evidentes. Além disso, as heterogeneidades nas propriedades ópticas do complexo tecido biológico ocasionam alta variabilidade da fluorescência. Isso é especialmente observado na espectroscopia pontual, onde o espectro de fluorescência resultante pode ser alterado dependendo da pressão exercida durante a leitura e consequente remoção momentânea do aporte sanguíneo, além dos efeitos de interface.

Na iluminação de uma grande área, como é o caso da fluorescência por imagem, a distorção pode ser decorrente das heterogeneidades da absorção e do espalhamento da luz no tecido alvo e a intensidade do sinal detectado dependerá da distância detector/superfície tecidual (WAGNIÈRES et al., 1998).

No transplante renal, os resultados variáveis do tempo de isquemia influenciam também na viabilidade dos órgãos, tanto nos casos de morte encefálica quanto por parada cardíaca. Órgãos transplantados com danos significativos pela isquemia no pré-transplante podem deixar o

receptor com uma ineficiente e inaceitável função do enxerto e afetar adversamente a sobrevida do mesmo.

Testes de resistência vascular, da perda enzimática das células, das flutuações eletrolíticas e outras alterações isquêmicas têm sido determinados para responder a questão da viabilidade do órgão potencialmente transplantável, mas infelizmente estes testes são impedidos pela preservação hipotérmica e pelas práticas clínicas. Assim, atualmente os métodos disponíveis para avaliar os danos da isquemia são limitados pelos métodos de preservação de hipotermia clínica (tempo para as análises laboratoriais).

A espectroscopia por fluorescência pode medir alterações no tecido ao quantificar diferenças das suas propriedades espectrais. Como vimos, o tecido é capaz de absorver, emitir e dissipar a luz em vários comprimentos de onda. Tais medidas podem ser realizadas rapidamente sem nenhuma manipulação do órgão, tais como biópsia ou fixação. Por não envolver testes enzimáticos e laboratoriais, as avaliações por espectroscopia óptica não sofrem interferências dos métodos de preservação hipotérmica e podem ser feitas em tempo real.

Investigadores têm usado as propriedades da fluorescência do NADH para avaliar as injúrias ocorridas durante a fase “ex vivo” de transplantes hepáticos e renais (RAMAN et al., 2009). Todos estes métodos envolvem análises que ocorrem durante ou após o transplante. Contudo, na prática clínica de órgãos transplantados, a janela de tempo ótimo para tomar as medidas da viabilidade do enxerto é durante a preservação hipotérmica. Nenhum método se encontra disponível para quantificar de modo confiável a isquemia ocorrida antes do transplante, em órgãos preservados hipotermicamente (HALL et al., 2011).

A lesão de I/R (isquemia/reperfusão) é um evento inevitável no transplante renal, com efeitos vistos tanto na função aguda do órgão transplantado quanto no longo prazo. Modelos animais, particularmente no rato, fornecem pesquisas úteis como ferramenta para o estudo da lesão de I/R e para avaliação de novos tratamentos (DELBRIDGE et al., 2007). O entendimento do processo de I/R é importante para se evitar ou se atenuar

as lesões não imunes dos órgãos transplantados (CARDEN e GRANGER, 2000).

Atualmente, visto que não há métodos completamente confiáveis e seguros para se avaliar os danos isquêmicos sofridos por um órgão antes do transplante propriamente dito, com exceção da biópsia de banco após a retirada do enxerto, torna-se justificável a utilização da técnica de espectroscopia de fluorescência induzida pelo laser, na tentativa de se avaliar a correlação entre os seus achados e o grau de lesão histológica renal experimental, uma vez que se trata de uma análise objetiva, não invasiva, rápida e em tempo real que, futuramente, pode colaborar como ferramenta importante para a aplicação nos transplantes renais em humanos.

2. OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Este trabalho foi delineado para tentar responder às seguintes questões:

1. Há correlação entre os dados da espectroscopia de fluorescência induzida pelo laser e alterações histológicas nas lesões de isquemia e reperfusão renal em ratos?
2. Existe diferença significativa na leitura da espectroscopia de fluorescência entre os polos superior, inferior e o terço médio dos rins em ratos?

3. MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP), em conjunto com o Grupo de Óptica do Instituto de Física da Universidade de São Paulo – São Carlos.

Durante todo o processo foram respeitadas as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), entidade filiada ao International Council of Laboratory Animal Science, visando manter sempre um procedimento ético em todas as etapas da pesquisa. Dentre estas normas destacam-se: os procedimentos envolvendo animais em experimentação devem evitar o desconforto, o estresse, a angústia, a dor e as más condições de confinamento e de alimentação; todos os procedimentos com animais que possam causar dor ou angústia precisam ser desenvolvidos com sedação, analgesia ou anestesia adequada; os animais que sofram dor ou angústia intensa ou crônica que não possam se aliviar e os que não foram utilizados devem ser sacrificados por método indolor e que não causem estresse (FLECKNELL, 1993; MORTON, 1990; SIMÕES, 1998).

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, registrado sob o número: 041/2010, (Anexo).

3.1 Animais

Foram utilizados para este experimento 33 ratos (*Rattus norvegicus*) albinos machos adultos da linhagem Wistar, com peso entre 200 e 250 gramas adquiridos do Serviço de Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), para a obtenção do espectro de fluorescência do tecido renal sadio com excitação de 408, 442 e 532 nm. Os animais foram alojados em seis gaiolas (3 gaiolas

com 6 animais cada, e 3 gaiolas contendo 5 animais cada) e mantidos num alojamento para animais em ambiente climatizado adequado, onde receberam água e ração comercial específica para roedores (Primor®) “ad libitum”. A temperatura do alojamento foi mantida entre 23° e 25° C.

Em todos os experimentos desta tese os animais foram submetidos a um período de 8 horas de jejum anteriores aos procedimentos, com livre acesso à água. Foram em seguida pesados e anestesiados através da administração intraperitoneal de thiopental a 20 unidades/100g de peso. Em cada animal foi realizada uma incisão abdominal mediana para o acesso inicial aos rins que foram expostos com pinças anatômicas delicadas e gazes de algodão embebidas em solução fisiológica (Figura 1).

Os animais utilizados foram sacrificados pela administração de dose letal de anestésico (thiopental).

Nota. As regiões renais dos ratos foram citadas como pólo superior, inferior e terço médio por motivos didáticos e habituais em analogia aos rins de humanos, mesmo sabendo que, sendo o rato um animal quadrúpede, os termos corretos seriam pólo cranial, caudal e terço médio.

Figura 1 - Acesso transperitoneal do rim esquerdo; incisão abdominal mediana

3.2 Grupos experimentais

Após anestesia, os animais foram transferidos para uma canaleta de madeira contendo serragem para evitar hipotermia. O ar condicionado da sala de cirurgia experimental permaneceu desligado durante todo o procedimento. Os ratos foram colocados em decúbito dorsal e por meio de laparotomia mediana longitudinal o rim esquerdo foi identificado. Em seguida, os rins esquerdos (dos 33 animais) foram submetidos à detecção da espectroscopia de fluorescência do córtex, sendo a ponteira do laser de excitação colocada sobre os pólos superiores, inferiores e terços médios dos rins, constituindo o grupo controle (GC), autofluorescência. As excitações foram geradas por feixes de lasers cujos comprimentos de onda foram de 408, 442 e 532 nm.

Em seguida os pedículos vasculares renais esquerdos foram dissecados, isolados (Figura 2) e clampeados (Figura 3) com o auxílio de mini-pinça vascular de aço inoxidável, atraumática do tipo “bulldog” apropriada para uso em microcirurgia vascular.

Os animais foram então divididos aleatoriamente em três grupos experimentais de acordo com os tempos de isquemia: G1, G2 e G3 com 30, 60 e 120 minutos de isquemia quente, respectivamente. Foi constituído também um grupo para controle histológico (GCH), contendo quatro rins contralaterais (não isquêmicos) selecionados aleatoriamente dentre os 33 animais (Tabela 1).

Tabela 1 - Relação entre o tempo de isquemia e o número de rins avaliados pela espectroscopia de fluorescência

Grupos	Tempo de Isquemia (Minutos)	Número (Rins)
GC	0	33
G1	30	11
G2	60	10
G3	120	12
GCH*	0	04

*Grupo para Controle Histológico (GCH) com 04 rins contralaterais escolhidos aleatoriamente dentre os animais do experimento

A ocorrência de isquemia imediata do órgão foi caracterizada tanto pela mudança de coloração como pelo desaparecimento do pulso da artéria renal à jusante ao pinçamento.

Figura 2 - Identificação, dissecação e isolamento do pedículo renal

Figura 3 - Clampeamento do pedículo renal esquerdo (isquemia)

Durante o período de isquemia específico para cada grupo, os rins foram novamente submetidos a leituras corticais nos polos (superior e inferior) bem como no terço médio, utilizando feixes excitatórios de lasers com os mesmos comprimentos de onda de 408, 442 e 532 nm (Figura 4). Em todos os grupos, novas leituras foram realizadas após 5 minutos de reperfusão completa, observando-se retorno do pulso da artéria renal, perviedade da veia renal e reperfusão completa e uniforme do rim com retorno da coloração inicial (Figuras 5 e 6), utilizando-se os mesmos lasers de excitação, nas mesmas regiões renais. Posteriormente os rins esquerdos foram coletados e enviados para estudo histológico.

Do total de animais, quatro foram escolhidos aleatoriamente para serem submetidos à nefrectomia contralateral, sendo tais rins utilizados para estudo histológico (grupo para controle histológico - GCH) com tempo de isquemia quente igual a zero.

Todos os animais foram sacrificados com administração de dose letal de anestésicos (thiopental) imediatamente após a coleta dos rins.

Figura 4 - Aplicação do laser durante a fase de isquemia

Figura 5 - Liberação do pedículo renal e início da reperfusão

Figura 6 - Aplicação laser após reperfusão completa do córtex renal

apresentem três extremidades ou vias. Uma das fibras ópticas (chamada fibra de “entrega” ou excitação com 110 μm de diâmetro) é acoplada à saída do laser conduzindo a luz do laser até uma segunda extremidade que chega ao alvo da investigação (ponteira ou caneta) (Figuras 8a e 8b).

Figuras 8 - Mostrando a sonda em “Y” com os trajetos percorridos pela luz (a), e o detalhe da caneta emitindo o laser (b) de 532 nm (verde).

Esta extremidade do dispositivo, além da fibra de excitação, possui seis outras fibras dispostas ao seu redor (cada uma com 100 μm de diâmetro), que coletam toda a luz originada do tecido de investigação (alvo) e a conduz até a terceira extremidade, que reúne as seis fibras de coleta conectando-as ao espectrofotômetro.

O espectrofotômetro possibilita a análise entre os comprimentos de onda 378 nm e 842 nm do espectro eletromagnético, avaliando a intensidade de luz para cada comprimento de onda emitido. Na entrada do espectrofotômetro, onde a luz é coletada, há um conjunto de filtros. Um dos filtros é selecionado de forma a minimizar a quantidade de luz retroespalhada de mesmo comprimento de onda que o da excitação. A rede de difração, com dimensões de 36 x 36 mm^2 , possui 300 sulcos/mm e forma o espectro em um campo plano de 12 mm de largura. O fotodetector multicanal é constituído por um dispositivo de carga acoplada (Charge-Coupled Device – CCD) que é um sensor para captação de imagens com arranjo linear e utiliza, neste sistema, 970 detectores de silício. Disso resulta

uma resolução espectral de 0,5 nm. Os programas utilizados para a aquisição dos dados foram o *Light-View-Med* (LVM.exe), juntamente com o *Origin-Lab* (8.Ink) para armazenamento e produção dos gráficos.

