



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE HUMANA E
ANIMAL

RÔMULO DA COSTA FARIAS

SOLUÇÃO À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ PARA PRESERVAÇÃO
ESTÁTICA HIPOTÉRMICA DE RINS DE COELHO

FORTALEZA – CEARÁ

2017

RÔMULO DA COSTA FARIAS

SOLUÇÃO À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ PARA PRESERVAÇÃO
ESTÁTICA HIPOTÉRMICA DE RINS DE COELHO

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ivelise Regina Canito Brasil.

FORTALEZA – CEARÁ

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Farias, Rômulo da Costa.

Solução à base de água de coco em pó para preservação estática hipotérmica de rins de coelho [recurso eletrônico] / Rômulo da Costa Farias. – 2017.

1 CD-ROM: il.; 4 ¼ pol.

CD-ROM contendo o arquivo em formato PDF do trabalho acadêmico com 55 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Dissertação (mestrado profissional) – Universidade Estadual do Ceará, Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Fortaleza, 2017.

Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientação: Profa. Dra. Ivelise Regina Canito Brasil.

Coorientação: Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento.

1. Preservação de órgãos. 2. Transplante renal. 3. Água de coco em pó. 4. Solução de preservação. I. Título.

RÔMULO DA COSTA FARIAS

SOLUÇÃO À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ PARA PRESERVAÇÃO
ESTÁTICA HIPOTÉRMICA DE RINS DE COELHO

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovado em: 8 de dezembro de 2017

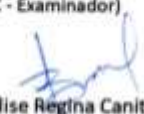
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Ivelise Regina Canito Brasil (UECE - Presidente)




Prof. Dr. João Batista Gadelha de Cerqueira
(UFC - Examinador)



Prof. Dra. Ivelise Regina Canito Brasil
Coordenadora Geral



Prof. Dr. Rommel Prata Regadas (UECE - Examinador)



Prof. Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro
(CESMAC/MPBiotec - Examinadora)

Aos meus pais: Francy e Quintino Farias.

À minha esposa Vanessa Farias.

Às minhas filhas Júlia e Isabela Farias.

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Quintino e Francly Farias, pelo apoio incondicional desde os tempos de escola sempre me incentivando a realizar os meus sonhos.

À minha amada e atenciosa esposa, Vanessa Farias, por estar sempre ao meu lado me apoiando em todas as situações, me presenteando com sua existência.

Às minhas queridas e carinhosas filhas, Júlia e Isabela, por me ensinarem a cada dia o valor de ser um pai presente e uma pessoa melhor.

Ao Prof. Dr. José Ferreira Nunes, pelo espírito inovador e agregador ao idealizar o Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal (MPBiotec) e nos dar a oportunidade de crescer profissionalmente.

À Prof.^a Dr.^a Cristiane Clemente de Mello Salgueiro, pelos ensinamentos e por sempre estar disponível para sanar nossos infindáveis questionamentos. Junto com o professor Nunes, idealizou o MPBiotec.

À Prof.^a Dr.^a Ivelise Regina Canito Brasil, pela amizade e por participar ativamente de todas as fases desse projeto. Além de orientadora, um exemplo de profissional e de atenção aos pacientes.

Aos meus colegas do MPBiotec, pelo companheirismo nos momentos de dificuldade e de descontração.

Ao Dr. João Paulo Uchôa Fontenele, pela atenção e competência nas análises patológicas.

Ao Dr. Rômulo Augusto da Silveira, pela oportunidade de fazer parte deste seleto grupo de profissionais e pelas palavras de sabedoria que só a experiência ensina.

À Prof.^a Dr.^a Adriana da Rocha Tomé, pelo empenho e entusiasmo nas primeiras fases do projeto, imprescindíveis em nossa caminhada.

Aos professores do MPBiotec, pelos ensinamentos e pela orientação nas diversas disciplinas.

Aos acadêmicos Samuel Roque Alves, Lucas Medeiros Lopes, Bianca Rohsner Bezerra e Igor Farias, à colega de mestrado Raquel Lima Sampaio e ao Doutorando Marcimar Silva Sousa, pela participação ativa na realização dos experimentos, sem a qual não teríamos logrado êxito.

“A parte que ignoramos é muito maior que tudo quanto sabemos”.

(Platão)

RESUMO

O transplante renal é a única forma de livrar o paciente com doença renal crônica terminal da terapia renal substitutiva. Para ser efetivada a doação do órgão, além da questão legal e da compatibilidade entre doador e receptor, a logística de preservação do rim até o implante é fundamental. Nesse contexto, as soluções de preservação foram incorporadas às técnicas de preservação e permanecem como um fundamento essencial na manutenção de órgãos para transplantes. Este estudo teve como objetivo analisar a viabilidade de rins de coelho após preservação estática em solução hipotérmica à base de água de coco em pó através de análise morfológica. Os experimentos foram realizados no Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) da Universidade Estadual do Ceará (UECE) utilizando-se a solução da Universidade Wisconsin (UW) como padrão ouro e uma solução à base de água de coco em pó (ACP-405). Foi realizada perfusão *in situ* dos rins de 12 coelhos, retirada dos órgãos e manutenção nas respectivas soluções hipotérmicas em tempos pré-determinados. Constatou-se que, após avaliação histopatológica nos tempos 0h, 6h, 12h e 18h de isquemia fria, a preservação utilizando solução ACP-405 pode ser viável. A partir dos resultados positivos, estudos deverão ser direcionados no intuito de estudar as lesões com métodos mais refinados e associados a um modelo de reperfusão *in vitro* com animais de maior porte e maior semelhança ao rim humano.

Palavras-chave: Preservação de órgãos. Transplante renal. Água de coco em pó. Solução de preservação.

ABSTRACT

Renal transplantation is the only way to relieve patients with end-stage renal disease from renal replacement therapy. In order to be effective, the donation of the organ, besides the legal question and the compatibility between donor and recipient, the logistics of preservation of the kidney until the implant is fundamental. In this context, preservation solutions have been incorporated into preservation techniques and remain an essential foundation in the maintenance of organs for transplants. This study aimed to analyze the viability of rabbit kidneys after static preservation in hypothermic solution based on powdered coconut water through morphological analysis. The experiments were carried out at the Integrated Nucleus of Biotechnology (NIB) of the State University of Ceará (UECE) using the University of Wisconsin[®] (UW) solution as a gold standard and a solution based on powdered coconut water (ACP-405). It was performed an *in situ* perfusion of the kidneys of 12 rabbits, removal of the organs and maintenance in the respective hypothermic solutions at predetermined times. It was observed that, after histopathological evaluation in the time intervals 0h, 6h, 12h and 18h of cold ischemia, the preservation using ACP-405 solution may be viable. From the positive results, studies should be directed in order to study the lesions through methods that are more refined and associated with an *in vitro* reperfusion model with larger animals and greater similarity to the human kidney.

Keywords: Organ preservation. Kidney transplantation. Powdered coconut water. Preservation solution.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Repercussão da isquemia em nível celular e molecular...	20
Figura 2 -	Repercussão da reperfusão em nível celular e molecular..	21
Figura 3 -	Ilustração do glomérulo.....	23
Figura 4 -	Coco fixado em malha tubular e conectado a equipo para administração parenteral <i>in natura</i>.....	27
Figura 5 -	Aorta abdominal e veia cava inferior.....	33
Figura 6 -	Estruturas vasculares isoladas e reparadas.....	34
Figura 7 -	Aorta infradiafragmática.....	35
Figura 8 -	Estruturas vasculares canuladas: aorta abdominal e veia mesentérica superior.....	36
Figura 9 -	Desenho esquemático do experimento.....	38
Figura 10 -	Foto ilustrando o grau de intensidade 0, ausência de lesão (HE, 400x).....	39
Figura 11 -	Foto ilustrando o grau de intensidade 2, com edema tubular severo e núcleos picnóticos, setas (HE, 400x).....	40
Figura 12 -	Foto ilustrando o grau de intensidade 3, com áreas de necrose tubular. Perda da basofilia nuclear dos túbulos, setas (HE, 400x).....	40
Quadro 1 -	Classificação da insuficiência renal crônica em estágios..	17
Quadro 2 -	Composição das soluções de preservação e da ACP-405.	25
Quadro 3 -	Composição bioquímica da água de coco em pó (ACP-405) por 100 g.....	31

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Intensidade e extensão das lesões morfológicas com solução UW como meio de preservação nos tempos 0, 6, 12 e 18 horas no primeiro experimento..... 42**
- Tabela 2 - Intensidade e extensão das lesões morfológicas com ACP- 405 como meio de preservação nos tempos 0, 6, 12 e 18 horas no segundo experimento..... 43**
- Tabela 3 - Intensidade e extensão das lesões morfológicas com ACP-405 como meio de preservação nos tempos 0, 6, 12 e 18 horas no terceiro experimento..... 44**
- Tabela 4 - Mediana dos escores finais entre a solução UW, ACP1 e ACP2 nos tempos de preservação de 0, 6, 12 e 18 horas... 45**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTO	Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
ACP	Água de coco em pó
ATP	Trifosfato de adenosina
DGF	Retardo da função do enxerto
DM	Diabetes mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HE	Hematoxilina-Eosina
HTK	Histidina-Triptofano-Ketogluturato
IL	Interleucina
LDH	Lactato desidrogenase
RNA	Ácido ribonucleico
TFG	Taxa de filtração glomerular
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UW	Universidade Wisconsin

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	JUSTIFICATIVA	15
3	HIPÓTESES	16
4	REVISÃO DE LITERATURA	17
4.1	INSUFICIÊNCIA RENAL E TRANSPLANTE RENAL.....	17
4.2	PRESERVAÇÃO RENAL.....	19
4.3	SOLUÇÕES DE PRESERVAÇÃO.....	22
4.4	ÁGUA DE COCO.....	26
5	OBJETIVOS	29
5.1	GERAL.....	29
5.2	ESPECÍFICOS.....	29
6	METODOLOGIA	30
7	RESULTADOS	41
8	DISCUSSÃO	46
9	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49
	ANEXO	54
	ANEXO A – APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA).....	55

1 INTRODUÇÃO

O princípio da preservação de órgãos durante isquemia e reperfusão inclui o combate à acidose, a manutenção do volume celular, a ótima utilização da reserva de energia anaeróbica e finalmente a manutenção da estrutura celular, que é necessária para preservação do órgão transplantado.

A preservação de órgãos atualmente pode ser realizada de maneira estática ou dinâmica. Na preservação estática o órgão permanece sob hipotermia mergulhado na solução de preservação. Na preservação dinâmica, uma máquina realiza a perfusão ativa da solução de preservação através da vasculatura do órgão, habitualmente sob hipotermia. Estuda-se a preservação dinâmica sob normotermia como saída para se evitar as lesões relacionadas à hipotermia (HOSGOOD; VAN HEURN; NICHOLSON, 2015).

As soluções de preservação podem ser divididas basicamente em dois tipos: as soluções intracelulares, que simulam a concentração iônica do meio intracelular e as soluções extracelulares, que simulam o meio extracelular. São exemplos de soluções intracelulares as soluções de Euro-Collins® e da Universidade Wisconsin (UW). Representando as soluções extracelulares temos as soluções de Celsior® e HTK (Histidina-Triptofano-Ketoglutarato).

Vários estudos têm demonstrado a eficiência da água de coco no tocante à preservação de células e tecidos. Considerando que a água de coco se constitui em um promissor produto biotecnológico atualmente estudado na conservação de órgãos e tecidos, e a necessidade de novos e mais esclarecedores estudos sobre o tema, propõe-se nesta pesquisa avaliar *in vitro* sua eficácia enquanto meio conservante de órgãos.

2 JUSTIFICATIVA

O Brasil, como país em desenvolvimento com graves problemas sociais, necessita fazer uso racional e responsável dos recursos públicos nas diversas áreas. Uma área fundamental é a saúde pública, um grande desafio para os gestores nas três esferas de governo. O transplante de órgãos representa uma importante política de democratização da saúde, trazendo melhora da qualidade e da expectativa de vida dos transplantados. Desta forma, esforços devem ser concentrados no sentido de se oferecer a melhor assistência possível a um custo racional.