Para cada variedade de espectro obtida por este sistema, foram calculadas eletronicamente médias entre o número de aferições, na forma de espectros gráficos em valores específicos de intensidade de captação para determinados comprimentos de ondas de emissão, com a demonstração gráfica dos resultados obtidos (MELO et al., 2004).

3.4 Fluorescência das substâncias endógenas

De modo geral, o equipamento utilizado para a leitura analisa espectros de fluorescência de 13 cromóforos endógenos presentes no tecido renal, sendo eles: urina, biotina, hemoglobina, colesterol, FAD, flavina mononucleotídeo, NADH, NADPH, 1-prolina, fosfato piridoxal, ácido piridóxico, piridoxina e riboflavina. Estes espectros foram obtidos a partir do artigo de Ralph S. DaCosta (2003), que identificou as matrizes de excitação-emissão (Excitation-Emission Matrices - EEM) de vários compostos fluorescentes relevantes para as técnicas de espectroscopia tecidual.

Os espectros de fluorescência destes cromóforos foram determinados a partir de valores de emissão quando excitados com laser de 440 nm (comprimento de onda de excitação – λ_{ex} – mais próximo do valor utilizado na obtenção do espectro de tecido renal utilizado neste experimento – 442 nm – dentre os obtidos para as matrizes).

Das EEM, foram coletadas as emissões para comprimentos de onda de excitação (λ_{ex}) de 408, 442 e 532 nm, no terço médio e pólos renais superiores e inferiores, o que resultou em 27 valores de λ_{em} (comprimento de onda emitida) em cada animal (3 aferições em cada terço renal, com três comprimentos de onda de excitação diferentes; aferições estas com fluxo sanguíneo normal (autofluorescência), isquêmico e durante a fase de reperfusão). Uma vez que se utilizou 13 cromóforos, tem-se uma matriz de 27 x 13 (27 linhas correspondentes aos λ_{em} versus 13 colunas

correspondentes aos cromóforos renais) à qual deu-se o nome de Matriz de Emissão para os Fluoróforos (matriz M). Esta matriz é multiplicada por uma Matriz de Coeficientes (C), os quais são responsáveis por dar pesos matemáticos à contribuição de cada cromóforo à fluorescência para um dado comprimento de onda de excitação (λ_{ex}). Assim, temos 13 linhas representando cada cromóforo (tissular renal) e uma coluna representando um único coeficiente por cromóforo – constituem a matriz de coeficientes C (Figura 9).

Esta matriz-emissão resultante, denominada Espectro de Fluorescência do Rim de Rato – matriz E – é uma matriz 1 x 27, com a coluna representando um único valor de intensidade para cada uma das 27 linhas as quais representam por sua vez, as emissões do tecido renal em cada λ_{em} (comprimento de onda de emissão) considerado.

Figura 9 - Representação dos espectros de emissão de fluorescência e dos coeficientes de contribuição para obtenção do espectro do tecido renal. (Modificada da Dissertação de Mestrado – José Dirceu Vollet Filho – Física da USP de São Carlos, 2007).

Os rins foram investigados em três regiões: os pólos superiores e inferiores bem como o terço médio dos rins, nas seguintes fases: fluxo normal (autofluorescência), isquemia renal de 30, 60 e 120 minutos e suas respectivas fases de reperfusão (5 minutos após a liberação dos pedículos renais), utilizando laser de excitação com comprimentos de ondas variáveis (λ_{ex} : 408, 442 e 532 nm).

A ponteira de aplicação, protegida com um filme transparente de PVC (policloreto de vinila) substituído a cada animal, foi posicionada em contato, o mais perpendicularmente possível na superfície do tecido renal. Foram coletadas nove leituras pontuais para cada região, suficientes para cobrir áreas relevantes do parênquima renal de interesse (Figura 10). Entre uma região e outra, a ponteira foi higienizada com solução de água oxigenada e cloreto de sódio 0,9%, sendo posteriormente seca com gaze de algodão antes da nova leitura. A sonda foi posicionada em leve contato com a superfície do tecido, sem exercer pressão para se evitar alterações na microcirculação local, e consequentes variações na quantidade de hemoglobina presente no tecido. Além disso, o posicionamento delicado na superfície possibilitou uma melhor excitação e coleta da luz reemitida pelo tecido alvo.

Figura 10 - Ponteira do Laser (532 nm) sendo aplicada no córtex renal do rato (autofluorescência)

Neste trabalho, os comprimentos de onda da luz de excitação do laser utilizados foram de 408 nm (azul-violeta), 442nm (violeta) e 532nm (verde), e o laser utilizado numa potência de 7 mW, insuficientes para causarem reação térmica no tecido alvo. A sonda óptica foi posicionada de maneira a ficar em leve contato perpendicular com o tecido para diminuir as perdas por reflexão. Sabe-se que a cápsula renal do rato tem entre 10 e 25 μm de espessura, e o laser de excitação de 335 nm de comprimento de onda, por exemplo, penetra apenas 100 μm (0,1 mm) de profundidade no córtex renal (DEMOS, 1997), mas o suficiente para avaliação glomerular, objetivo também das biópsias renais por punção ou a céu aberto (BAGNATO, 2006).

O espectro resultante foi obtido pela média das leituras em cada uma das três regiões renais, representando o padrão gráfico e a intensidade da fluorescência para o período de isquemia e reperfusão estudados, considerando os três diferentes comprimentos de onda (*lasers* de excitação) empregados.

3.5 Análise Histológica

A análise histopatológica foi realizada em 37 rins sendo quatro do grupo de controle histológico (GCH), e 33 rins pertencentes aos grupos experimentais (G1, G2, G3). Para os animais do GCH, o rim direito foi coletado após laparotomia mediana abdominal, enquanto para os animais dos grupos (G1, G2, G3) o rim esquerdo foi coletado após o respectivo período de isquemia e reperfusão de aproximadamente cinco minutos.

Os rins foram seccionados longitudinalmente através do hilo em duas metades e imersos em solução tamponada de formol a 10%, para a fixação, durante 24 a 48 horas (Apêndice A).

As colorações utilizadas foram a Hematoxilina & Eosina (HE) e a coloração especial de Tricrômico de Masson, para observar individualmente os constituintes do tecido renal (túbulos, glomérulos, tecido conjuntivo e vasos sanguíneos).

As lesões das células tubulares proximais foram graduadas de acordo com a classificação proposta por Goujon et al. (1999), modificada segundo a graduação de BANFF (SOLEZ, 2007). O método de avaliação foi baseado em sete padrões morfológicos básicos típicos das lesões tubulares proximais (vacuolização do citoplasma apical, necrose tubular, dilatação tubular, descolamento das células, integridade da borda em escova, edema intracelular e desnudamento da membrana basal) graduados em cinco escalas de pontuação: 1 (nenhuma anormalidade), 2 (lesões brandas em até 10% do tecido renal), 3 (lesões afetando entre 10 e 25% do tecido renal), 4 (lesões acometendo de 25 a 50% do tecido renal), 5 (lesões em mais de 50% do tecido renal estudado).

3.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o software GraphPad PRISM – version 4.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA).

As variáveis contínuas foram comparadas utilizando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparações múltiplas de Dunn's, enquanto as associações entre parâmetros foram analisadas pelo teste de regressão linear. Como tais variáveis não apresentaram distribuição Normal utilizou-se a transformação logarítmica (log10), que resultou em variáveis com distribuição Normal (teste de Kolmogorov-Smirnov).

Para a análise da lesão renal foi utilizado o teste One-Way Anova, (Análise de Variância) com Medidas Repetidas Multifatoriais com o ajuste de Greenhouse-Geisser devido à falta de esfericidade e com pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni.

Como a variável “graduação patológica” não apresentou distribuição Normal (teste de Shapiro-Wilk) utilizou-se a correlação não-paramétrica de Spearman para verificar a relação entre ela e as demais variáveis.

Um nível de $p < 0,05$ foi aceito como indicativo de significância estatística.

4. RESULTADOS

4 RESULTADOS

Inicialmente, para se validar o método de espectroscopia de fluorescência empregado, foi realizada a análise estatística entre a média das leituras gráficas obtidas durante as fases de autofluorescência, isquemia e reperfusão renal (Figura 11).

Figura 11 Gráficos das médias das fluorescências renais - autofluorescência (AUTO), isquemia (ISQ) e reperfusão (REP) obtidas, independente do comprimento de onda do laser de excitação

Caso os gráficos da espectroscopia não revelassem diferença estatística significativa entre as fases (autofluorescência, isquemia e reperfusão), o trabalho, por si só, não estaria justificado. Houve, porém, diferença estatística significativa ($p < 0,001$), pelo teste *post hoc* de Bonferroni*, em que a fase de autofluorescência apresentou média significativamente superior às fases de isquemia e reperfusão; e a fase de reperfusão, por sua vez, revelou média significativamente superior à fase de isquemia (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise das fases de autofluorescência, isquemia e reperfusão (Espectroscopia de Fluorescência)

Fase	Média	Erro Padrão	95% Intervalo de Confiança	
			Limite Inferior	Limite Superior
Auto	2,423	,016	2,390	2,456
Isq	1,597	,038	1,520	1,674
Rep	2,203	,044	2,112	2,294

*(Fase:F(1,67 ; 50,15) = 231,37 : p < 0,001)

Em seguida, foi analisada estatisticamente a correlação entre os tempos de isquemia e os dados fornecidos pela espectroscopia de fluorescência. Os gráficos obtidos mostraram que com o aumento do tempo de isquemia (de 30 para 60 minutos, por exemplo) houve queda significativa dos picos das curvas durante a fase de reperfusão, sendo observada queda mais significativa quanto maior o tempo de isquemia (Figuras 12 e 13).

Figura 12 - Mostrando queda não significativa da curva de reperfusão com 30 minutos de isquemia, em relação à curva de controle (autofluorescência). (p = 0,21)

Na isquemia de 30 minutos (curva em vermelho – Figura 12), houve queda do pico da curva, com retorno em seguida, durante a reperfusão (curva em azul), alcançando níveis bem próximos ao pico obtido durante a autofluorescência (curva em cinza – controle), fato que se repetiu com intensidade significativamente superior durante a análise com tempo de isquemia de 60 minutos (Figura 13).

Houve queda mais intensa também nos picos das curvas de isquemia, com aumento do tempo de isquemia de 30 para 60 minutos, porém sem diferença estatística significativa ($p = 0,83$) – (curvas em vermelho - Figuras 12 e 13).

Figura 13 - Mostrando queda significativa da curva de reperfusão com 60 minutos de isquemia, em relação à curva de controle (autofluorescência). ($p < 0,001$)

Uma vez que as leituras com o laser de fluorescência foram feitas em três regiões renais (polos superior, inferior e terço médio), decidiu-se por analisar estatisticamente tais regiões, por meio da espectroscopia, para se definir a que seria mais fidedigna (Tabela 3)

Pelo teste *post hoc* de Bonferroni, houve diferença estatística significativa, sendo que o terço médio renal mostrou média

significativamente superior à dos polos superior e inferior; (Região: F (1,60; 47,91) = 63,04 e $p < 0,001$)*

Tabela 3 - Correlação entre as regiões renais entre si de acordo com os dados da espectroscopia de fluorescência.