Na preservação do órgão, da captação ao implante, são utilizadas soluções de preservação, todas elas importadas. Isso representa um custo elevado ao sistema de saúde. Segundo o Portal da Transparência do Governo do Estado do Ceará, 01 (um) litro da solução de perfusão padrão, SPS1[®], com a mesma composição da solução UW, custa US\$ 230 (duzentos e trinta dólares). Em uma captação de múltiplos órgãos, por exemplo, fígado e rins, a mais corriqueira, são utilizados aproximadamente 06 (seis) litros de solução. Se forem retirados o coração e os pulmões, acrescentem-se mais 06 (seis) litros, além de mais 01 (um) litro para o pâncreas, em média. Portanto, são utilizados de 06 a 13 (seis a treze) litros de solução de preservação em uma única captação. Usando-se a solução padrão, esse custo chega a algo entre R\$ 4.498,00 e R\$ 9.747,00 (1 dólar = 3,26 reais).

3 HIPÓTESES

Com a necessidade de se encontrar uma solução equivalente em eficácia, porém economicamente viável, surgem as seguintes hipóteses:

- O meio de preservação à base de água de coco em pó (ACP-405) reconstituído será capaz de conservar a qualidade do enxerto renal.
- O meio de preservação à base de água de coco em pó (ACP-405) reconstituído será capaz de conservar a qualidade do enxerto renal armazenado a 4 °C por 18 horas em rins de coelho.
- A preservação de rins em meio de preservação à base de água de coco em pó (ACP-405) reconstituído obterá resultados equivalentes aos encontrados pela preservação em solução da Universidade Wisconsin.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 INSUFICIÊNCIA RENAL E TRANSPLANTE RENAL

A insuficiência renal é uma doença com altas taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Apresenta geralmente evolução lenta devido a perda da função renal gradual relacionada à diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG) (BARROS *et al.*, 1994; GARCIA *et al.*, 2006). As principais causas de insuficiência renal em nosso meio são hipertensão arterial sistêmica (HAS) e *diabetes mellitus* (DM), seguidas pelas glomerulopatias (ROMÃO JR., 2004). Essa realidade é suportada pela deficiência na atenção básica à saúde da população, levando doenças controláveis e preveníveis a trazer consequências nefastas à saúde.

A insuficiência renal tem cinco estágios evolutivos, de acordo com a taxa de filtração glomerular, classificação ilustrada no Quadro 1. O estágio 5 (cinco) representa o grau terminal da doença, quando a TFG está abaixo de 15 (quinze) ml/min. e há necessidade de se instituir a terapia renal substitutiva ou diálise, via de regra (K/DOQUI, 2002).

Quadro 1 - Classificação da insuficiência renal crônica em estágios

Estágio	Filtração Glomerular (ml/min.)	Grau de Insuficiência Renal
0	> 90	Grupos de risco para DRC
1	> 90	Lesão renal com função renal normal
2	60-89	IR leve ou funcional
3	30-59	IR moderada ou laboratorial
4	15-29	IR grave ou clínica
5	< 15	IR terminal ou dialítica

Fonte: Adaptado de K/DOQUI (2002). IR = Insuficiência Renal; DRC = Doença Renal Crônica.

O transplante renal é a única forma de tratamento capaz de livrar o portador de doença renal terminal da terapia renal substitutiva (DUNN *et al.*, 1996). Representa o tratamento de eleição para a maioria dos pacientes com insuficiência renal em estágio terminal, pois permite o retorno a um estilo de vida mais próximo da realidade, diminui a mortalidade, além de ter um melhor custo benefício para o sistema de saúde (EVANS *et al.*, 1985; MEDELOFF *et al.*, 2004; RUSSEL *et al.*, 1992). Os receptores renais têm taxas de mortalidade inferiores comparados aos pacientes em diálise e

uma melhor qualidade de vida (WOLFE *et al.*, 1999). O gasto no primeiro ano pós-transplante é similar ao gasto com diálise, porém, no segundo ano em diante o custo diminui rapidamente, representando 40% do custo anual da diálise (LAUPACIS *et al.*, 1996; MULLINS *et al.*, 2003).

O transplante renal constitui no implante do rim de um doador vivo ou falecido em um paciente com doença renal terminal. Pode também ser indicado naqueles pacientes que estão em vias de chegar ao estágio terminal, quando é chamado de transplante preemptivo. No Brasil, a legislação permite a captação de órgãos de doadores com morte encefálica documentada por dois exames clínicos realizados por médicos distintos e um exame complementar com intervalos pré-determinados entre eles. A doação de rins inter-vivos, relacionados parentalmente ou não, depende de autorização judicial. Em ambos os casos, o transplante depende de existir compatibilidade entre doador e receptor.

O alicerce para o desenvolvimento dos transplantes de órgãos se deu com as suturas vasculares ensinadas pelo ganhador do Prêmio Nobel Alexis Carrel na virada para o século XX (DUTKOWSKI; DE ROUGEMONT; CLAVIEN, 2008). O primeiro transplante renal entre humanos foi realizado em 1933 na Ucrânia por Voronoy, porém, o receptor faleceu após 48 horas da cirurgia (HAMILTON *et al.*, 1984).

A era moderna do transplante de órgãos teve início com a realização do primeiro transplante renal de sucesso com doador vivo por Joseph Murray, em Boston, nos Estados Unidos, em dezembro de 1954, entre gêmeos homozigóticos (MURRAY; MERRILL; HARRISON, 1955). Desde então, o avanço contínuo nos campos da imunologia e da medicina tem permitido grande melhora nos resultados do transplante inicialmente com doador vivo, e nas últimas duas décadas com doador falecido (ESMERALDO; CASTELO; ESMERALDO, 2004).

De acordo com a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO), no ano de 2016 foram realizados 5.492 transplantes renais no Brasil, sendo 78% com órgãos de doadores falecidos. Esse número, aparentemente elevado, contrasta com novos 13.094 pacientes na fila de espera por um rim, totalizando, em dezembro de 2016, 21.264 pacientes em fila. Apesar do aumento a cada ano, o número de transplantes é insuficiente para a grande demanda por órgãos (ABTO, 2016).

O Brasil, em números absolutos, está em segundo lugar no número de transplantes renais no mundo, atrás dos Estados Unidos da América. O Ceará foi o 7º

Estado com maior volume de transplantes no ano de 2016, tanto em número absoluto quanto em transplantes por milhão de população, sendo o segundo do norte-nordeste. Foram realizados 258 transplantes renais realizados basicamente por duas equipes transplantadoras (ABTO, 2016).

4.2 PRESERVAÇÃO RENAL

Nesse contexto de escassez de órgãos, a preservação durante o transporte até o subsequente implante é fundamental, uma vez que os pacientes receptores podem sofrer aumento da morbidade e perda do enxerto secundária aos efeitos deletérios da isquemia do órgão. Ou seja, quanto mais o órgão demora para ser implantado, por questões logísticas inerentes à seleção dos receptores ou por conta do transporte, mais aumentam as chances de complicações.

Além disso, tem-se expandido os critérios para aceitação de doadores, cada vez mais sendo aceitos rins de doadores que até pouco tempo não eram considerados para transplante, sendo de fundamental importância uma ótima preservação (PASCUAL; ZAMORA; PIRSCH, 2008).

Esforços para melhorar a sobrevida tanto dos pacientes quanto do enxerto renal focaram em melhorar a técnica operatória, a imunossupressão e a preservação dos órgãos (LILLEHEJ *et al.*, 1964).

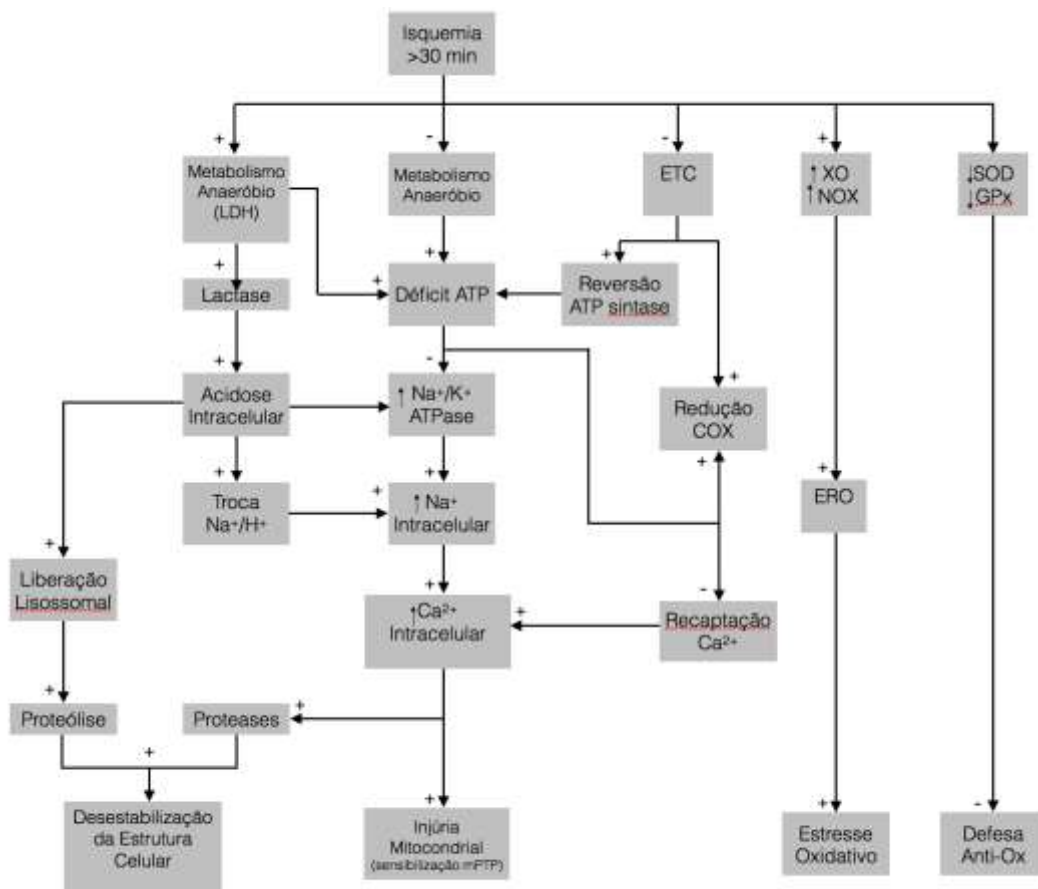
O rim é um órgão altamente sensível à isquemia pois possui uma microvasculatura muito complexa e uma grande demanda energética (ECKARDT *et al.*, 2005; LEONG *et al.*, 2007). A demanda energética fica por conta do alto consumo de oxigênio tubular para troca de solutos (ROSEN; EPSTEIN; BREZIS, 1992) e da alta taxa de glicólise aeróbica (COHEN, 1979).

O princípio da preservação de órgãos determina uma estratégia para reduzir o uso intracelular de substratos e o acúmulo de toxinas durante a isquemia (COLLINS; WICOMB, 1992). Isto foi atingido com o resfriamento do enxerto. A taxa metabólica cai pela metade a cada queda de 10 °C na temperatura, resultando uma taxa metabólica de cerca de 10 a 12% a 4 °C (SOUTHARD *et al.*, 1995).

Entretanto, só a refrigeração não foi suficiente para uma adequada preservação, pois o metabolismo celular persistia em levar à deterioração do órgão, apesar de em ritmo mais lento (HARTLEY; COLLINS; CLUNIE, 1971).

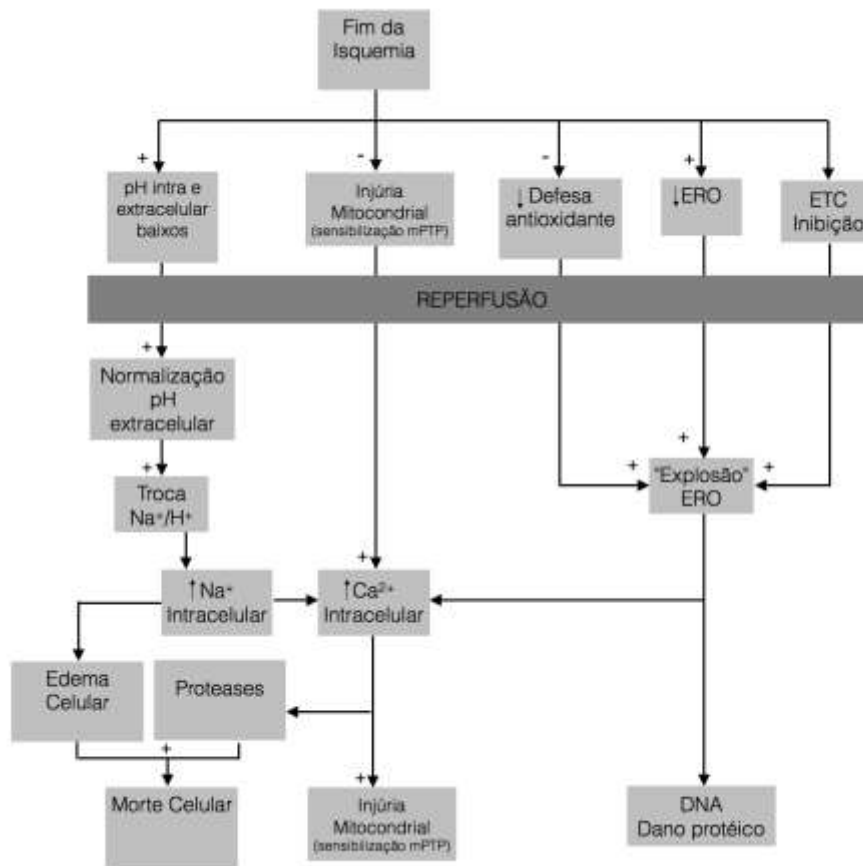
O edema celular, a acidose e a produção de espécies reativas de oxigênio quando da reperfusão são importantes efeitos colaterais. Além disso, vários fatores estão relacionados à isquemia, a saber: ativação de endonucleases, ruptura da membrana mitocondrial e ativação de vários mecanismos relacionados à apoptose. A figura 1 ilustra os acontecimentos durante a isquemia e a figura 2 durante a reperfusão.

Figura 1 - Repercussão da isquemia em nível celular e molecular



Fonte: Adaptado de CHATAURET et al. (2014). LDH = lactato desidrogenase; XO = xantinaoxidase; NOX = NADPH oxidase; ERO = espécies reativas de oxigênio; SOD = superóxido-dismutase; GPx = glutation-peroxidase; ATP = trifosfato de adenosina.

Figura 2 - Repercussão da reperfusão em nível celular e molecular



Fonte: Adaptado de CHATAURET et al. (2014).

O edema durante a hipotermia é desencadeado pela diminuição da atividade da bomba de sódio-potássio-ATPase, levando à diminuição da extrusão de sódio intracelular e consequente desequilíbrio eletrolítico com acúmulo deste íon. Com isso, há passagem de água para o meio intracelular por osmose e formação de edema.

A uma temperatura entre 0 e 4 °C, há uma rápida depleção do principal substrato energético da célula, o trifosfato de adenosina (ATP), sendo consumido cerca de 95% em quatro horas. Com isso, inicia-se o metabolismo anaeróbico, durante o qual 1 mol de glicose produz 2 mol de ATP, enquanto no metabolismo aeróbico são produzidos até 38 mol de ATP a partir da mesma quantidade de glicose. Além disso, há formação de ácido láctico levando à acidose (MARSHALL, 1997).

A contribuição da acidose para a injúria isquêmica depende do pH. Acidose importante ativa fosfolipases e proteases causando liberação de enzimas lisossomais

e eventualmente morte celular (BONVENTRE; CHEUNG, 1985). Acidose moderada, entretanto, tem sido sugerido como tendo um efeito protetor por inibir a fosfofrutoquinase durante a glicólise (BONVENTRE; CHEUNG, 1985; HOCHACHKA; MOMMSEN, 1983).

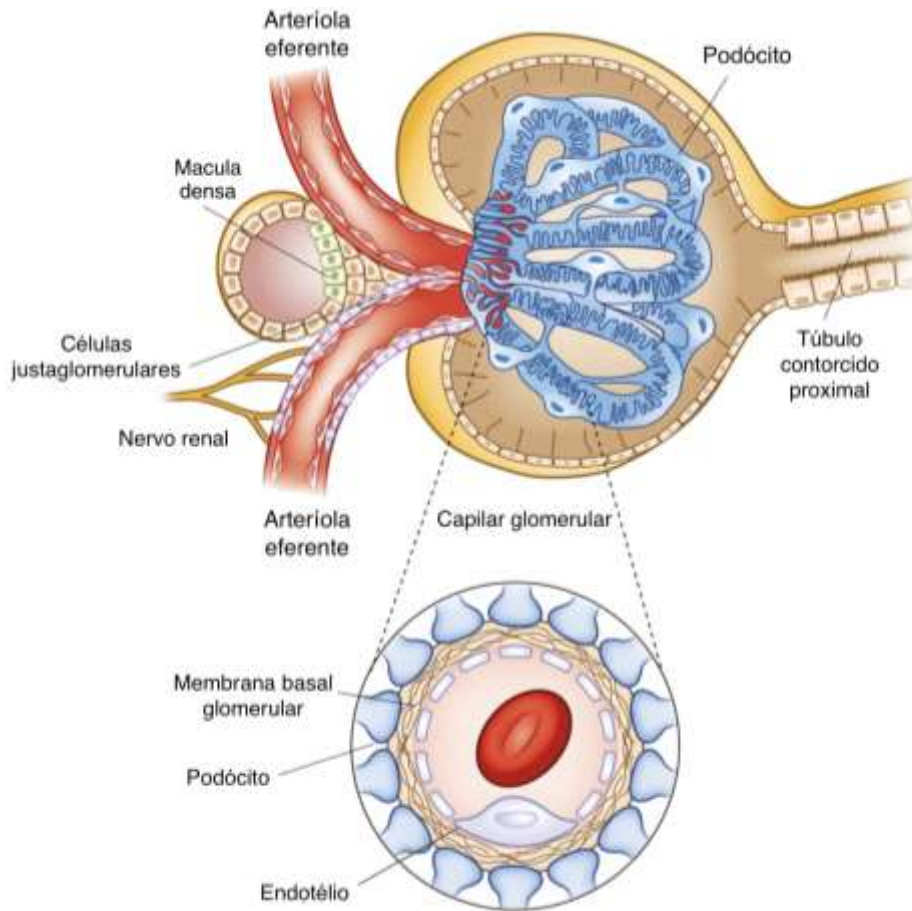
Já a produção de radicais livres, especialmente de origem mitocondrial, é reconhecidamente uma importante causa de danos intracelulares a proteínas, ácidos nucléicos, dentre outros, tanto pelo efeito da hipotermia, quanto pelos efeitos durante o período de reperfusão.

4.3 SOLUÇÕES DE PRESERVAÇÃO

Nesse cenário, as soluções de preservação foram incorporadas às técnicas de preservação e permanecem como um fundamento essencial na manutenção de órgãos para transplante. Para reduzir os efeitos indesejáveis da isquemia, as soluções de preservação incluem uma série de componentes específicos (BAICU; TAYLOR, 2002; TAYLOR, 2000).

Para uma ótima sobrevivência e preservação da função do enxerto, a manutenção da viabilidade do órgão desde a captação até o transplante é de fundamental importância (MAATHUIS; LEUVENINK; PLOEG, 2007). A preservação da função renal é diretamente relacionada à conservação de estruturas celulares. Particularmente crucial para a função renal é a barreira de filtração, que consiste em 03 (três) camadas: podócitos, membrana basal glomerular e endotélio, ilustradas na figura 3. A falência renal é baseada na lesão dessas barreiras (LEVIDIOTIS; POWER, 2005; MATHIESON, 2004).

Figura 3 - Ilustração do glomérulo



Fonte: Adaptado de POLLAK *et al.* (2014).

A preservação estática a frio permanece como o principal meio de preservação de enxertos renais em todo o mundo, a despeito dos avanços da perfusão dinâmica em máquina. A utilização da Solução da Universidade Wisconsin (UW) nesse contexto é considerada padrão ouro (BELZER; ASHBY; DUNPHY, 1967; BELZER, 1988; MAATHUIS *et al.*, 2007; PLOEG *et al.*, 1992; SOUTHARD; BELZER, 1995).

Embora empregadas nas últimas décadas, as soluções utilizadas na preservação dos enxertos não são capazes de melhorar substancialmente a qualidade dos enxertos. Uma limitação observada na solução de Wisconsin é a sua alta viscosidade, característica conhecida como capaz de causar obstrução da microvasculatura por aceleração da agregação de eritrócitos, resultando num *washout* incompleto do enxerto doador (MORARIU *et al.*, 2003; MÜHLBACHER; LANGER; MITTERMAYER, 1999).

As soluções de preservação podem ser classificadas de acordo com a sua semelhança com o meio intracelular ou extracelular, chamadas então de soluções intracelulares ou extracelulares. Inicialmente, as primeiras estratégias de preservação como as soluções de EuroCollins® e da Universidade Wisconsin tinham o objetivo de recriar um ambiente similar ao intracelular, com alta concentração de potássio e baixa concentração de sódio, para com isso prevenir o edema celular (ABOUNA *et al.*, 1971; DEMMY *et al.*, 1997).

Entretanto, estudos recentes tem sugerido iguais ou melhores resultados das soluções do tipo extracelular com baixa concentração de potássio e alta concentração de sódio, como as soluções de Celsior® e HTK (HAUET *et al.*, 2003).

A primeira solução de preservação para armazenamento à frio foi desenvolvida por G.M. Collins em 1969 (COLLINS; BRAVO-SHUGARMAN; TERASAKI, 1969) e posteriormente modificada com a retirada do magnésio da sua composição. O fosfato servia como tampão e a glicose como agente osmótico.

Em 1987, Belzer e Southard desenvolveram a solução da Universidade Wisconsin. Substratos metabólicos inertes como lactobionato e rafinose são os agentes osmóticos. Hidroxietilamido (HES) é usado como colóide. Glutathione e alopurinol servem como agentes antioxidantes e adenosina como precursor de ATP. Ainda é considerada como solução padrão ouro na preservação de rim, fígado pâncreas e intestino (PLOEG *et al.*, 1992).

Inicialmente introduzida por Bretschneider nos anos 70 como solução durante cardioplegia na cirurgia cardíaca, a solução HTK também foi testada em transplantes de rim, fígado e pâncreas (BRETSCHEIDER, 1980). A histidina funciona como um potente tampão, o triptofano como estabilizador de membranas, enquanto o cetoglutarato age como substrato energético durante o metabolismo anaeróbico. Um estudo mostrou resultados semelhantes em termos de retardo da função do enxerto (DGF) comparando HTK com UW, porém poucos dados estão disponíveis para tempos de isquemia mais prolongados, ou seja, mais de 24 h (DE BOER *et al.*, 1999).

Em 1994 foi desenvolvida a solução de Celsior® para preservação de enxertos cardíacos, porém, também demonstrou ser efetiva na preservação de órgãos abdominais (MENASCHE *et al.*, 1994; PEDOTTI *et al.*, 2004). Combinou os agentes osmóticos da solução de UW com a grande capacidade de tampão da solução HTK. A glutathione foi adicionada como antioxidante. Por isso, a solução de Celsior® tem

potencial para substituir a solução UW dependendo para isso de estudos multicêntricos bem desenhados (MAATHUIS *et al.*, 2007).