Região Renal	Média	Erro Padrão	95% Intervalo de Confiança	
			Limite Inferior	Limite Superior
PS	2,069	,026	2,015	2,123
M	2,234	,036	2,131	2,337
PI	2,070	,026	2,017	2,124

*Polos superior (PS), inferior (PI) e terço médio (M)

Para se avaliar a correlação entre a graduação histológica com o tempo de isquemia, utilizou-se o coeficiente de correlação. Como a variável graduação histológica não apresentou distribuição Normal (teste de Shapiro-Wilk) utilizamos a correlação não-paramétrica de Spearman para verificar a relação entre ela e as demais variáveis.

Coeficiente de correlação: Índice que varia de -1 a 1 sendo que valores positivos indicam uma relação diretamente proporcional entre as variáveis, ou seja, conforme aumentam os valores de uma variável aumentam os da outra também; valores negativos indicam uma relação inversamente proporcional entre as variáveis, ou seja, conforme aumentam os valores de uma variável diminuem os da outra; valores próximos a zero indicam independência, a variação dos valores de uma variável não afeta os valores da outra. Sendo assim, encontrou-se uma correlação positiva de alta magnitude ($r = 0,81$) entre o tempo de isquemia e a graduação histológica; ou seja, quanto maior o tempo de isquemia, maior a graduação histológica da lesão isquêmica (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 - Correlação entre o tempo de isquemia e a graduação histológica

Graduação Histológica	Coefficiente de Correlação Sig. (2-tailed)	1,000
N 37		
Tempo de Isquemia	Coefficiente de Correlação Sig. (2-tailed)	,806**
N 33		

** Correlação significativa ao nível de 0,01 - (r = 0,81)

Tabela 5 - Correlação entre a Graduação Histológica e o Tempo de Isquemia

Tempo	N	Mediana	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
120	12	5,00	4	5	4,83	,516
60	10	4,00	4	5	4,40	,467
30	11	3,00	3	4	3,27	,389
Controle	4	1,00	1	1	1,00	,000
Total	37	4,00	1	5	3,84	1,259

*Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis: $\chi^2 = 21,81$ (p < 0,001)

**Pelo teste *post hoc* de Dunn temos que: (Controle < 30 < 60 < 120 min.)

Desta forma, observou-se que para cada aumento do tempo de isquemia houve, progressiva e estatisticamente, aumento significativo da lesão histológica renal.

O grupo controle, conforme esperado, não apresentou qualquer alteração histológica (Graduação 1), Figuras 14 e 15.

Figura 14 - Glomérulo (seta) e túbulos renais proximais normais com células altas, citoplasma eosinofílico abundante. (H&E, 400x)

Figura 15 - Túbulos proximais normais (A), com núcleos basais e o epitélio com borda em escova (em destaque – seta) (H&E 400x) e o aspecto túbulo-glomerular normal (B) visto com o Tricômico de Masson (630x).

Os rins submetidos a 30 minutos de isquemia obtiveram graduação 3 e 4, ao passo que os rins com 60 e 120 minutos de isquemia apresentaram notas 4 e 5, sendo a nota 4 foi encontrada mais frequentemente nos rins com 60 minutos de isquemia, e a nota 5 presente mais comumente nos rins com 120 minutos de isquemia (Figuras 16, 17, 18 e 19).

Figura 16 - Mostrando a Necrose Tubular Aguda (NTA) com descamação celular para a luz dos túbulos proximais (setas), e dilatação tubular. (H&E 400x)

Figura 17. Dilatação dos túbulos proximais com perda da borda em escova, típico da necrose tubular aguda (NTA). (Tricrômico de Masson, 400x)

Figura 18 - Necrose tubular aguda. Células necróticas se projetando para a luz tubular (seta), perda da borda em escova e dilatação tubular. (T.Masson, 800x)

Figura 19 - Necrose tubular aguda (NTA) acentuada com queda maciça de fragmentos celulares na luz dos túbulos causando obstrução luminal. (Tricrômico de Masson, 800x)

Como o tempo de isquemia mostrou forte influência na graduação histológica, decidiu-se verificar a correlação entre a graduação histológica e os diversos comprimentos de onda (laser de excitação) para cada tempo de isquemia, utilizando análise estatística *one-way* ANOVA e o Coeficiente de Correlação (Anexos 3, 4 e 5).

Com 30 minutos de isquemia, nenhum comprimento de onda (lasers de excitação: 408, 442 e 532 nm) apresentou correlação com a graduação histológica (Figuras 20, 21 e 22).

Figura 20 - Com 30 minutos de isquemia, o laser de 408 nm não apresentou correlação com o grau de lesão histológica. ($p = 0,81$)

Figura 21 - Com 30 minutos de isquemia, o laser de 532 nm não apresentou correlação com o grau de lesão histológica ($p = 0,21$)

Figura 22 - Com 30 minutos de isquemia, o laser de 442 nm não apresentou correlação com o grau de lesão histológica ($p = 0,11$)

Em 60 minutos de isquemia, o laser de excitação de 532 nm (na fase de reperusão) apresentou coeficiente de correlação negativa significativa ($r = -0,61$) com a graduação histológica; ou seja, quanto menor o pico de leitura na espectroscopia (reperusão: 532 nm) maior a valor da graduação histológica (Figura 23).

Na isquemia de 120 minutos, o laser com 442 nm de comprimento de onda (na fase de reperfusão) mostrou coeficiente de correlação negativa significativa ($r = -0,73$) com a graduação histológica; ou seja, quanto menor o pico de leitura na espectroscopia (reperfusão: 442 nm) maior o valor da graduação histológica (Figura 24).

Figura 23 - Com 60 minutos de isquemia, o laser de 532 nm apresentou correlação significativa (na reperfusão) com o grau de lesão histológica ($r = -0,61$).

Figura 24 - Na isquemia de 120 minutos, o laser de 442 nm mostrou coeficiente de correlação significativa (na reperfusão) com o grau de lesão histológica ($r = -0,73$).

5. DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O crescimento das listas de espera para transplantes de órgãos sólidos faz com que seja necessário o desenvolvimento de métodos para se expandir o número de doadores. Órgãos provenientes de doadores falecidos são frequentemente submetidos às condições extremas tais como instabilidade hemodinâmica, condições clínicas adversas dos doadores limítrofes (idosos vítimas de acidentes vasculares cerebrais, por exemplo), tempo prolongado de parada cardíaca, e muitas vezes, são descartados devido a lesões irreversíveis ligadas à isquemia. Até o presente momento, com exceção da biópsia realizada no momento da retirada do enxerto, nenhum método prático e fidedigno encontra-se disponível para quantificar a existência de potencial dano isquêmico irreversível nos órgãos ofertados para transplantes (FITZGERALD, 2005; TIRAPELLI, 2009).

A ideia de utilizar a espectroscopia no estudo da isquemia não é nova. A espectroscopia para análise tecidual foi introduzida por Chance e Williams (1955) que avaliaram alterações de fluoróforos teciduais como o NADH mitocondrial, durante o processo de respiração celular com produção de ATP. Os princípios utilizados para obtenção da oximetria de pulso, por exemplo, empregam o método da espectrofotometria, por meio da diferença de absorção da luz pela oxihemoglobina em comparação com a carboxihemoglobina. O oxímetro de pulso determina a saturação periférica de oxigênio pela hemoglobina emitindo luz vermelha e infravermelha e mede as mudanças na absorção da luz durante o ciclo pulsátil, uma vez que a hemoglobina (nas suas formas – ligada ou não ao oxigênio) é reconhecida como um dos principais cromóforos absorvedores do tecido biológico.

Para isso, o oxímetro utiliza um sensor que possui de um lado um fotoemissor de luz e, no lado oposto, um fotorreceptor (CARLSON, 1993).

No caso da aplicação da espectroscopia de fluorescência induzida por laser, uma questão sempre levantada é a profundidade da penetração do laser de excitação no tecido renal do rato e se, de alguma

forma, as moléculas que compõem a cápsula renal poderiam interferir comprometendo de modo significativo as leituras.

Como descrito anteriormente, o laser de excitação penetra de maneira extremamente superficial (100 μm) no parênquima renal, porém é nesta região de alcance, que se encontram os alvos de interesse principal, os glomérulos e os túbulos contornados proximais, objetivos também das biópsias a céu aberto ou por punção (DEMOS, 1997), e não a região medular do órgão. Sabe-se que a propagação do laser no tecido depende da intensidade da luz, do tipo de tecido estudado bem como do comprimento de onda utilizado, sendo que a capacidade de penetração no tecido aumenta com o aumento do comprimento de onda de excitação (FITZGERALD, 2004; MELO, 2001; TIRAPELLI, 2009).

Vários estudos mostram que a interferência da cápsula renal nas medidas da espectroscopia de fluorescência é mínima. A cápsula é composta por colágeno e elastina, estruturas que não se alteram precocemente durante a isquemia, diferentemente do parênquima renal, formado por células metabolicamente mais ativas e sensíveis às mudanças dos níveis de hemoglobina, NADH, FAD, pH e outros compostos fluorescentes (GRYCZYNSKI, 2003).

Entretanto, em humanos a cápsula renal é mais espessa do que nos ratos, de modo que, tendo em vista à aplicabilidade clínica do método nos transplantes renais, torna-se importante confirmar a profundidade da penetração do laser de excitação no rim de humanos, avaliar a confiabilidade das informações obtidas, analisar a interferência da cápsula renal, dos líquidos de perfusão e do resfriamento renal nos resultados, para só depois se validar o método em questão (FITZGERALD, 2004).

O presente estudo mostrou que a espectroscopia de fluorescência induzida pelo laser é capaz de avaliar alterações existentes entre as fases de perfusão normal (autofluorescência), de isquemia e de reperfusão do tecido renal de ratos, sendo encontrada diferença estatística significativa entre as quedas dos picos das curvas na fase de isquemia, com recuperação na fase de reperfusão, ambas dependentes dos tempos de

isquemia a que os rins foram submetidos (Figura 11). Foi observada queda da fluorescência com aumento do tempo de isquemia, independente do comprimento de onda de excitação utilizado, fato também descrito por Fitzgerald J.T. e colaboradores em 2004. Este resultado sugere que todos os fluoróforos biológicos, independente dos comprimentos de onda avaliados, têm comportamento similar em resposta à isquemia, possivelmente como consequência de intensas alterações no pH, que diminuem a eficiência da emissão da fluorescência pelos compostos biológicos fluorescentes (LIN, 2003). Além disso, o órgão examinado durante a isquemia torna-se excessivamente rico em carboxihemoglobina (cianótico), aumentando ainda mais as propriedades absorptivas da hemoglobina, quando comparado ao mesmo órgão sob perfusão normal, de coloração rosada (GRYCZYNSKI, 2003). A origem das alterações na intensidade do sinal durante as fases de isquemia e reperfusão ainda não foi identificada completamente, e pode necessitar de monitoração de parâmetros adicionais, tais como a dispersão da excitação e emissão ou mesmo o pH intracelular (RAMAN, 2008).

Importante resultado encontrado também pelo presente estudo foi que, com aumento do tempo de isquemia (de 30 para 60 minutos, por exemplo) houve queda significativa dos picos das curvas de fluorescência durante a fase de reperfusão, sendo observada queda mais significativa quanto maior o tempo de isquemia (Figuras 12 e 13). Esta constatação mostra que as alterações moleculares no tecido isquêmico são contínuas e progressivas. Com o passar do tempo, há aumento progressivo de cromóforos absorvedores, como a carboxihemoglobina, e o agravamento da acidose metabólica que diminuem a fluorescência, em detrimento dos fluoróforos (estruturas fluorescentes) teciduais.