Mais recentemente, no início deste século, a solução IGL-1® (Instituto Georges Lopez) surgiu como uma combinação das soluções de Celsior® e UW (BEN ABDENNEBI; STEGHENS; HADJ-AISSA *et al.*, 2002). Estudos clínicos preliminares mostram bons resultados na preservação de enxertos renais quando comparados com a solução UW, inclusive com melhores índices de DGF. Entretanto, como o número de pacientes dos estudos é pequeno, não pode ainda ser considerada sucessora da solução UW (BADET *et al.*, 2005). O quadro 2 ilustra a composição básica das soluções de preservação.

Quadro 2 - Composição das soluções de preservação e da ACP-405

	Euro-Collins	UW	HTK	Celsior	ACP-405
Intracelular/ extracelular	Intracelular	Intracelular	Extracelular	Extracelular	Extracelular
Sódio (mol)	10	25	15	100	3
Potássio (mol)	115	120	10	15	45
Impermeabilizante	Glicose Manitol	Lactobionato Rafinose	Manitol	Lactobionato Manitol	Glicose
Tampão	Fosfato Bicarbonato	Fosfato	Histidina	Histidina	Glicina Citrato de sódio Fosfato de sódio
Antioxidante	Manitol	Alopurinol Glutationa	Triptofano Manitol Histidina	Glutationa Manitol Histidina	Ácido fólico Vitamina C
Precursor energético	–	Adenosina	Glutamato	Glutamato	Frutose Glicose

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

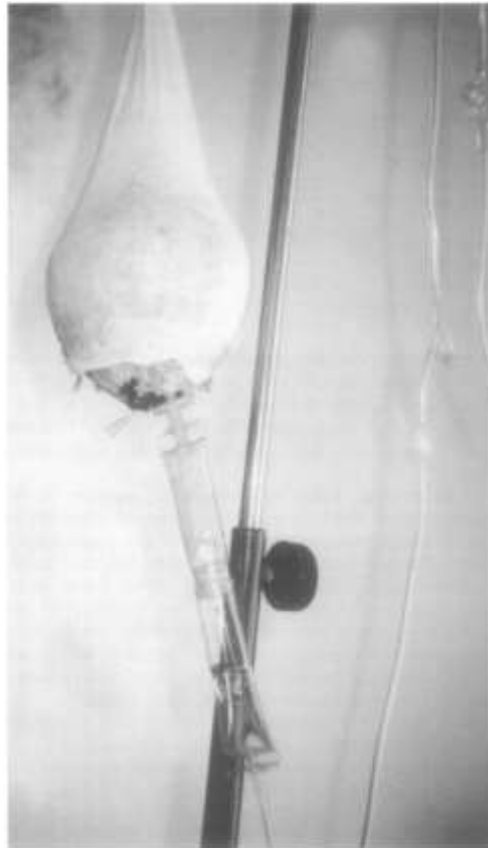
4.4 ÁGUA DE COCO

A água de coco é proveniente do fruto do coqueiro (*Cocos nucifera L.*), considerado uma cultura perene, produzindo continuamente por 60 até 70 anos (BANZON, 1990). A formação da água de coco é uma estratégia fisiológica do coqueiro, no sentido de armazenar substâncias nutritivas de reservas para serem utilizadas naturalmente como mecanismo de sobrevivência da espécie, na nutrição do embrião, quando da germinação das sementes ou da plântula, durante períodos de eventuais estresses ambientais. O homem, aproveitando essa riqueza natural renovável, tem empregado a água de coco de forma crescente na alimentação e nutrição humana, na medicina como no caso de pacientes desidratados ou em atletas com exaustão física pela reposição de potássio. Na biotecnologia, vem sendo utilizada na conservação de sêmen de caprinos, ovinos, suínos e aves, na indução de diferenciação de células, entre outras aplicações (ARAGÃO, 2005).

A água do coco imaturo é considerada um líquido reidratante que contém açúcares, vitaminas, minerais, fatores promotores de crescimento, proteínas e aminoácidos (SHAW; SRIVASTANA, 1963), além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, capazes de promover a viabilidade de gametas criopreservados (BLUME; MARQUES, 1994).

É um líquido estéril e pode ser administrado por via endovenosa em humanos (DARILYN *et al.*, 2000), como ilustra a figura 4 abaixo.

Figura 4 - Coco fixado em malha tubular e conectado a equipo para administração parenteral para administração parenteral *in natura*



Fonte: Adaptado de Darilyn *et al.* (2000).

Embora não reportado formalmente na literatura, os ingleses no Ceilão e os japoneses em Sumatra teriam primeiramente utilizado água de coco como fluido endovenoso em humanos durante a Segunda Guerra Mundial (EISEMAN, 1954).

Em Havana, Cuba, Pradera, Fernandez e Calderón investigaram a administração parenteral de água de coco numa serie de pacientes pediátricos. Eles administraram 250 a 500 ml de água de coco fresca a 12 pacientes sem reações sérias e sem evidência de antigenicidade (PRADERA; FERNANDEZ; CALDERON, 1942).

A água do coco imaturo é isenta de contaminação, com 2,5 a 5,9 g/100ml de açúcares redutores, não causando hemólise no sangue humano *"in vitro"* ou *"in vivo"* (EISEMANN, 1954; JAYALEKSHMY; ARUMUCHAN; NARAYANAN, 1986).

Vários estudos têm demonstrado a eficiência da água de coco no tocante à preservação de células e tecidos. Nogueira e Vasconcelos ao utilizar a água de coco como meio conservante de córneas de coelhos, observaram que não houve alteração

estrutural expressiva em relação às córneas conservadas no Optisol[®], produto padrão vendido comercialmente (NOGUEIRA; VASCONCELOS, 2000).

Nunes evidenciou em estudo *in vitro* e *in vivo* a eficácia da água de coco *in natura*, na preservação do sêmen e de embriões de ovinos, altamente sensíveis às variações de temperatura em seu processo de conservação (NUNES, 1986).

Solução à base de água de coco foi utilizada com sucesso na preservação de oócitos de murinos (BLUME *et al.*, 1997a) e na cultura de embriões (BLUME *et al.*, 1997), como também na cultura e preservação de folículos pré-antrais de caprinos *in vitro* (ANDRADE *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2000; 2004). Silva realizou estudo com um meio de água de coco em pó (ACP-318) na maturação *in vitro* de oócitos de caninos com bons resultados (SILVA *et al.*, 2010).

A água de coco possui substâncias com características de indução de crescimento celular e fito hormônios que podem auxiliar no processo de reparação tecidual (DEBMANDAL; MANDAL, 2011; MAGALHÃES, 2007; PRADES *et al.*, 2012). Silva e colaboradores sugerem que o ácido indolacético, presente na água de coco, se combinaria com certos fatores de crescimento em tecidos animais, modulando assim a ação desses fatores (SILVA *et al.*, 2004).

Com os bons resultados do uso da água de coco *in natura* na preservação seminal, Nunes e Salgueiro realizaram a padronização e a estabilização da água em forma de pó (ACP), para que a mesma, não perdendo suas características físico-químicas, tivesse seu uso simplificado, podendo representar uma alternativa para a difusão de várias biotecnologias, fato alcançado no início de 2002 (NUNES; SALGUEIRO, 2007).

Recentemente, um estudo mostrou ser viável a preservação de baço, ovário e pele por seis horas com solução à base de água de coco, apresentando bons resultados após o autotransplante desses tecidos em ratos comparando com a solução padrão, da Universidade Wisconsin (SCHETTINO CÉSAR *et al.*, 2015).

5 OBJETIVOS

5.1 GERAL

Analisar a viabilidade de rins de coelho após preservação estática em solução hipotérmica à base de água de coco em pó (ACP-405) reconstituída através de análise morfológica.

5.2 ESPECÍFICOS

Avaliar a qualidade da preservação renal estática em solução de água de coco em pó (ACP-405) reconstituída através da análise de lesões de isquemia em vários tempos de preservação;

Comparar a solução ACP-405 com a solução padrão de preservação renal para transplantes, através da análise de lesões de isquemia em vários tempos de preservação;

Depositar pedido de patente de invenção de solução contendo produtos derivados do coco bem como do processo de obtenção da solução com aplicação na área de biotecnologia em saúde visando a conservação de órgão ou de tecidos de humanos e de animais para transplante.

6 METODOLOGIA

Este estudo foi conduzido de acordo com as recomendações das Normas Internacionais para Proteção Animal e do Código Brasileiro de Experimentação Animal (1988), “Princípios Éticos na Experimentação Animal”, segundo a Lei Federal N° 11.794, de 08 de outubro de 2008, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto para Desenvolvimento da Educação (IPADE) do Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS) sob o protocolo 027/15, conforme documento anexo (ANEXO A).

Os experimentos foram realizados no Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) da Faculdade de Veterinária (FAVET) da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

6.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 12 coelhos da raça Nova Zelândia, brancos, do sexo masculino, provenientes do Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, com uma média de 120 dias de vida e pesando em média 2000 g, mantidos em gaiolas, com ingestão livre de água e ração padronizada para coelhos. Nas 24 horas que antecedem o experimento, os animais foram mantidos em jejum alimentar, com ingestão de água *ad libitum*.

6.2 SOLUÇÕES DE PRESERVAÇÃO

A solução padrão utilizada no estudo foi a SPS-1[®] (*Organ Recovery Systems*, EUA) que tem a mesma composição da solução da Universidade Wisconsin (UW). Foi utilizada a apresentação em bolsa plástica de 01 (um) litro, refrigerada a 4 °C.

O meio de preservação à base de água de coco em pó (ACP) utilizado foi a ACP-405. O meio ACP-405 foi ressuspendido em água Milli-Q e procedida a esterilização física através de filtro millipore (Microlab Scientific, China) de 0,22 micrômetros. A solução decorrente deste processo ficou armazenada em frascos

plásticos estéreis, refrigerados a 4 °C. A composição da solução é ilustrada no quadro 3.

Quadro 3 - Composição bioquímica da água de coco em pó (ACP 405) por 100 g

Calorias (kcal)	378	VITAMINAS	
Calorias (kJ)	1585	Vitamina B1 (mg), tiamina	0,17
Calorias de Carboidratos (kcal)	372	Vitamina B3 (mg), niacina (ácido nicotínico e vitamina PP)	0,12
Carboidrato, por diferença (g)	93,00	Vitamina B5 (mg), ácido pantotênico	6,51
Frutose (g)	50,02	Vitamina B12 (mcg), cobalamina	0,22
Galactose (g)	0,00	Ácido Fólico (mcg)	312,00
Glicose (g)	34,97	Vitamina C (mg), ácido ascórbico	26,80
Proteína (g)	0,90	Vitamina D (mcg), calciferol	1,50
Gorduras totais (g)	0,300	Biotina	8,03
Gorduras saturadas (g)	0,000	AMINOÁCIDOS	
<i>Gorduras monoinsaturadas (g)</i>	<i>0,000</i>	Ácido Aspártico (mg)	0,70
<i>Gorduras poli saturadas (g)</i>	<i>0,000</i>	Ácido Glutâmico (mg)	172,00
Gorduras trans (g)	0	Alanina (mg)	38,60
Colesterol (mg)	0,00	Arginina (mg)	126,00
Fibra, total alimentar (g)	4,30	Cistina (mg)	14,80
Fibra (g)	-	Fenilalanina (mg)	38,00
Fibra Alimentar Insolúvel (g)	4,10	Glicina (mg)	36,40
Fibra Alimentar Solúvel (g)	0,20	Glutamina (mg)	172,00
Umidade (g)	3,00	Histidina (mg)	17,80
Cinzas (g)	1,30	Isoleucina (mg)	29,30
Sólidos Totais (g)	97,01	Leucina (mg)	54,20
MINERAIS		Lisina (mg)	33,10
Sódio, Na (mg)	105,000	Metionina (mg)	14,00
Cálcio, Ca (mg)	39,000	Prolina (mg)	32,00
Ferro, Fe (mg)	0,300	Serina (mg)	39,00
Fósforo, P (mg)	45,200	Tirosina (mg)	24,00
Magnésio, Mg (mg)	25,000	Treonina (mg)	28,20
Manganês, Mn (mg)	1,100	Triptofano (mg)	8,40
Potássio, K (mg)	250,000	Valina (mg)	48,00
		Osmolaridade (mOsm/Kg H₂O; 10g em 100 ml)	210
		Grau de saturação em água g/ml	0,8

Fonte: ACP Biotecnologia (2017).