Não podem ser excluídas completamente também, as influências na propagação do laser, causadas pelas alterações morfológicas e estruturais teciduais secundárias ao tempo de isquemia. Por outro lado, Fitzgerald et al. (2005) investigaram a fluorescência induzida pelo laser de 335 nm em rins de ratos submetidos à isquemia quente de 18 e 85 minutos, seguida por reperfusão e encontraram diminuição da fluorescência para 78% e 65% dos valores iniciais, respectivamente. Depois de 18 a 50 minutos de

reperfusão houve retorno da fluorescência à linha de base (semelhante aos valores pré-isquemia) e nenhuma alteração da fluorescência foi encontrada nos ratos do grupo submetido à isquemia de 85 minutos. Assim, há indícios sugerindo que a reperfusão pode ou não restabelecer completamente os sinais da fluorescência.

A hipóxia causa aumento da NADH, um conhecido fluoróforo detectado pelo laser de excitação entre 340 e 480 nm. Teoricamente então, o aumento da NADH aumentaria a fluorescência, porém o que se observa, com o prolongamento do tempo de isquemia, é justamente o contrário, ou seja, a diminuição dos níveis de fluorescência em virtude da interação do laser com a hemoglobina, um notável cromóforo absorvedor (SHEHADA, 2000).

Dada à variabilidade biológica, as aferições da espectroscopia de fluorescência não devem ser avaliadas exclusivamente em função do tempo de isquemia, mas em conjunto com a gravidade do dano tecidual ou disfunção do órgão. Sabe-se que as alterações histológicas são agravadas pelo aumento do tempo de isquemia e em seguida, podem ser exacerbadas pela reperfusão. A verdadeira extensão das lesões é vista a partir de 24 horas de reperfusão (GOUJON, 1999; JABLONSKI, 1983; RATYCH, 1986). Como no trabalho atual as aferições da fluorescência foram feitas com 5 minutos de reperfusão, sendo o órgão imediatamente retirado para análise histológica, muitos cromóforos absorvedores e fluoróforos podem ter ficado de fora da nossa análise espectroscópica, assim como alguns elementos histológicos estruturais durante a avaliação pela microscopia óptica. Apesar disso, nossos dados mostram uma correlação notável entre o tempo de isquemia, as aferições da fluorescência e a gravidade das lesões histológicas, como relatado também anteriormente por outros autores (GOUJON, 1999; JABLONSKI, 1983; TIRAPELLI, 2009).

A avaliação histológica foi realizada de acordo com os critérios de Goujon et al. (1999) e descrita por Solez (2007) aplicada para alterações sugestivas de necrose tubular aguda, embora outras classificações sejam utilizadas, destacando-se a de Jablonsky (1983). Segundo a escala de Goujon (1999), são analisados oito padrões morfológicos básicos, típicos das lesões tubulares proximais, dos quais apenas dois não puderam ser

avaliados pela microscopia óptica, pois seria necessária a análise através da microscopia eletrônica (edema intracelular discreto ou inicial - sem vacuolização - e integridade mitocondrial); graduadas em cinco escalas de pontuação referentes à porcentagem das lesões do tecido renal. Optou-se pela classificação de Goujon, pois ela caracteriza melhor cada uma das principais alterações dos túbulos proximais no córtex renal, e pelo fato da classificação de Jablonsky (1983) ser preferencialmente indicada para categorizar as lesões com 48 horas de reperfusão, uma vez que períodos de isquemia menores de 30 minutos causam lesões geralmente reversíveis (JABLONSKY, 1983).

Alguns estudos, com indução do processo de I/R em ratos previamente nefrectomizados e submetidos a 45 minutos de isquemia renal contralateral seguido por reperfusão de 6 a 24 horas, observaram alterações da morfologia renal, semelhantes às encontradas pelo presente trabalho, caracterizadas pelo edema das células tubulares, dilatação tubular, picnose nuclear, congestão medular e necrose moderada à grave (CHANDER E CHOPRA, 2006; SENER, 2006; SINGH e CHOPRA, 2004).

Nosso estudo mostrou associação direta entre a gravidade da lesão tecidual (histologia) com o tempo de isquemia renal quente (30 a 120 minutos), o que está de acordo com relatos anteriores (JABLONSKY, 1983; MORIN, 2004). Os animais dos grupos G1 a G3 apresentaram alterações histológicas semelhantes, porém com agravamento das lesões em vários dos parâmetros morfológicos, principalmente após 60 minutos de isquemia, destacando-se o desnudamento da membrana basal, sugerindo que após 60 minutos, as lesões causadas pela isquemia têm intensidade e extensão provavelmente irreversíveis. Esses achados apresentam amplo respaldo da literatura (JABLONSKY, 1983; LIMA, 2004; RIERA, 1999; TORRAS, 2002).

Lesões mediadas pela isquemia e reperfusão são muito mais evidentes à luz da microscopia óptica 24 horas após o insulto isquêmico (JABLONSKY, 1983), e a verdadeira extensão das mudanças estruturais nas células é vista apenas alguns dias após a reperfusão (GONZÁLEZ-FLECHA; BOVERIS, 1995). Como nossas amostras foram tomadas 5 minutos após a reperfusão, as alterações observadas certamente são menos evidentes, tanto

do ponto de vista estrutural quanto metabólico, razão possivelmente pela qual, os rins submetidos a 30 ou 60 minutos de isquemia apresentaram graduações histológicas bastante semelhantes entre si.

Do ponto de vista estatístico, a graduação histológica descrita por Goujon et al. (1999) pode ser problemática, uma vez que ela se baseia em pequenas variações das notas que vão de 1 a 5. Como o grupo controle não apresenta alterações (nota 1) e nossa metodologia de estudo não encontrou nota 2 na graduação histológica, tem-se que tempos bastante dispersos de isquemia (30 a 120 minutos) e que geram alterações histológicas distintas, são graduados basicamente como 3, 4 e 5. Assim, notas bem próximas gradua e classificam lesões geradas por tempos de isquemia bem mais amplos. Analisando a Tabela 5, por exemplo, tem-se nos tempos de 60 e 120 minutos de isquemia, as mesmas notas 4 e 5 (mínima e máxima) da graduação histológica. Houve, porém maior número de notas 4 nos ratos submetido à 60 minutos de isquemia, e de notas 5 nos de 120 minutos, o que modificou a média de ambos (4,40 e 4,83, respectivamente), sendo encontrada diferença estatisticamente significativa.

Uma vez que o tempo de isquemia mostrou forte influência na graduação histológica e se correlacionou estatisticamente com os dados da fluorescência, como discutido anteriormente, um resultado relevante do nosso estudo foi encontrar correlação entre a graduação histológica e os comprimentos de onda (laser de excitação) de 532 e 442 para tempos de isquemia específicos (60 e 120 minutos respectivamente), (Figuras 21 e 22, Apêndices B, C e D).

Tirapelli et al. (2009), em trabalho semelhante utilizando tempos de isquemia de 20, 40, 60 e 80 minutos e reperusão de 5 a 10 minutos, concluíram que ambos os lasers de excitação (442 e 532 nm) apresentaram correlação com a gravidade das lesões histológicas independente do tempo de isquemia, e alegaram ainda que o comprimento de onda de 442 nm pareceu mostrar melhor associação do que o laser de 532 nm. Sugeriram também que tais resultados foram devidos às mudanças bioquímicas, principais responsáveis pela diminuição da fluorescência, mas que o dano celular estrutural também poderia desempenhar papel menos relevante.

Nosso estudo não conseguiu, de modo geral, encontrar um comprimento de onda de excitação, dentre os analisados (408, 442 e 532 nm), que possa se correlacionar de modo mais significativo, com as lesões histológicas secundárias ao processo bifásico de isquemia e reperfusão renal em ratos. Realmente o laser com comprimento de onda de 408 nm não se mostrou eficaz para este fim, independente do tempo de isquemia e graduação histológica. Em 30 minutos de isquemia, nenhum comprimento de onda (lasers de excitação: 408, 442 e 532 nm) apresentou correlação com a graduação histológica, diferentemente do que foi descrito anteriormente por Tirapelli et al. (2009).

Em contrapartida, observou-se no presente trabalho, que houve correlação estatisticamente significativa, ao se utilizar determinados comprimentos de onda especificamente para certos tempos de isquemia. Desta forma, para 60 minutos de isquemia o laser com 532 nm de comprimento de onda, durante a reperfusão, foi o que mostrou estatisticamente maior coeficiente de correlação negativa com a graduação histológica, ou seja, quanto menor o pico da curva de leitura (fluorescência), maior a lesão histológica. Fato semelhante ficou demonstrado na correlação significativa entre o laser de 442 nm na reperfusão renal de ratos submetidos à isquemia de 120 minutos.

Um detalhe importante ao se analisar nosso estudo, é que os achados significativos foram encontrados na fase de reperfusão, diferentemente de alguns relatos presentes na literatura (FITZGERALD, 2005; TIRAPELLI, 2009). Parece haver, de acordo com o aumento do tempo de isquemia, alterações celulares que se tornam mais evidentes à análise da espectroscopia de fluorescência durante a reperfusão, fato que confirma a existência de alterações bioquímicas significativas denominadas lesões de reperfusão.

Uma das principais críticas à nossa metodologia pode estar relacionada ao curto período de reperfusão utilizado (5 minutos), uma vez que as alterações mais graves, tanto moleculares quanto estruturais, se intensificam 24 horas após o início da reperfusão. Provavelmente se tivéssemos utilizado um período maior de reperfusão (24 a 30 horas, por exemplo), encontraríamos correlação ainda mais significativa entre a espectroscopia de fluorescência e as alterações histológicas.

A análise da fluorescência, com diferentes comprimentos de onda de excitação, durante a perfusão normal do órgão (autofluorescência) não mostrou diferença estatística significativa entre si, fato até mesmo óbvio, uma vez que os rins são normais, sem alterações estruturais, com perfusão sanguínea fisiológica, e não poderiam apresentar leituras estatisticamente diferentes, na espectroscopia de fluorescência.

Surpreendentemente, durante os diferentes tempos de isquemia (30, 60 e 120 minutos) a espectroscopia de fluorescência não apresentou diferença estatística significativa ao analisar os rins entre si na fase isquêmica. Houve queda das curvas da fluorescência (Figuras 12 e 13) durante a fase de isquemia, queda esta acentuada progressivamente com o aumento do tempo de isquemia de 30 para 60 minutos, por exemplo, porém sem diferença estatística significativa. Era esperado um resultado significativo, uma vez que com a isquemia e acidose, há alterações dos componentes moleculares intracelulares, que alteram os princípios de absorção, refração e geração de fluorescência, sem considerar as alterações estruturais dos tecidos (LUGER-HAMER, 2009). Para melhor avaliação, foram feitas análises uni-variada e multi-variada comparando-se as curvas de fluorescência geradas por diferentes tempos de isquemia, resultantes de um ou vários comprimentos de onda de excitação.

Do ponto de vista prático, e nos moldes atuais, nosso estudo não conseguiu demonstrar significativamente que a espectroscopia de fluorescência, induzida por laser, pode ser considerado como método seguro e confiável para avaliar a viabilidade de um órgão para transplante, (proveniente de um doador marginal, por exemplo), uma vez seria necessário à realização prévia do implante do órgão e sua reperfusão, para posteriormente, obter-se leitura fidedigna da sua fluorescência e correlacioná-la com o provável grau de lesão histológica. Além disso, fica difícil projetar para humanos os nossos resultados uma vez que, utilizando um laser de excitação de 442 nm de comprimento de onda (na reperfusão) quanto tempo corresponderia no rim de humanos uma isquemia de 120 minutos em ratos?

Diferente da espectroscopia de fluorescência pontual, alguns estudos concluem que a técnica de fluorescência por imagem (óptica) é capaz até de medir a duração da lesão da isquemia quente na preservação

hipotérmica renal em ratos (FITZGERALD, 2005). A vantagem da imagem espectral (por imagem), é que a intensidade proveniente do rim todo pode ser analisada numa só aferição. Isso faz com que haja amplificação dos resultados obtidos pela observação da heterogeneidade macroscópica da estrutura do tecido, mostrando as diferenças no grau de isquemia de um ponto em relação a outro na superfície renal (MAYEVSKY; CHANCE, 1982; MAYEVSKY, 2001).

Na espectroscopia de fluorescência, devido à heterogeneidade da isquemia através do rim, os dados obtidos a partir de um pequeno ponto podem não representar a totalidade da superfície, havendo necessidade de se realizar múltiplas medições e considerar a média entre elas. Por isso, no presente estudo, optou-se por realizar aferições em três regiões renais: polos superior e inferior, bem como no terço médio renal. Comparando estas três regiões renais analisadas, o teste *post hoc* de Bonferroni mostrou diferença estatística significativa, sendo que o terço médio renal apresentou média significativamente superior à dos polos superior e inferior (Tabela 3), fato não analisado por Tirapelli et al. (2009), em estudo semelhante, mas que não utilizou o laser de 408 nm.

Nossos resultados sugerem que, para se chegar às mesmas conclusões do presente estudo, bastaria que fossem realizadas aferições da fluorescência no terço médio renal, não havendo necessidade da análise dos polos superior e inferior.

Na literatura não se encontra, até a presente data, relato semelhante o que nos induz a algumas reflexões:

- a circulação renal, com vasos de maior calibre na região central do hilo teria exercido influência nos achados da espectroscopia de fluorescência, tornando o terço médio renal mais sensível aos efeitos da isquemia?
- por que realizar biópsias de rotina preferencialmente nos polos renais uma vez que as alterações mais sensíveis podem estar localizadas no terço médio?

De modo geral, prático e aceito, as biópsias (por punção ou a céu aberto) são rotineiramente direcionadas aos polos pelo menor risco de hemorragia e complicações decorrentes do procedimento. Acredita-se que os polos renais sejam “um pouco menos vascularizados”, apresentem menor risco de sangramento e por isso sejam até mais sensíveis às lesões isquêmicas. Um pensamento prático é: se não há lesão de NTA nos polos, consequentemente não haverá também no terço médio.

Não foi esse o resultado encontrado pelo atual estudo. Estatisticamente, o terço médio dos rins de ratos se mostrou mais sensível, na espectroscopia de fluorescência, às alterações isquêmicas e de reperfusão. Logicamente tal fato necessita ser confirmado por estudos adicionais, porém devem-se levantar hipóteses de que não apenas as alterações histológicas provocadas pela isquemia são relevantes, muitas das quais são também transitórias e apresentem recuperação plena. Devem ser investigadas as alterações metabólicas precoces, bem mais sensíveis à luz da espectroscopia de fluorescência, que ocorrem, pelo jeito, com mais intensidade no terço médio do rim e que poderiam ativar uma série de mecanismos imunológicos humorais, invisíveis à microscopia óptica convencional, culminando com consequências graves no longo prazo, como a nefropatia crônica do enxerto, por exemplo.

Hipóteses são apenas hipóteses, mas não se acredita que a circulação seja a total e completa responsável, uma vez que o laser de excitação penetra muito superficialmente no parênquima renal, na extrema periferia do córtex, e analisa uma região com vasos provavelmente de calibres tão finos no terço médio, como os vasos dos polos renais na mesma posição periférica. Deve-se lembrar de que a espectroscopia de fluorescência sofre influência também das alterações metabólicas celulares, que modificam as propriedades absorptivas e de fluorescência das moléculas, tais como a acidose.

Novos e amplos estudos devem ser realizados para que nossos resultados sejam confirmados, uma vez que seus dados podem trazer novas ideias para o planejamento de futuras linhas de pesquisas.

6. CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

1. Há correlação entre os dados da espectroscopia de fluorescência induzida pelo laser e alterações histológicas na isquemia renal em ratos. Tal correlação foi observada na fase de reperfusão:
 - após 60 minutos de isquemia, com laser de excitação de 532 nm e,
 - após 120 minutos de isquemia, com laser de 442 nm.
2. Existe diferença na leitura da espectroscopia de fluorescência entre os polos superior, inferior e o terço médio dos rins em ratos. O terço médio apresentou média superior à média dos polos (superior / inferior), e estes dois últimos não obtiveram diferença entre si.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

ABELA, C.B.; HOMER-VANNIASINKHAM, S. Clinical implications of ischaemia-reperfusion injury. **Pathophysiology**, v. 9, p. 229-40, 2003.

AL-QATTAN, M.M. Ischaemia-reperfusion injury: implications for the hand surgeon. **J. Hand Surg.** v. 23, p. 570-3, 1998.

ÁLVAREZ, A.; CERDÁ-NICOLÁS, M.; NABAH, Y.N.A. et al. Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin-II. **Blood**, v. 104, p. 402-8, 2004.

AZUMA, H.; NADEAU, K.; TAKADA, M., et al. Ischemia/reperfusion injury of a single kidney. Cellular and molecular predictors of chronic renal dysfunction after initial transplantation. **Transplantation**, v. 64, p. 190-7, 1997.

BAGNATO, V.S.; KURACHI C.; FERREIRA, J., et al. New photonic Technologies for the treatment and diagnosis of hepatic diseases: na overview of the experimental work performed in collaboration, between Physics Institute of Sao Carlos and Ribeirao Preto Faculty of Medicine of the University of Sao Paulo. **Acta Cir. Bras.**, v. 2, 1p. 3-11, 2006. Supplement 1.

BALAKIEV, M.Y.; ZIMMER, G. Gradual change in permeability of inner mitochondrial membrane precede the mitochondrial permeability transition. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 356, p. 46-54, 1998.

BALBI, A.L.; GABRIEL, D.P.; BARSANTE R.C., et al. Mortalidade e prognóstico específico em pacientes com insuficiência renal aguda. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 51, n. 6, p. 318-322, 2005.

BARTELS-STRINGER, M.; KRAMERS, C.; WETZELS, J.F.M., et al. Hypothermia causes a marked injury to rat proximal tubular cells that is aggravated by all currently used preservation solutions. **Cryobiology**, v. 47, p. 82-91, 2003.

*De acordo com: Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BASILE, D.P.; ROVAK, J.M.; MARTIN, D.R., et al. Increased transforming growth factor-beta 1 expression in regenerating rat renal tubules following ischemic injury. **Am. J. Physiol.**, v. 270, p. 500-9, 1996.

BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN, J., et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Nati. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 1620-4, 1990.

BISWAL, N.C. Recovery of turbidity free fluorescence from measured fluorescence: an experimental approach. **Opt. Express**, v. 11, n. 24, p. 3320-31, 2003.

BLANTZ, R.C.; DENG, A.; MIRACLE, C.M.; THOMSON, S.C. Regulation of kidney function and metabolism: a question of supply and demand. **Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.**, v. 118, p. 23-43, 2007.

BOCK, H.A. Pathophysiology of acute renal failure in septic shock: from pre-renal to renal failure. **Kidney Int. Suppl.**, v. 64, p.15-8, 1998.

BONVENTRE, J.V.; ZUK, A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? **Kidney Int.**, v. 66, n. 2, p. 480-5, 2004.

BOYLE, R. **Experiments and Considerations Touching Colours**. 1 ed., London, 1664.

BREZIS, M. Cellular mechanisms of acute ischemic injury in the kidney. **Ann. Rev. Med.**, v. 44, p. 27-37, 1993.

BULLDEY, G.B. Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. **British J. Cancer Suppl.**, v. 8, p. 66-73, 1987.

CARDEN, D.L.; GRANGER, D.N. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. **J. Pathol.**, v. 190, p. 255-66, 2000.

CARLSON, K.A.; JAHR, J.S. A historical overview and update on pulse oximetry. **Anesthesiol. Rev.**, v. 20, p. 173-81, 1993.

CECCHI, A.O. **As espécies reativas de oxigênio e o DNA**. 1996. 90 f. Dissertação (Mestrado em Genética) Faculdade de Medicina de São Paulo, USP, SP, 1996.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G.R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation in the kinetics of oxygen utilization. **J. Biol. Chem.**, v. 217, p. 383, 1955.

CHANDER, V.; CHOPRA, K. Protective effect of nitric oxide pathway in reveratrol renal ischemia-reperfusion injury in rats. **Arch. Med. Res.**, v. 37, p. 19-26, 2006.

CHEN, H.; XING, B.; LIU, X.; ZHAN, B.; ZHOU, J.; ZHU, H.; CHEN, Z. Ozone oxidative preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury: the role of nitric oxide. **J. Surg. Res.**, v. 20, p. 1-9, 2007.

CLAVIEN, P.A.; HARVEY, P.R.; STRASBERG, S.M. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. **Transplantation**, v. 53, p. 957-78, 1992.

DaCOSTA, R.S.; ANDERSSON, H.; WILSON, B.C. Molecular fluorescence excitation-emission matrices relevant to tissue spectroscopy. **J. Photochem. Photobiol.**, v.78, n. 4, p. 384-92, 2003.

DELBRIDGE, M.S.; SHRESTHA, B.M.; RAFTERY, A.T.; EL NAHAS A.M.; HAYLOR, J.L. The effect of body temperature in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. **Transplant. Proc.**, v. 39, p. 2983-5, 2007.

DEMOS, S.G.; ALFANO, R.R. Optical polarization imaging. **Appl. Optics**, v. 36, p. 150, 1997.

ÉVORA, P.R.B.; PEARSON, P.J.; SECCOMBE, J.F.; SCHAFF, H.V. Caracterização da lesão de isquemia/reperfusão. In: Castro e Silva Jr., O.; Zucoloto, S.; Beer Jr., A. **Modelos Experimentais de Pesquisa em Cirurgia**. São Paulo. 1ª Ed., Robe Editorial, p. 433-8, 1998.

FERREIRA, R.; BURGOS, M.; LLESUY, S.; MILEI, S.; GONZÁLEZ-FLECHA B.; BOVERIS, A. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 48, p. 77-84, 1989.

FINN, W.F. Prevention of ischemic injury in renal transplantation. **Kidney Int.**, v. 37, p. 171-82, 1990.

FITZGERALD, J.T.; DEMOS, S.; MICHALOPOULOU, A.; PIERCE, J.L.; TROPPMANN, C. Assessment of renal ischemia by optical spectroscopy. **J. Surg. Res.**, v. 122, p. 21-8, 2004.

FITZGERALD, J.T.; MICHALOPOULOU, A.; PIVETTI, C.D. Real-time assessment of in vivo renal ischemia using laser autofluorescence imaging. **J. Biomedical Optics**, v.10, n. 4, p. 44018(1) – 44018(7), 2005.

FLECKNELL, P.A. Anaesthesia of animals for biomedical research. **Braz. J. Anaest.**, v. 71, p. 865-885, 1993.