Ambas as soluções permaneceram em refrigeração até o momento da utilização, quando eram então conectadas a um equipo de macro-gotas (Descarpack, São Paulo) para a respectiva perfusão.

6.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram anestesiados com uretana (MP Biomedicals, EUA) na dose 1200 mg/kg por via intraperitoneal e após 30 min. com pentobarbital sódico (Cristália, Itapira, São Paulo) na dose 40 mg/kg, por via intramuscular.

Após o animal encontrar-se anestesiado, procedeu-se a tricotomia da parede abdominal, seguida de antisepsia com solução de Digliconato de Clorexidina 1% - 10 mg/ml (Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo).

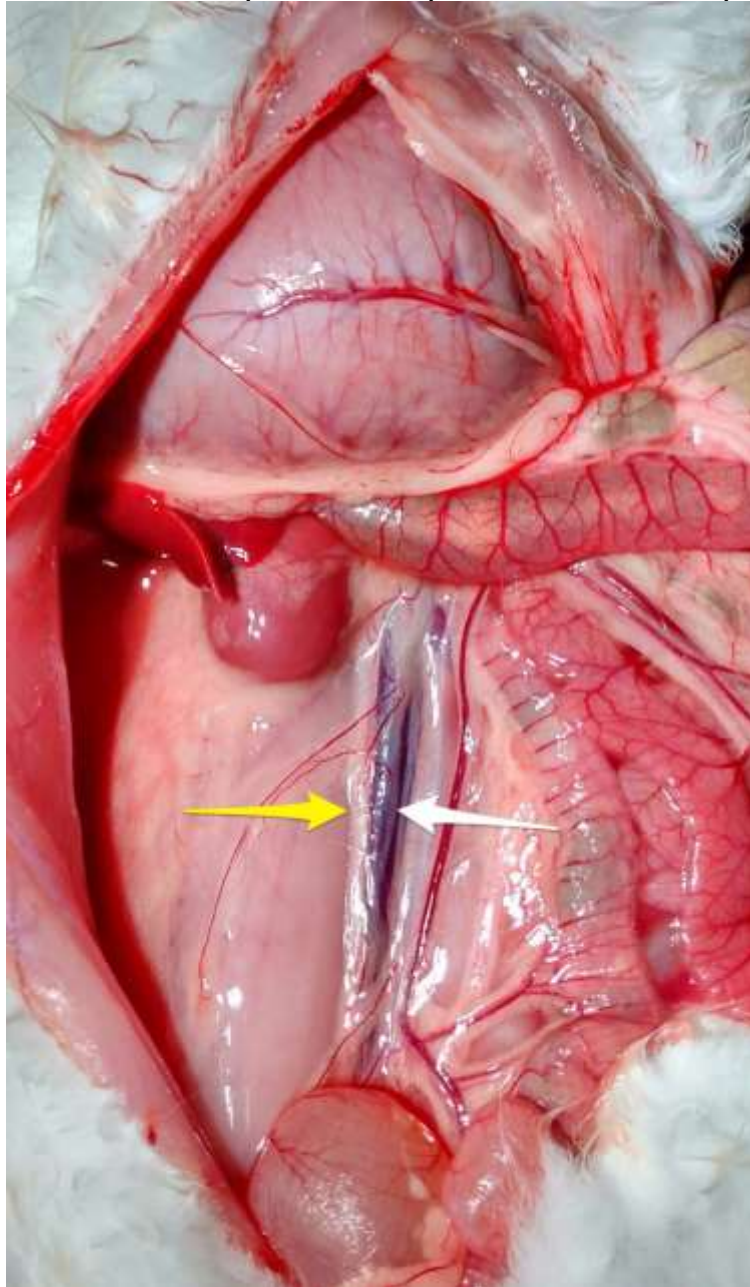
Realizou-se incisão mediana do apêndice xifóide até a região hipogástrica, dissecação por planos até a cavidade peritoneal e inspeção dos órgãos abdominais. Após, procedeu-se ao rebatimento das alças intestinais, de modo a permitir a exposição da veia cava inferior, da aorta abdominal com suas ramificações e da veia porta. A aorta abdominal e a veia cava inferior foram dissecadas até próximo à bexiga, realizando-se a ligadura dos vasos colaterais e o reparo de cada vaso com fios de algodão 3.0. A veia mesentérica superior foi dissecada e reparada, bem como a aorta infradiafragmática.

Concluída a dissecação e isolamento das estruturas vasculares, foram administradas 100 UI de heparina sódica 5000 UI/ml (Cristália, Itapira, São Paulo) através da veia cava inferior. Procedeu-se, então, à ligadura da aorta, distal ao ponto de canulação, com colocação da cânula para perfusão (sonda Nelaton 6 Fr) na aorta abdominal. O mesmo procedimento foi realizado com a veia mesentérica superior, progredindo a sonda até a veia porta.

As cânulas foram previamente preenchidas com o respectivo líquido de perfusão armazenados em frascos plásticos (ACP-405) ou em bolsa plástica (Solução UW), conectadas a equipos de macro-gotas (Descarpack, São Paulo).

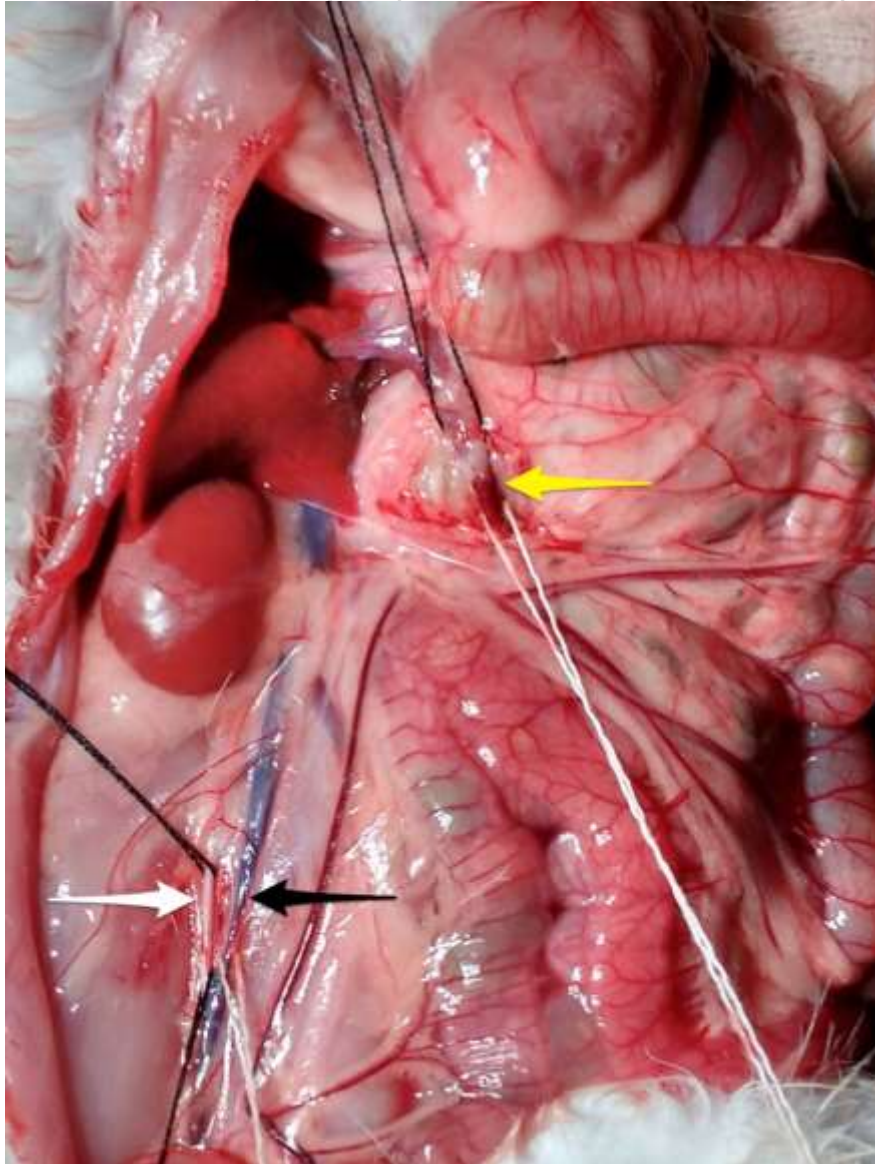
A perfusão através da veia mesentérica superior foi realizada para preservação do fígado, órgão também estudado pelos autores em outro trabalho. Seguem fotografias para ilustrar a dissecação dos vasos (Fig. 5 a 8).

Figura 5 - Aorta abdominal (seta amarela) e veia cava inferior (seta branca)



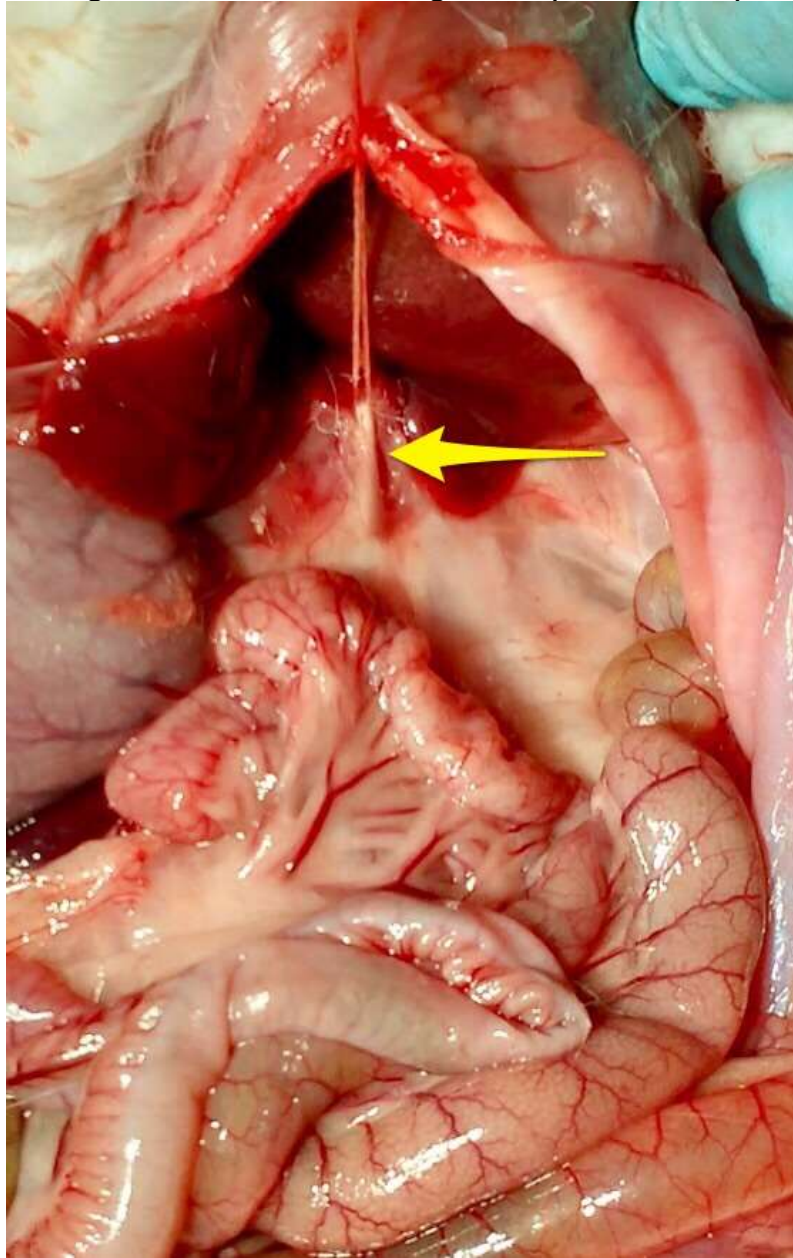
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 6 - Estruturas vasculares isoladas e reparadas. Nota-se a aorta abdominal (seta branca), a veia cava inferior (seta preta) e a veia mesentérica superior (seta amarela)