GEDDES, C.C.; WOO, Y.M.; JARDINE, A.G. The impact of delayed graft function on the long-term outcome of renal transplantation. **J. Nephrol.**, v. 15, p. 17-21, 2002.

GEORGAKOUDI, I. The color of cancer. **J. Lumin.**, v.119, p. 75-83, 2006.

GEORGAKOUDI, I.; FELD, M.S.; MÜLLER, M.G. Intrinsic fluorescence spectroscopy of biological tissue. In: MYCEK M.A.; POGUE B.W. **Handbook of biomedical fluorescence**. New York, 1^a Ed., Marcel Dekker, Cap. 4, p. 109-142, 2003.

GEORGAKOUDI, I.; JACOBSON, B.C.; MÜLLER, M.G.; SHEETS, E.E.; BADIZADEGAN, K.; CARR-LOCKE, D.L.; CRUM, C.P.; BOONE, C.W.; DASARI R.R.; DAM J.V.; FELD M.S. NAD(P)H and collagen as *in vivo* quantitative fluorescent biomarkers of epithelial precancerous changes. **Cancer Res.**, v. 62, p. 682-7, 2002.

GILL, P.S.; WILCOX, C.S. NADPH oxidases in the kidney. **Antioxid. Redox. Signal**, v.8, p. 1597-607, 2006.

GOBE, G.; CRANE, D. Mitochondria, reactive oxygen species and cadmium toxicity in the kidney. **Toxicol. Lett.**, v. 198, n. 1, p. 49-55, 2010.

GOES, N.; URMSON J.; RAMASSAR V.; HALLORAN P. Ischemic acute tubular necrosis induces an extensive local cytokine response. **Transplantation**, v. 59, p. 565-72, 1995.

GOMES, M.C.J. **Eventos implicados na transição de permeabilidade induzida por ácido flufenâmico**. 1999. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP, 1999.

GONZÁLEZ-FLECHA, B.; BOVERIS, A. Mitochondrial sticks of hydrogen peroxide production in reperfused rat kidney cortex. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1243, p. 361-6, 1995.

GOUJON, J.M.; HAUET, T.; MENET, E., et al. Histological evaluation of proximal tubule cell injury in isolated perfused pig kidneys exposed to cold ischemia. **J. Surg. Res.**, v. 82, p.228-33, 1999.

GRYCZYNSKI, Z.; GRYCZYNSKI, L; LAKOWICZ, J.R. Fluorescence sensing methods. **Methods Enzymol.**, v. 360, p. 44, 2003.

GUELER, F.; GWINNER, W.; SCHWARZ, A.; HALLER, H. **Kidney Int.**, v. 66, p. 523-7, 2004.

HALESTRAP, A.P. Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at pH values below 7. Implications for the protective effect of low pH against chemical and hypoxic cell damage. **Biochem. J.**, v. 278, p. 715-19, 1991.

HALL, A.M.; CRAWFORD, C.; UNWIN, R.J.; DUCHEN, M.R.; PEPPIATT-WILDMAN, C.M. Multiphoton imaging of the functioning kidney. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 22, p. 1297-304, 2011.

HEIJNEM, B.H.M.; VAN VEEN, S.Q.; STRAATSBURG, I.H.; THOMAS, M.V.G. Pronounced effect of minor changes in body temperature on ischemia and reperfusion injury in rat liver. **J. Appl. Physiol.**, v. 91, p. 265-8, 2001.

HELLBERG, P.O.A.; KALLSKOG, O.T.; OJTEG, G.; WOLGAST, M. Peritubular capillary permeability and intravascular RBC aggregation after ischemia: effects of neutrophils. **Am. J. Physiol.**, v. 258, p. 1018-25, 1990.

HENLE W.; NICKEL E. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1098, p. 233-9, 1992.

ISHIMARU, A. Diffusion of light in turbid material. **Appl. Optics**, v. 40, n. 25, p. 2210-5, 1989.

JABLONSKY, P.; HOWDEN, B.O.; RAE, D.A.; BIRRELL, C.S.; MARSHALL, V.C.; TANGE J. An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia. **Transplantation**, v. 35, p. 198-204, 1983.

KROEMER, G.; DALLAPORTA, B.; RESCHE-RIGON, M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. **Ann. Rev. Physiol.**, v.60, p. 619-42, 1998.

KUSUNOKI, Y.; IMAMURA, F.; UDA, H.; MANO, M.; HORAI, T. Early detection of lung cancer with laser-induced fluorescence endoscopy and spectrofluorometry. **Chest**, v. 118, p. 1776-82, 2000.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York, 2 ed., Plenum Press, Cap. 1-2, p. 1-49, 1999.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier; 1991.

LEMAY, S.; RABB, H.; POSTLER, G.; SINGH, A.K. Prominent and sustained up-regulation of gp130-signaling cytokines and the chemokine MIP-2 in murine renal ischemia-reperfusion injury. **Transplantation**, v. 69, p. 959-63, 2000.

LIEBERTHAL, W. Biology of acute renal failure: therapeutic implications. **Kidney Int.**, v. 52, p. 1102-15, 1997.

LIMA L.V.S. **Associação da ciclosporina A ao pré-condicionamento isquêmico em rim de ratos submetidos à isquemia normotérmica e reperfusão**. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, 2004.

LIN, H.J.; HERMAN, P.; LAKOWICZ, J.R. Fluorescence lifetime-resolved pH imaging of living cells. **Cystometry**, v. 52(a), p. 77, 2003.

LONGO, R.; POLLESELLO, P.; RICCI, C., et al. Proton MR spectroscopy in quantitative in vivo determination of fat content in human liver steatosis. **J. Magn. Reson. Imaging**, v. 5, p. 281-5, 1995.

LUGER-HAMER, M.; BARBIRO-MICHAELY, E.; SONN, J.; MAYEVSKY, A. Renal viability evaluated by the multiprobe assembly: a unique tool for the assessment of renal ischemic injury. **Nephron. Clin. Practice**, v. 111, n. 1, p. 29-38, 2009.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica Básica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1990.

MAXWELL, S.R.J.; LIP, G.Y.H. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. **Int. J. Cardiol**, v. 58, p. 95-117, 1997.

MAYEVSKY, A.; CHANCE, B. Intracellular oxidation-reduction state measured in situ by a multichannel fiber-optic fluorometer. **Science**, v. 217, n. 6, p. 537-40, 1982.

MAYEVSKY, A.; NAKACHE, R.; LUGER-HAMER, M.; AMRAN, D.; SONN, J. Assessment of transplanted kidney vitality by a multiparametric monitoring system. **Transplant. Proc.**, v. 33, n. 6, p. 2933-4, 2001.

MCLAREN, A.J.; JASSEM, W.; GRAY, D.W.; FUGGLE, S.V.; WELSH, K.I.; MORRIS, P.J. Delayed graft function: risk factors and the relative effects of early function and acute rejection on long-term survival in cadaveric renal transplantation. **Clin. Transplant.**, v.13, p. 266-72, 1999.

MELO, C.A.; KURACHI, C.; GRECCO, C.; SIBATA, C.H.; CASTRO E SILVA, O.; BAGNATO, V.S. Pharmacokinetics of photogem using fluorescence monitoring in Wistar rats. **Photochem. Photobiol.**, v. 73, p. 183-8, 2004.

MELO, C.A.; LIMA, A.L.; BRASIL, I.R.; CASTRO E SILVA, JR O.; MAGALHÃES, D.V.; MARCASSA, L.G.; BAGNATO, V.S. Characterization of light penetration in rat tissues. **J. Clin. Laser Med. Surgery**, v. 19, p. 175-9, 2001.

MENDELOFF, J.; KO, K.; ROBERTS, M.S., et al. Procuring organ donors as a health investment: how much should we be willing to spend? **Transplantation**, v. 27, n. 78, s. 12, p. 1704-10, 2004.

MITTNATCH, S.J.R.; SHERMAN, S.C.; FARBER, J. Reversal of ischemic mitochondrial dysfunction. **J. Biol. Chem.**, v. 254, p. 9871-8, 1979.

MOERS, C.; SMITS, J.M.; MAATHUIS, M.H., et al. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. **N. England J. Med.**, v. 360, p. 7-19, 2009.

MOLITORIS, B.A. New insights into the cell biology of ischemic acute renal failure. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 1, p. 1263-70, 1991.

MORIN, D.; PIRES, F.; PLIN, C.; TILLEMENT, J.P. Role of the permeability transition pore in cytochrome C release from mitochondria during ischemia-reperfusion in rat liver. **Biochem Pharm** v. 68, p. 2065-73, 2004.

MORTON, D.B. The animals (scientific procedures) act 1986 and research into anaesthesia. **Braz. J. Anaesth.**, v. 65, p. 303-5, 1990.

MUHLBACHER, F.; LANGER, F.; MITTERMAYER, C. Preservation solutions for transplantation. **Transplant. Proc.**, v. 31, p. 2069-70, 1999.

MÜLLER, M.G. Intrinsic fluorescence spectroscopy in turbid media: disentangling effects of scattering and absorption. **Appl. Optics**, v. 40, n. 25, p. 4633-46, 2001.

MÜLLER, M.G.; VALDEZ, T.A.; GEORGAKOUDI, I.; BACKMAN, V.; FUENTES, C.; KABANI, S.; LAVER, N.; WANG, Z.; BOONE, C.W.; DASARI, R.R.; SHAPSHAY, S.M.; FELD, M.S. Spectroscopic detection and evaluation of morphologic and biochemical changes in early human oral carcinoma. **Cancer**, v. 97, n.7, p. 1681-92, 2003.

MURPHY, M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem. J.**, v.417, p. 1-13, 2009.

NANKIVELL, B.J.; KUYPERS, D.R. Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss. **Lancet**, v.378, n. 98, p. 1428-37, 2011.

NAUTA J.M.; SPEELMAN O.C.; VAN LEENGOED H.L.L.M., et al. In vivo photo-detection of chemically induced premalignant lesions and squamous cell carcinoma of the rat palatal mucosa. **J. Photochem. Photobiol.**, B, v.39, p. 156-66, 1997.

NETTO, J. M. B.; TUCCI JR., S.; COLOGNA, A. J., et al. Clorpromazina e a função mitocondrial na isquemia-reperfusão renal. **Acta Cir. Bras.**, v.16, supl.1, p. 32-5, 2001.

NICHOLLS D.G. Mitochondrial membrane potential and aging. **Aging Cell.**, v. 3, p. 35-40, 2004.

OJO A.O.; WOLFE R.A.; HELD P.J.; PORT P.J.; PORT F.K. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. **Transplantation**, v. 63, p. 968-74, 1997.

ONIZAWA K.; OKAMURA N; SAGINOYA H.; YOSHIDA H. Characterization of autofluorescence in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 39, p. 150-6, 2003.

ONIZAWA K.; SAGINOYA H.; FURUYA Y.; YOSHIDA H. Fluorescence photography as a diagnostic method for oral cancer. **Cancer Letter**, v. 108, p. 61-6, 1996.

ORTIZ, A.; JUSTO, P.; SANZ, A.; LORZ, C.; EGIDO, J. Targeting apoptosis in acute tubular injury. **Biochem. Pharmacol.**, v. 66, p. 1589-94, 2003.

OSSWALD, H.; SCHNERMANN, J. Methylxanthines and the kidney. **Handb. Exp. Pharmacol.**, v. 2, p. 391-412, 2011.