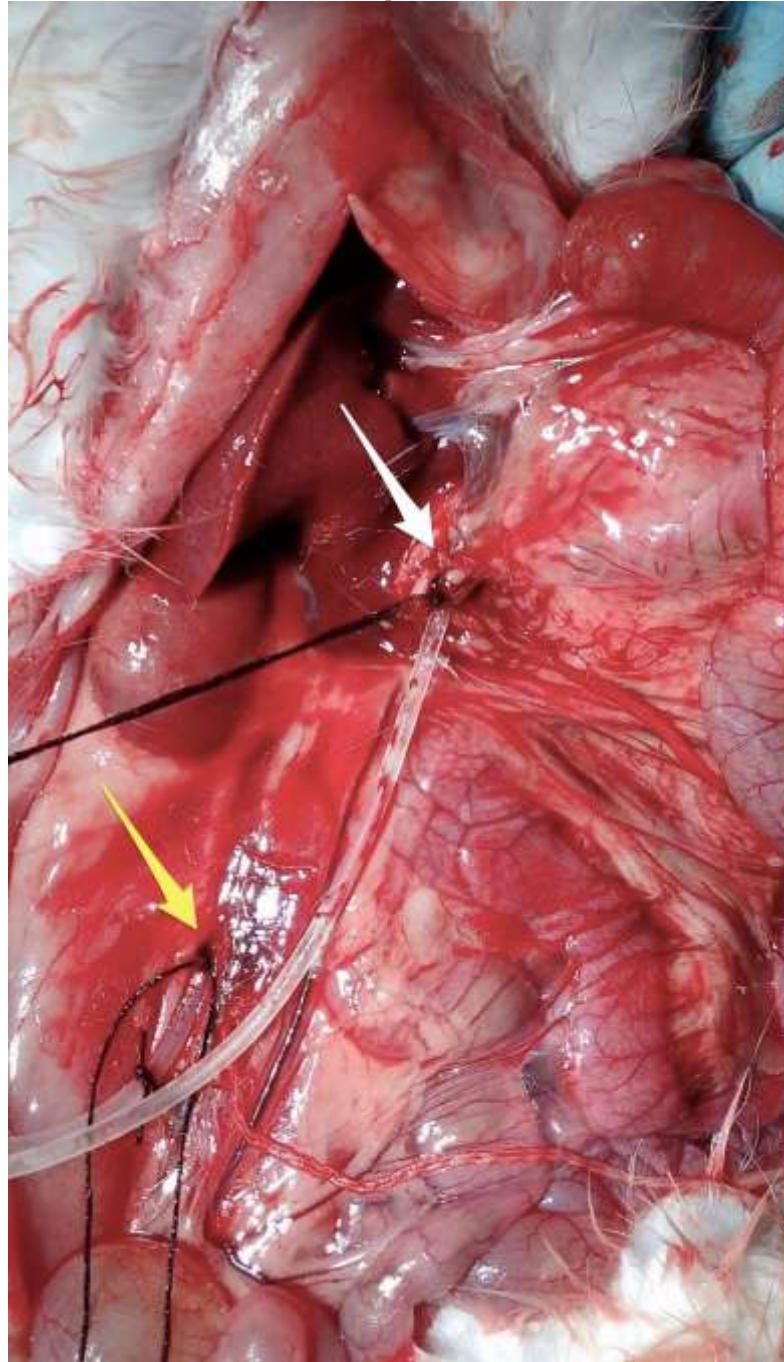
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 7 - Aorta infradiafragmática (seta amarela)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 8 - Estruturas vasculares canuladas: aorta abdominal (seta amarela) e veia mesentérica superior (seta branca), procedimento padrão para perfusão de múltiplos órgãos



Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a adequada canulação dos vasos, foi realizado o clampeamento da aorta infradiafragmática e da veia cava inferior, liberação da entrada da solução de preservação infundidas pela ação da gravidade na altura de 100 cm da mesa cirúrgica e a concomitante refrigeração da cavidade com gelo picado. Esta manobra permite o início da perfusão com isquemia zero, já que não há interrupção do fluxo dentro dos órgãos.

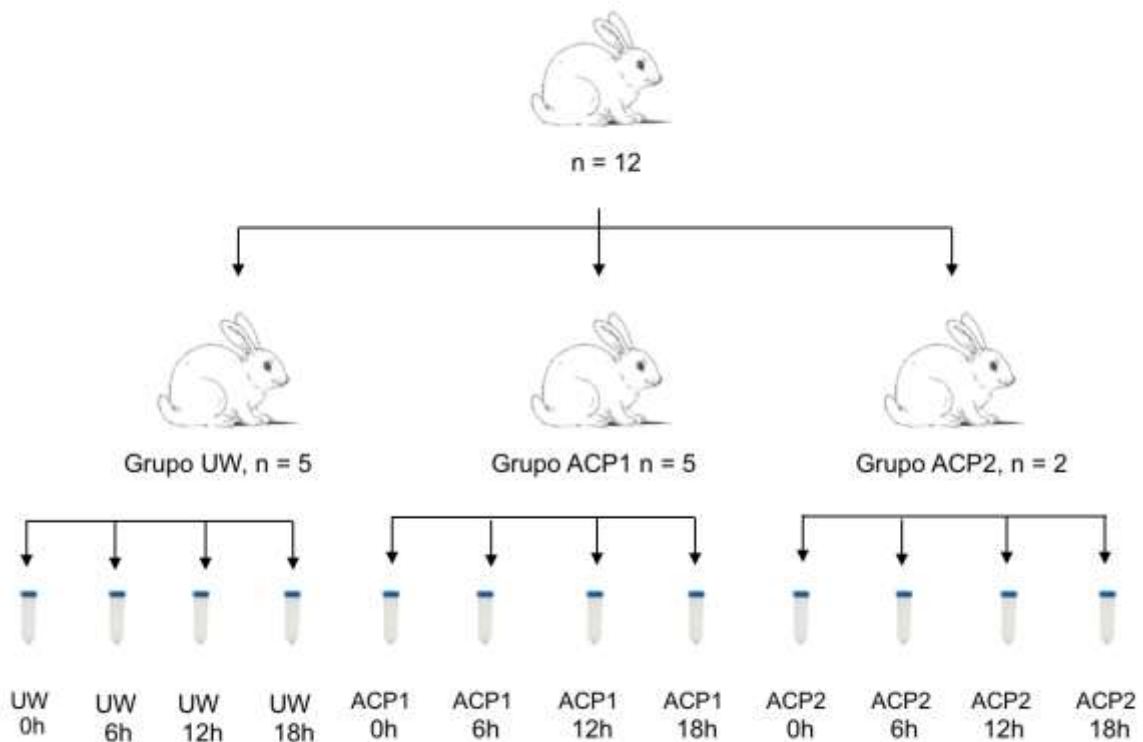
A veia cava supra-hepática e justa ilíaca foram seccionadas para o extravasamento da solução perfundida. O momento do clampeamento vascular e início da perfusão foi considerado o tempo 0 (zero) h. Após um tempo médio de 10 (dez) minutos de perfusão, 100 ml de solução perfundiram os órgãos por cada cânula.

Em cinco animais foi realizado o procedimento descrito utilizando a Solução da Universidade Wisconsin (Grupo UW), em outro grupo de cinco animais foi utilizada a solução de preservação à base de água de coco em pó reconstituída em descongelação (Grupo ACP1) e no último grupo de dois animais foi utilizada a solução ACP-405 à temperatura padrão, aproximadamente 4 °C (Grupo ACP2).

Foi realizado então o procedimento cirúrgico de nefrectomia. Os rins foram levados à bancada e submetidos à secção longitudinal com lâmina de bisturi nº 22, sendo acondicionados em frascos plásticos identificados como descrito a seguir: um fragmento renal nomeado tempo 0 h (zero) foi colocado em frasco com formaldeído tamponado a 10% (Quimesp, Guarulhos, São Paulo); outros três fragmentos foram acondicionados em frascos contendo a solução de preservação testada, refrigerada a 4 °C e subsequentemente colocados no formaldeído nos tempos 6 h, 12 h e 18 h.

Adicionalmente, amostras de cada tecido foram colocadas em tubos de polipropileno e armazenados a -80 °C para futuras análises bioquímica e molecular. Os grupos foram divididos como ilustrado na figura 9.

Figura 9 - Desenho esquemático do experimento



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dados foram analisados no *software Statistical Package for the Social Sciences* adotando uma confiança de 95% para todas as avaliações. Os dados foram expressos em forma de mediana, mínima e máxima e analisados pelo teste de Mann-Whitney (comparação entre grupos).

6.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Foram realizadas secções de 4 μ m das amostras e colocadas em bloco de parafina para confecção de lâminas histológicas em hematoxilina-eosina. Toda a secção do tecido foi analisada sob microscopia óptica (Nikon E 200; Tóquio, Japão) por médico patologista com experiência em transplantes, de forma cega.

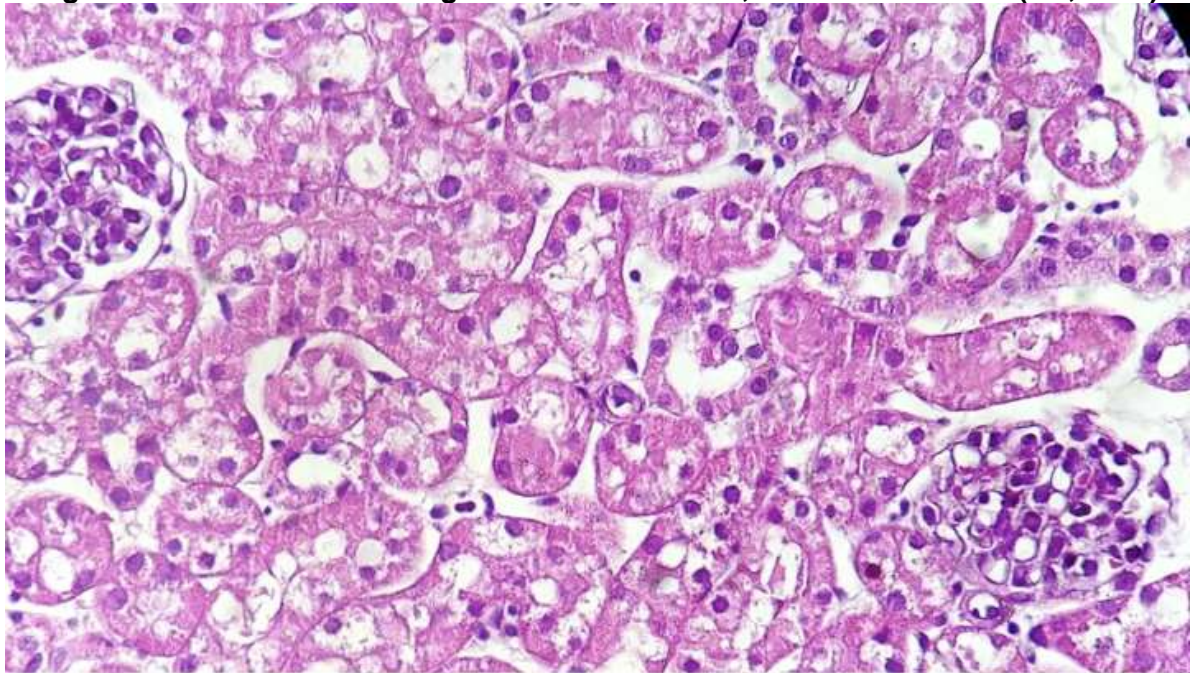
Como forma de quantificação de lesão histológica foi utilizada metodologia previamente descrita (TYRITZIS *et al.*, 2011). A intensidade de lesão morfológica foi quantificado como se segue: 0 = ausência de lesão; 1 = mínimo edema; 2 = edema importante e/ou núcleos picnóticos; 3 = formação de cilindros e/ou necrose.

A extensão da lesão foi quantificada como porcentagem de acometimento por secção do tecido da seguinte maneira: 0 = menos de 5%; 1 = de 5 a 25%; 2 = de 25 a 50%; 3 = mais de 50%.

A soma desses dois escores, representando a intensidade e a extensão das lesões, formaram um escore global que varia de 0 a 6. O escore global foi então escalonado da seguinte forma: escore final 0 = escore global 0 ou 1; escore final 1 = escore global 2 ou 3; escore final 2 = escore global 4; escore final 3 = escore global 5 ou 6.

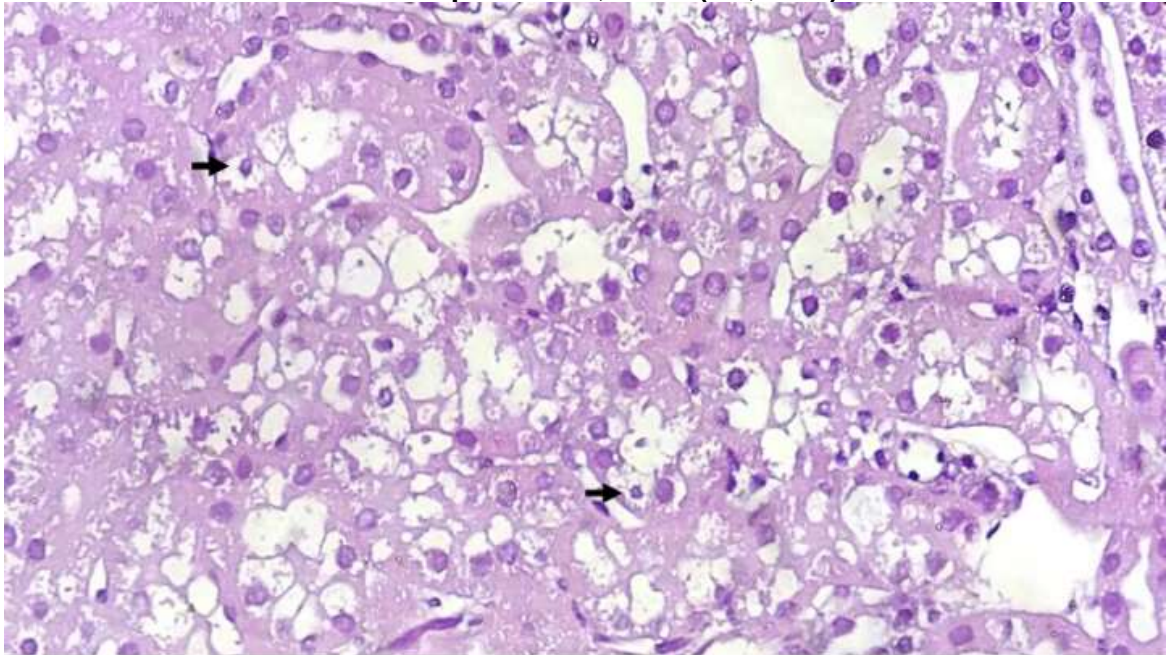
Seguem fotografias de lâminas analisadas para ilustrar as características morfológicas observadas (Fig. 10 a 12).

Figura 10 - Foto ilustrando o grau de intensidade 0, ausência de lesão (HE, 400x)



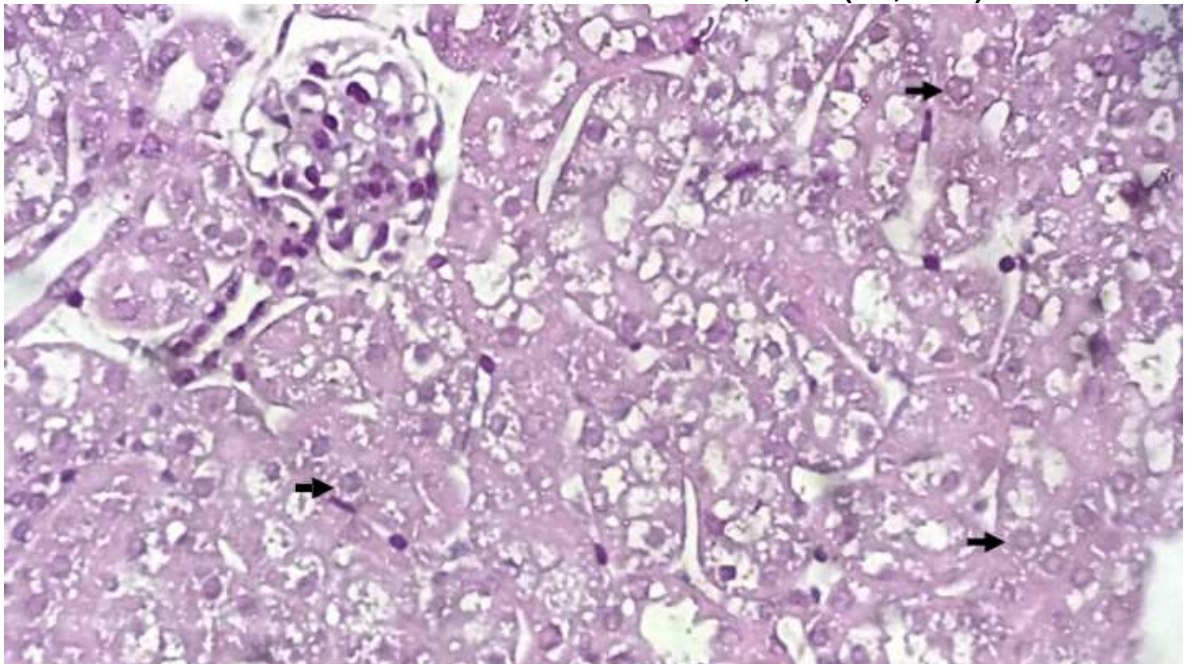
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 11 - Foto ilustrando o grau de intensidade 2, com edema tubular severo e núcleos picnóticos, setas (HE, 400x)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 12 - Foto ilustrando o grau de intensidade 3, com áreas de necrose tubular. Perda da basofilia nuclear dos túbulos, setas (HE, 400x)



Fonte: Elaborada pelo autor.

7 RESULTADOS

Os primeiros cinco animais foram perfundidos com a solução padrão da Universidade Wisconsin. Após análise histológica, ilustrada na tabela 1, nota-se uniformidade do escore final de preservação com uma tendência a quase ausência de alterações significativas, com exceção das amostras do animal 4. No tempo 0 h, ou seja, pouco tempo após o clampeamento da circulação intracorpórea, teoricamente teríamos o menor grau de lesão celular. Entretanto, percebemos que as amostras 3, 4 e 5 tem escores finais alterados no tempo 0 h, respectivamente 1, 2 e 1. No tempo 6 h, as amostras 2 e 4 apresentam alteração do escore final, respectivamente 1 e 2. Já no tempo 12 h apenas a amostra 4 apresenta alteração do escore final. Finalmente, no tempo 18 h todas as amostras apresentaram escore final 0, ou seja, ausência de alterações morfológicas celulares importantes.

Tabela 1 - Intensidade e extensão das lesões morfológicas com solução UW como meio de preservação nos tempos 0, 6, 12 e 18 horas no primeiro experimento

Animal	Solução	Tempo (h)	Intensidade	Extensão	Soma	Escore Final
1	UW	0	0	0	0	0
2	UW	0	1	1	2	1
3	UW	0	1	1	2	1
4	UW	0	2	2	4	2
5	UW	0	1	1	2	1
1	UW	6	0	0	0	0
2	UW	6	2	1	3	1
3	UW	6	0	0	0	0
4	UW	6	2	2	4	2
5	UW	6	0	0	0	0
1	UW	12	0	0	0	0
2	UW	12	0	0	0	0
3	UW	12	0	0	0	0
4	UW	12	2	1	3	1
5	UW	12	0	0	0	0
1	UW	18	0	0	0	0
2	UW	18	0	0	0	0
3	UW	18	0	0	0	0
4	UW	18	0	0	0	0
5	UW	18	0	0	0	0

Fonte: Elaborada pelo autor.

A segunda fase do experimento foi realizada com a perfusão da solução à base de água de coco em pó (ACP-405) reconstituída poucas horas antes do início das cirurgias e estavam parcialmente congeladas no momento em que foram utilizadas. Os resultados apresentados na tabela 2 mostram um elevado escore final em quase todas as amostras. No tempo 0h, as amostras apresentaram escore 3 com exceção das amostras 3 e 4 que apresentaram escore 1 e 2, respectivamente. No tempo 6h, as amostras apresentaram escore 3 com exceção das amostras 4 e 5 que apresentaram escore 1 e 2, respectivamente. No tempo 12h, todas as amostras apresentaram escore 3 com exceção da amostra 3 que apresentou escore 1. Já no

tempo 18h, as amostras apresentaram escore 3 com exceção das amostras 3 e 4 que apresentaram escore 1.

Tabela 2 - Intensidade e extensão das lesões morfológicas com ACP- 405 como meio de preservação nos tempos 0, 6, 12 e 18 horas no segundo experimento

Animal	Solução	Tempo (h)	Intensidade	Extensão	Soma	Escore Final
1	ACP1	0	3	2	5	3
2	ACP1	0	3	3	6	3
3	ACP1	0	2	1	3	1
4	ACP1	0	2	2	4	2
5	ACP1	0	3	2	5	3
1	ACP1	6	3	3	6	3
2	ACP1	6	3	3	6	3
3	ACP1	6	3	2	5	3
4	ACP1	6	2	1	3	1
5	ACP1	6	3	1	4	2
1	ACP1	12	3	3	6	3
2	ACP1	12	3	3	6	3
3	ACP1	12	2	1	3	1
4	ACP1	12	3	3	6	3
5	ACP1	12	3	3	6	3
1	ACP1	18	3	2	5	3
2	ACP1	18	3	3	6	3
3	ACP1	18	2	0	2	1
4	ACP1	18	2	1	3	1
5	ACP1	18	3	2	5	3

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Com os maus resultados observados no grupo teste, utilizando a solução ACP-405, optou-se por repetir o experimento com mais dois animais mudando o modo

de reconstituição e preparo da solução. A solução foi preparada na véspera do experimento e congelada. Oportunamente foi descongelada e no momento da cirurgia estava a uma temperatura média de 4 °C. O experimento foi realizado conforme o padronizado. Os achados histopatológicos estão ilustrados na tabela 3. No tempo 0h, as amostras dos dois animais apresentavam escore final 0. No tempo 6h, a amostra 1 apresentou escore 0 enquanto a amostra 2 apresentou escore 1. No tempo 12h o resultado foi o mesmo do tempo 6h. No tempo 18h, a amostra 1 apresentou escore final 1 enquanto a amostra 2 apresentou escore 3.

Tabela 3 - Intensidade e extensão das lesões morfológicas com ACP-405 como meio de preservação nos tempos 0, 6, 12 e 18 horas no terceiro experimento

Animal	Solução	Tempo (h)	Intensidade	Extensão	Soma	Escore Final
1	ACP2	0	0	0	0	0
2	ACP2	0	1	0	1	0
1	ACP2	6	0	0	0	0
2	ACP2	6	1	1	2	1
1	ACP2	12	1	0	1	0
2	ACP2	12	1	1	2	1
1	ACP2	18	1	1	2	1
2	ACP2	18	3	2	5	3

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Tabela 4 - Mediana dos escores finais entre a solução UW, ACP1 e ACP2 nos tempos de preservação de 0, 6, 12 e 18 horas

Escore final	Tempo 0h			Tempo 6h			Tempo 12h			Tempo 18h			<i>p-Valor^b</i>
	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo	
UW	1	0	2	0*	0	2	0*	0	1	0*	0	0	0,070
ACP1	3	1	3	3	1	3	3	1	3	3	1	3	0,915
ACP2	0*	0	0	0,5*	0	1	0,5*	0	1	2	1	3	0,246
<i>p-Valor^a</i>	0,026			0,042			0,016			0,010			

^aTeste de Mann-Whitney; ^bTeste de Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$ versus ACP1. UW = solução da Universidade de Wisconsin, padrão ouro (Experimento 1), ACP-1 = ACP-405 (Experimento 2), ACP2 = ACP-405 (Experimento 3). Elaborada pelo próprio autor.