PANG, C.Y. Ischemia-induced reperfusion injury in muscle flaps: pathogenesis and major source of free radicals. **J. Reconstr. Microsurg.** v. 6, p.77-83, 1990.

PATHAK, I.; DAVIS, N.L.; HSIANG, Y.N.; QUENVILLE, N.F.; PALCIC, B. Detection of squamous neoplasia by fluorescence imaging comparing porfimer sodium fluorescence to tissue autofluorescence: in the hamster cheek-pouch model. **Am. J. Surgery**, v. 170, p. 423-6, 1995.

PELKEY, T.J.; FRANK, R.S.; STANLEY, J.J.; FRANK, T.S.; ZELENOCK, G.B.; D'AALECY, L.G. Minimal physiologic temperature variations during renal ischemia alter functional and morphologic outcome. **J. Vasc. Surg.**, v.15, p. 619-25, 1992.

PERALTA, C.; HOTTER, G.; CLOSA, D.; GELPI, E.; BULBENA, O.; ROSELLÓ-CATAFAU, J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. **Hepatology**, v. 25, p. 934-7, 1997.

PERICO, N.; CATTANEO, D.; SAYEGH, M.H.; REMUZZI, G. Delayed graft function in kidney transplantation. **Lancet**, v. 364, p. 1814-27, 2004.

PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J.O.; DETRY, O.; FRANSSEN, C.; MEURISSE M.; LIMET, R. Ischemia-reperfusion injury of rabbit kidney: comparative effects of desferrioxamine and N-acetylcysteine as antioxidants. **Transplant. Proc.**, v. 32, p. 475-6, 2000.

RACUSEN, L.C.; FIVUSH, B.A.; LI, Y.L.; SLATNIK, I.; SOLEZ, K. Dissociation of tubular cell detachment and tubular cell death in clinical and experimental "acute tubular necrosis". **Lab. Invest.**, v. 64, p. 546-56, 1991.

RAMAN, R.N.; PIVETTI, C.D.; MATTHEWS, D.L.; TROPPMANN, C.; DEMOS, S.G. A non-contact method and instrumentation to monitor renal ischemia and reperfusion with optical spectroscopy. **Opt. Express**, v. 17, n. 2, p. 894-905, 2009.

RAMAN, R.N.; PIVETTI, C.D.; MATTHEWS, D.L.; TROPPMANN, C.; DEMOS, S.G. Quantification of in vivo autofluorescence dynamics during renal ischemia and reperfusion under 355 nm excitation. **Optics Express**, v. 16, n. 7, p. 4930-44, 2008.

RAMANUJAM, N. Fluorescence spectroscopy in vivo. In: MEYERS R.A. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. Chichester, John Wiley & Sons Ltd, p. 20-56, 2000.

RAMASWAMY, D.; CORRIGAN, G.; POLHEMUS, C.; BOOTHROYD, D.; SCANDLING, J.; SOMMER, F.G.; ALFREY, E.; HIGGINS, J.; DEEN, W.M.; OLSHEN, R.; MYERS, B.D. Maintenance and recovery stages of post-ischemic acute renal failure in humans. **Am. J. Renal Physiol.**, v.282, p. 271-80, 2002.

RATYCH, R.E.; BULKLEY, G.B. Free radical – mediated post-ischemic reperfusion injury in the kidney. **J. Free Radic. Biol. Med.**, v. 2, p. 311-19, 1986.

RAW, I.; HO, P.L. **Integração e seus sinais**. 1ª edição. São Paulo. 1999.

RICHARDS-KORTUM, R.; DREZEK, R.; SOKOLOV, K.; PAVLOVA, I.; FOLLEN, M. Survey of endogenous biological fluorophores. In: MYCEK M.A.; POGUE B.W. **Handbook of biomedical fluorescence**. New York, Marcel Dekker, Cap. 8, p. 237-64, 2003.

RIERA, M.; HERRERO, I.; TORRAS, J.; CRUZADA, J.M.; FATJO, M.; LLOBERAS, N.; ALSINA, J.; GRINYO, J.M. Ischemic preconditioning improves post-ischemic acute renal failure. **Transplantation Proc.**, v. 31, p. 2346-7, 1999.

ROSE, B.D.; RENNKE, H.G. **Fisiopatologia Renal**. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda; 1999.

ROSS, S.; FOEX, P. Protective effects of anaesthetics in reversible and irreversible ischaemia-reperfusion injury. **British J. Anaesth.**, v. 82, p. 622-32, 1999.

SAVILL, J. Kidney Apoptosis in resolution of inflammation. **Blood Press. Res.** v. 23, p. 73-4, 2000.

SCHRIER, R.W.; WANG, W.; POOLE B.; MITRA A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. **J. Clin. Invest.**, v. 114, p. 5-14, 2004.

SCHULMAN, G.; FOGO, A.; GUNG, A.; BADR, K.; HAKIM, R. Complement activation retards resolution of acute ischemic renal failure in the rat. **Kidney Int.**, v. 40, p. 1069-74, 1991.

SENER, G.; SEHIRLI, Ö.; VELIOGLU-ÖGÜNÇ, A.; CETINEL, S.; GEDIK, N.; CANER, M.; SAKARCAN, A.; YEGEN, B.C. Montelukast protects against renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Pharmacol. Res.**, v. 54, p. 65-71, 2006.

SHEHADA, R.E.N.; MARMARELIS, V.Z.; MANSOUR, H.N.; GRUNDFEST, W.S. Laser induced fluorescence attenuation spectroscopy: Detection of hypoxia. **IEEE Trans. Biomed. Eng.**, v. 47, n. 3, p. 301-12, 2000.

SIMÕES, M.L.P.B. Ética e legislação da pesquisa clínica e experimental. **Isquemia cerebral experimental**. In: Silva Jr OC, Zucoloto S, Beer Jr A. Modelos Experimentais de Pesquisa em Cirurgia. Editora Robe, São Paulo, capítulo 03, p. 149-58, 1998.

SINGH, D.; CHOPRA, K. Effect of trimetazidine on renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Pharmacol. Res.** v. 50, p. 623-9, 2004.

SINGH, V.K.; RAI, A.K. Prospect for laser-induced breakdown spectroscopy for biomedical applications: a review. **Lasers Med. Science**, v. 26, n. 5, p. 673-87, 2011.

SOLEZ, K.; COLVIN, R.B.; RACUSEN, L.C., et al. Banff's 2005 meeting report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ("CAN"). **Am. J. Transplant.**, v. 7, n. 3, p. 518-26, 2007.

SOUZA, M.E.J.; SILVA JR, O.C. Ciclo de Krebs e a função mitocondrial. In: Castro e Silva Jr. O.; Zucoloto S.; Beer Jr. A. **Modelos experimentais de pesquisa em Cirurgia**. São Paulo. 1ª Ed., Robe Editorial, p.145-58, 1998.

SPENCER, A.J.; LEFURGEY, A.; INGRAM, P.; MANDEL, L.J. Elemental microanalysis of organelles in proximal tubules. Effects of oxygen deprivation. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 1, p. 1321-33, 1991.

THADHANI, R.; PASCUAL, M.; BONVENTRE, J.V. Acute renal failure. **N. England J. Med.**, v. 334, p. 1448-60, 1996.

TILNEY, N.L.; KUSAKA, M.; PRATSCHKE, J.; WILHELM, M. Chronic rejection. **Transplant. Proc.**, v. 30, p. 1590-4, 1998.

TIRAPELLI, L.F.; TRAZZI, B.F.M.; BAGNATO, V.S., et al. Histopathology and laser autofluorescence of ischemic kidneys of rats. **Lasers Med. Sci.**, v. 24, p. 397-404, 2009.

TORONYI, E.; REMPORT, A.; JÁRAY, J.; MÁTHÉ, Z.; BORKA, P.; PERNER, F. Evaluation of various immunosuppressive regimes in second renal transplants. **Transplant. Proc.**, v. 33, p. 2315-6, 2001.

TORRAS, J.; CRUZADO, J.M.; GRINYO, J.M. Ischemia and reperfusion injury in transplantation. **Transplant. Proc.**, v. 31, p. 2217-8, 1999.

TORRAS, J.; HERRERO-FRESNEDA, I.; LLOBERAS, N.; RIERA, M.; CRUZADO J.M.; GRINYO J.M. Promising effects of ischemic preconditioning in renal transplantation. **Kidney Internat.**, v. 61, p. 2218-27, 2002.

TSAI, T.; CHEN, H.M.; WANG, C.Y.; TSAI, J.C.; CHEN, C.T.; CHIANG, C.P. In vivo autofluorescence spectroscopy of oral premalignant and malignant lesions: distortion of fluorescence intensity by submucous fibrosis. **Lasers Surg. Med.**, v. 33, p. 40-47, 2003.

VANNUCCHI, H.; IGLESIAS, A.C.; MORANDI, M. Determinação de radicais livres em ensaios biológicos. In: Castro e Silva Jr., O.; Zucoloto, S.; Beer Jr., A. **Modelos experimentais de pesquisa em Cirurgia**. São Paulo:1ª Ed., Robe Editorial; p. 159-71, 1998.

VOLLET, FILHO J.D. Identificação e quantificação de fotossensibilizador em tecido hepático por espectroscopia de fluorescência e sua importância na terapia fotodinâmica. 2007. 95 f. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) Instituto de Física de São Carlos, USP, São Carlos, 2007.

WAGNIÈRES, G.A.; STAR, W.M.; WILSON, B.C. In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. **Photochem. Photobiol.**, v. 68, n. 5, p. 603-32, 1998.

WANG, C.Y.; TSAI, T.; CHEN, H.M.; CHEN, C.T.; CHIANG, C.P. PLS-ANN based classification model for oral submucous fibrosis and oral carcinogenesis. **Lasers Surg. Med.**, v. 32, p. 318-26, 2003.

WIJNEN, R.M.; BOOSTER, M.H.; STUBENITSKY, B.M., et al. Outcome of transplantation of nonheart-beating donor kidneys. **Lancet**, v. 345, p. 1067-70, 1995.

WU, J.; FELD, M.S.; RAVA, R.P. Analytical model for extracting intrinsic fluorescence in turbid media. **Appl. Optics**, v. 32, n. 19, p. 3585-95, 1993.

YARLAGADDDA, S.G.; COCA, S.G.; FORMICA, R.N.JR. et al. Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 24, p. 1039-47, 2009.

YOKOYAMA, Y.; BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W., et al. Circulation xanthine-oxidase: potential mediator of ischemic injury. **Am. J. Physiol.**, v. 258, p. 564-70, 1990.

YU, L. **Contribuição ao estudo da fisiologia da lesão celular isquêmica renal: importância dos radicais livres do oxigênio, cálcio, e óxido nítrico.** Tese (Livre Docência), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 109 p., 1998.

ZAAK, D.; STEPP, H.; BAUMGARTNER, R., et al. Ultraviolet-excited (308nm) autofluorescence for bladder cancer detection. **Urology**, v. 60, p. 1029-33, 2002.

ZHANG, Q.G. Turbidity-free fluorescence spectroscopy of biological tissue. **Opt. Lett.**, v. 25, n. 19, p. 1451-3, 2000.

ZULUAGA, A.F.; UTZINGER, U.; DURKIN, A.; FUCHS, H.; GILLENWATER A.N.; JACOB, R.; KEMP, B.; FAN, J.; RICHARDS-KORTUM R. Fluorescence excitation emission matrices of human tissue: a system for in vivo measurement and method of data analysis. **Appl. Spectrosc.**, v. 53, n. 3, p. 302-11, 1999.

ANEXO

ANEXO

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 041/2010, sobre o projeto intitulado “*Ação do laser na isquemia renal normotérmica em ratos: análise cintilográfica e histológica*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Silvio Tucci Junior** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 26 de abril de 2010.

(We certify that the protocol nº 041/2010, about “*Scintigraphic and histopathological analysis of laser therapy in normothermic renal ischemia in rats*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved “*ad referendum*” by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 04/26/2010 meeting.

Ribeirão Preto, 26 de abril de 2010.

Prof. Dr. Márcio Dantas
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal

APÊNDICES

APÊNDICES

Apêndice A. Preparo do Material para o Estudo Histológico:

Após a fixação, o material foi lavado em álcool 70% por diversas vezes, com o objetivo de auxiliar na remoção do excesso do líquido fixador. Em seguida, as amostras foram submetidas às seguintes etapas:

- 1) Desidratação: passagem das amostras em banhos de álcool etílico de concentrações crescentes de 70%, 80%, 90%, 95% I, 95% II, 100% I e 100% II, durante o período de uma hora cada.
- 2) Diafanização ou clareamento: substituição do álcool presente no tecido por um líquido miscível tanto em etanol quanto em parafina, o xilol. Nessa etapa, banhos em álcool-xilol (por 20 minutos), xilol I (20 minutos) e xilol II (20 minutos), foram realizados, tornando assim as peças translúcidas.
- 3) Embebição em parafina: com o objetivo de substituir o xilol presente no tecido por parafina, as peças foram mergulhadas sucessivamente em três cubas contendo parafina fundida na estufa a 60°C, por 30 minutos em cada uma das cubas.
- 4) Inclusão em parafina: nessa etapa final, os fragmentos foram colocados em recipientes de formato retangular contendo parafina fundida (parafina III), e orientados em posição adequada para a obtenção dos cortes. Esse procedimento foi realizado com o auxílio de uma pinça previamente aquecida,

evitando-se assim a formação de bolhas nas peças e na parafina fundida.

Posteriormente, os recipientes foram deixados à temperatura ambiente para solidificação durante 24 horas, permitindo assim que os cortes pudessem ser feitos com preservação total do tecido renal nele incluído.

Após a inclusão do material, cortes histológicos com 5µm de espessura foram realizados, utilizando-se um micrótomo rotativo Reichert Jung 2040. Estes foram transferidos para um recipiente contendo álcool 50% para facilitar sua distensão. Os cortes histológicos foram então colocados em “banho maria”, a uma temperatura de 40°C, contendo bicromato de potássio e gelatina para evitar seu descolamento da lâmina. Após isto, os cortes foram recolhidos em lâminas previamente identificadas.

Secagem: as lâminas com os cortes histológicos foram transferidas para uma estufa a 60°C, permanecendo no mínimo 24 horas, para a posterior coloração. As colorações utilizadas foram:

A) Coloração de rotina: Hematoxilina & Eosina (HE).

B) Coloração especial: Tricrômico de Masson, para observar individualmente os constituintes do tecido renal (túbulos, glomérulos, tecido conjuntivo e vasos sanguíneos).

APÊNDICE B. Tempo de Isquemia = 30 minutos

Correlations^a		
		Grad. Patologia
Grad. Patologia	Correlation	1,000
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	.
	N	11
Auto FL 408_PS	Correlation	,258
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,443
	N	11
Auto FL 408_ M	Correlation	,258
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,443
	N	11
Auto FL 408_ PI	Correlation	,258
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,443
	N	11
Isq. 408_PS	Correlation	,258
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,443
	N	11
Isq. 408_M	Correlation	,194
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,568
	N	11
Isq. 408_PI	Correlation	,258
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,443
	N	11
Rep. 408_PS	Correlation	,258
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,443
	N	11

Continua....

		Correlation	,258
		Coefficient	
Rep. 408_M	Sig. (2-tailed)		,443
	N		11
Rep. 408_PI	Correlation		,258
	Coefficient		
	Sig. (2-tailed)		,443
	N		11
Auto FL 442_PS	Correlation		,129
	Coefficient		
	Sig. (2-tailed)		,705
	N		11
Auto FL 442_M	Correlation		,065
	Coefficient		
	Sig. (2-tailed)		,850
	N		11
Auto FL 442_PI	Correlation		,129
	Coefficient		
	Sig. (2-tailed)		,705
	N		11
Isq. 442_PS	Correlation		-,065
	Coefficient		
	Sig. (2-tailed)		,850
	N		11
Isq. 442_M	Correlation		-,065
	Coefficient		
	Sig. (2-tailed)		,850
	N		11
Isq. 442_PI	Correlation		-,065
	Coefficient		
	Sig. (2-tailed)		,850
	N		11
Rep. 442_PS	Correlation		-,194
	Coefficient		
	Sig. (2-tailed)		,568
	N		11

Continuação...

	Correlation	-,194
	Coefficient	
Rep. 442_M	Sig. (2-tailed)	,568
	N	11
	Correlation	-,194
	Coefficient	
Rep. 442_PI	Sig. (2-tailed)	,568
	N	11
	Correlation	,065
	Coefficient	
Auto FL	Sig. (2-tailed)	,850
532_PS	N	11
	Correlation	,065
	Coefficient	
Auto FL 532_M	Sig. (2-tailed)	,850
	N	11
	Correlation	,065
	Coefficient	
Auto FL 532_PI	Sig. (2-tailed)	,850
	N	11
	Correlation	,000
	Coefficient	
Isq. 532_PS	Sig. (2-tailed)	1,000
	N	11
	Correlation	,000
	Coefficient	
Isq. 532_M	Sig. (2-tailed)	1,000
	N	11
	Correlation	,000
	Coefficient	
Isq. 532_PI	Sig. (2-tailed)	1,000
	N	11
	Correlation	-,065
	Coefficient	
Rep. 532_PS	Sig. (2-tailed)	,850
	N	11

Continuação...

Rep. 532_M	Correlation	-,065
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,850
	N	11
Rep. 532_PI	Correlation	-,065
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,850
	N	11

Conclusão.

APÊNDICE C. Tempo de Isquemia = 60 minutos

Correlations^a		
		Grad. Patologia
Grad. Patologia	Correlation	1,000
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	.
	N	10
Auto FL 408_PS	Correlation	,426
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,219
	N	10
Auto FL 408_ M	Correlation	,355
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,314
	N	10
Auto FL 408_ PI	Correlation	,426
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,219
	N	10
Isq. 408_PS	Correlation	-,071
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,845
	N	10
Isq. 408_M	Correlation	-,142
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,695
	N	10
Isq. 408_PI	Correlation	-,142
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,695
	N	10
Rep. 408_PS	Correlation	,284
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,426
	N	10

Continua....

Rep. 408_M	Correlation	,284
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,426
	N	10
Rep. 408_PI	Correlation	,284
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,426
	N	10
Auto FL	Correlation	-,497
	Coefficient	
442_PS	Sig. (2-tailed)	,143
	N	10
Auto FL	Correlation	-,535
	Coefficient	
442_M	Sig. (2-tailed)	,111
	N	10
Auto FL	Correlation	-,497
	Coefficient	
442_PI	Sig. (2-tailed)	,143
	N	10
Isq. 442_PS	Correlation	-,426
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,219
	N	10
Isq. 442_M	Correlation	-,426
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,219
	N	10
Isq. 442_PI	Correlation	-,426
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,219
	N	10
Rep. 442_PS	Correlation	-,284
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,426
	N	10
Rep. 442_M	Correlation	-,284
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,426
	N	10

Continuação...

		Correlation	-,213
		Coefficient	
Rep. 442_PI	Sig. (2-tailed)		,554
	N		10
Auto FL 532_PS	Correlation		,213
	Coefficient		
	Sig. (2-tailed)		,554
	N		10
Auto FL 532_ M	Correlation		,284
	Coefficient		
	Sig. (2-tailed)		,426
	N		10
Auto FL 532_ PI	Correlation		,285
	Coefficient		
	Sig. (2-tailed)		,425
	N		10
Isq. 532_PS	Correlation		,213
	Coefficient		
	Sig. (2-tailed)		,554
	N		10
Isq. 532_M	Correlation		,142
	Coefficient		
	Sig. (2-tailed)		,695
	N		10
Isq. 532_PI	Correlation		,284
	Coefficient		
	Sig. (2-tailed)		,426
	N		10
Rep. 532_PS	Correlation		,569
	Coefficient		
	Sig. (2-tailed)		,086
	N		10
Rep. 532_M	Correlation		,569
	Coefficient		
	Sig. (2-tailed)		,086
	N		10
Rep. 532_PI	Correlation		,569
	Coefficient		
	Sig. (2-tailed)		,086
	N		10

Conclusão.

APÊNDICE D. Tempo de Isquemia = 120 minutos

Correlations^a		
		Grad. Patologia
Grad. Patologia	Correlation	1,000
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	.
	N	12
Auto FL 408_PS	Correlation	-,259
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,416
	N	12
Auto FL 408_ M	Correlation	-,259
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,416
	N	12
Auto FL 408_ PI	Correlation	-,259
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,416
	N	12
Isq. 408_PS	Correlation	-,453
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,139
	N	12
Isq. 408_M	Correlation	-,453
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,139
	N	12
Isq. 408_PI	Correlation	-,454
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,138
	N	12
Rep. 408_PS	Correlation	-,065
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,841
	N	12

Continuação...

	Correlation	-,065
	Coefficient	
Rep. 408_M	Sig. (2-tailed)	,841
	N	12
	Correlation	-,065
	Coefficient	
Rep. 408_PI	Sig. (2-tailed)	,841
	N	12
	Correlation	,130
	Coefficient	
Auto FL	Sig. (2-tailed)	,688
442_PS	N	12
	Correlation	,130
	Coefficient	
Auto FL	Sig. (2-tailed)	,688
442_M	N	12
	Correlation	,130
	Coefficient	
Auto FL	Sig. (2-tailed)	,688
442_PI	N	12
	Correlation	,065
	Coefficient	
Isq. 442_PS	Sig. (2-tailed)	,841
	N	12
	Correlation	,065
	Coefficient	
Isq. 442_M	Sig. (2-tailed)	,841
	N	12
	Correlation	,065
	Coefficient	
Isq. 442_PI	Sig. (2-tailed)	,841
	N	12
	Correlation	,518
	Coefficient	
Rep. 442_PS	Sig. (2-tailed)	,084
	N	12
	Correlation	,518
	Coefficient	
Rep. 442_M	Sig. (2-tailed)	,084
	N	12

Continuação...

	Correlation	,518
	Coefficient	
Rep. 442_PI	Sig. (2-tailed)	,084
	N	12
Auto FL	Correlation	-,065
	Coefficient	
532_PS	Sig. (2-tailed)	,841
	N	12
Auto FL 532_	Correlation	-,065
	Coefficient	
M	Sig. (2-tailed)	,841
	N	12
Auto FL 532_	Correlation	-,065
	Coefficient	
PI	Sig. (2-tailed)	,841
	N	12
Isq. 532_PS	Correlation	,065
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,841
	N	12
Isq. 532_M	Correlation	,065
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,841
	N	12
Isq. 532_PI	Correlation	,065
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,841
	N	12
Rep. 532_PS	Correlation	,130
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,688
	N	12
Rep. 532_M	Correlation	,130
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,688
	N	12
Rep. 532_PI	Correlation	,130
	Coefficient	
	Sig. (2-tailed)	,688
	N	12

Conclusão.