8 DISCUSSÃO

A preservação ruim dos órgãos dos cinco primeiros animais mantidos em solução de ACP-405 mostra a importância da padronização adequada da reconstituição da água de coco em pó. Nesse primeiro momento, o preparo da solução foi feito próximo à utilização no experimento sem a manutenção adequada da temperatura. Na hora da perfusão, a solução no frasco conectado ao equipo ainda estava parcialmente congelada. Ao final da perfusão, notou-se que os rins não foram adequadamente perfundidos, pois mostravam ilhas de má perfusão na sua superfície, macroscopicamente.

Uma hipótese para o achado de má perfusão dos órgãos utilizando-se a solução parcialmente congelada seria a de que microcristais teriam causado obstrução da delicada microvasculatura renal do coelho, levando à má perfusão dos órgãos. Além disso, a variação da amostragem da secção do tecido deve ser lembrada, considerando também a pequena amostra estudada.

Na busca de confirmar se realmente a solução testada não era adequada para a preservação do rim em hipotermia, foi então realizado novo experimento com uso de solução ACP-405 adequadamente mantida a temperatura média de 4 °C no momento da perfusão e utilizando-se a técnica cirúrgica padrão. Com essas alterações, a qualidade da preservação melhorou consideravelmente, a ponto de os resultados do grupo controle serem semelhantes aos do grupo teste.

Com esse resultado, estudos mais abrangentes podem ser realizados, uma vez que a análise morfológica é insuficiente para avaliar a função celular. A resposta inflamatória, o dano mitocondrial, a avaliação da apoptose e da função celular necessitam de estudos específicos no intuito de se determinar a real utilidade da solução de preservação à base de água de coco em pó.

Uma ferramenta útil no refinamento da histopatologia é a avaliação ultra-estrutural celular através da microscopia eletrônica, capaz de mostrar alterações como colapso tubular, edema citoplasmático, dilatação mitocondrial, distensão da borda em escova e perda de fosfolípidios da membrana celular, sinais de lesão por isquemia (TYRITZIS *et al.*, 2011).

Um método de imuno-histoquímica denominado TUNEL é capaz de identificar sinais de lesão ao DNA por apoptose ou por outra causa de fragmentação do DNA (MOSBAH *et al.*, 2012). Outro método para avaliar apoptose é a quantificação

do micro-RNA 21 e 125b, moduladores da indução de apoptose sendo pois marcadores de lesão de isquemia (GÜÇLÜ *et al.*, 2017). A análise de uma série de genes candidatos a biomarcadores de lesão de isquemia e reperfusão também pode ser realizada, como fator o complemento C3 e a alfa-1-microglobulina (MÜHLBERGER *et al.*, 2009). A avaliação do estresse oxidativo celular através da quantificação de marcadores como malonaldeído, isoprostano e alantoína é outra ferramenta na avaliação de lesão celular (CZERSKA *et al.*, 2015). A resposta inflamatória como causadora de lesão tecidual já está bem estabelecido. Nesse particular, a avaliação do grau de inflamação pode ser aferido através das citocinas TNF alfa, IL1 beta e IL6 (MOSBAH *et al.*, 2012).

A pressão osmótica da solução deve ser aprimorada no sentido de diminuir o potencial de edema celular. A forma de reconstituição e acondicionamento devem ser desenvolvidos, sendo a dependência da cadeia do frio um limitador no uso da solução.

Além de manter o órgão viável após isquemia fria, as soluções de preservação devem oferecer substratos necessários para dirimir as consequências negativas da reperfusão tecidual. Essa fase, secundária à isquemia, responsável pelos principais efeitos deletérios celulares, deverá ser também estudada.

9 CONCLUSÃO

O uso da água de coco em pó (ACP-405) reconstituída como solução de preservação de rins de coelho em hipotermia mostrou resultados semelhantes à solução padrão após análise histopatológica.

O experimento serviu como piloto para definir a viabilidade da preservação estática hipotérmica de rins de coelho. A partir dos resultados positivos, estudos deverão ser direcionados no intuito de estudar as lesões com métodos mais refinados e associados a um modelo de reperfusão *in vitro* com animais de maior porte e maior semelhança ao rim humano, por exemplo o rim de suínos.

O uso da água de coco com as modificações necessárias tem potencial biotecnológico de ser uma alternativa viável economicamente dentre as soluções de preservação de rim comerciais.

Com os resultados desse experimento, foi pedido patente de invenção no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), número do processo: BR 10 2017 024173 4.

REFERÊNCIAS

- ABOUNA, G.M.; HURWITZ, R.; SERROU, B. Organ preservation by Collins' solution. **Lancet**, v. 1, p. 1076, 1971.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS. Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada Estado. **Registro Brasileiro de Transplantes**, n. 4. 2016. Disponível em: <<http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2016/RBT2016-leitura.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2017.
- ANDRADE, E. R. *et al.* Evaluation of saline and coconut water solutions in the preservation of sheep preantral follicles in situ. **Small Ruminant Research**, v. 43, p. 235-243. 2002.
- ARAGÃO, W. M. Produção de água de coco de cultivares de coqueiro verde. Sergipe: Embrapa, **Comunicado Técnico**, n. 42, 2005. ISSN 1678-1937. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/34803/1/cot-42.pdf>>. Acesso em: 13 mai. 2017.
- BADET, L. *et al.* Kidney preservation with IGL-1 solution: A preliminary report. **Transplantation Proceedings**, v. 37, p. 308, 2005.
- BAICU S. C.; TAYLOR, M. J. Acid-base buffering in organ preservation solutions as a function of temperature: New parameters for comparing buffer capacity and efficiency. **Cryobiology**, v. 45, p. 33, 2002.
- BANZON, J. A. The coconut palm and its fruit. In: Banzon, J. A.; Gonzalez, O. N.; Leon, S. Y.; Sanchez, P. C. **Coconut as Food**. Quezon City: Philippines Coconut Research and Development Foundation, 1990. p. 3-7.
- BARROS, E. *et al.* **Nefrologia: rotinas, diagnóstico e tratamento**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1994.
- BELZER, F. O.; ASHBY, B. S.; DUNPHY, J. E. 24-hour and 72-hour preservation of canine kidneys. **Lancet**, v. 2, p. 536-539, 1967.
- BELZER, F. O. Basic principles of organ preservation. **Transplantation Proceedings**, v. 45, p. 673-676. 1988.
- BEN ABDENNEBI, S. H. *et al.* A preservation solution with polyethylene glycol and calcium: A possible multiorgan liquid. **Transplant International**, v. 15, p. 348, 2002.
- BLUME, H.; MARQUES JR, A. P. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 18, p. 97-104. 1994.
- BLUME, H. *et al.* Uso da água de coco no cultivo de embriões bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 1, p. 78-81. 1997.
- BONVENTRE, J. V., CHEUNG, J. Y. Effects of metabolic acidosis on viability of cells exposed to anoxia. **American Journal of Physiology**, v. 249, p. 149, 1985.
- BRETSCHNEIDER, H. J. Myocardial protection. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 28, p. 295, 1980.

- CHATAURET, N. *et al.* Ischemia-reperfusion: From cell biology to acute kidney injury. **Progres en Urologie**, v. 24, n. 1, p. 4-12, 2014.
- COHEN, J. J. Is the function of the renal papilla coupled exclusively to an anaerobic pattern of metabolism? **American Journal of Physiology**, v. 236, p. 423-433, 1979.
- COLLINS, G. M.; BRAVO-SHUGARMAN, M.; TERASAKI, P. I. Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours' ice storage. **Lancet**, v. 2, p. 1219, 1969.
- COLLINS, G. M.; WICOMB, W. N. New organ preservation solutions. **Kidney International Supplements**, v. 38, p. 197-202, 1992.
- CZERSKA, M. *et al.* Today's oxidative stress markers. **Medycyna Pracy**, v. 66, n. 3, p. 393-405, 2015.
- DARILYN, C. F. *et al.* The intravenous Use of coconut water. **The American Journal of Emergency Medicine**, v. 18, p. 108-111, 2000.
- DE BOER, J. *et al.* Eurotransplant randomized multicenter kidney graft preservation study comparing HTK with UW and Euro-Collins. **Transplant International**, v. 12, p. 447, 1999.
- DEBMANDAL, M.; MANDAL, S. Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): in health promotion and disease prevention. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 241-247, 2011.
- DEMMY, T. L. *et al.* Organ preservation solutions in heart transplantation-patterns of usage and related survival. **Transplantation**, v. 63, p. 262-269, 1997.
- DUNN, J. F. *et al.* Living related kidney donors: a 14 year experience. **Annals of Surgery**, v. 203, p. 637-642, 1996.
- DUTKOWSKI, P.; DE ROUGEMONT, O.; CLAVIEN, P. A. Alexis Carrel: genius, innovator and ideologist. **American Journal of Transplantation**, v. 8, n. 10, p.1998-2003, 2008.
- ECKARDT, K. U. *et al.* Role of hypoxia in the pathogenesis of renal disease. **Kidney International Supplements**, p. 46-51, 2005.
- EISEMAN, B. Intravenous infusion of coconut water. **A.M.A. Archives of Surgery**, v. 68, p. 167-178, 1958.
- ESMERALDO, R. M.; CASTELO, A. S.; ESMERALDO, R. M. Laparoscopic living donor nephrectomy versus open nephrectomy. In: CRUZ, J. **Atualidades em Nefrologia**. 8. ed., São Paulo: Sarvier, 2004, p. 231-237.
- EVANS, R. W. *et al.* The quality of life of patients with end-stage renal disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 315, p. 553-539, 1985.
- GARCIA, V. D. *et al.* **Transplante de órgãos e tecidos**. 2. ed. São Paulo: Segmento Farma, 2006.
- GÜÇLÜ, A. *et al.* MicroRNA-125b as a new potential biomarker on diagnosis of renal ischemia reperfusion injury. **Journal of Surgical Research**, v. 207, p. 241-248, 2017.
- HAMILTON, D. N. *et al.* Voronoy and the first human kidney allograft. **Surgery, Gynecology & Obstetrics**, v. 159, n. 3, p. 289-294, 1984.

HARTLEY, L. C.; COLLINS, G. M.; CLUNIE, G. J. Kidney preservation for transportation: function of 29 human-cadaver kidneys preserved with an intracellular perfusate. **The New England Journal of Medicine**, v. 285, p. 1049-1052, 1971.

HAUET, T. *et al.* A modified University of Wisconsin preservation solution with high-NA low-K content reduces reperfusion injury of the pig kidney graft. **Transplantation**, v. 76, p. 18, 2003.

HOCHACHKA, P. W.; MOMMSEN, T. P. Protons and anaerobiosis. **Science**, v. 219, p. 1391, 1983.

HOSGOOD, S. A.; VAN HEURN, E.; NICHOLSON, M. L. Normothermic machine perfusion of the kidney: better conditioning and repair? **Transplant International**, v. 28, n. 6, p. 657-664, 2015.

JAYALEKSHMY, A.; ARUMUCHAN, C.; NARAYANAN, C. S. Changes in the chemical composition of coconut water during maturation. **Journal of Food Science and Technology**, v. 23, p. 203-207, 1986.

K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 39, n. 1, p. 4, 2002.

LAUPACIS, A. *et al.* A study of the quality of life and cost-utility of renal transplantation. **Kidney International**, v. 50, p. 235-242, 1996.

LEONG, C. L. *et al.* Evidence that renal arterial-venous oxygen shunting contributes to dynamic regulation of renal oxygenation. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v. 292, p. 1726-1733, 2007.

LEVIDIOTIS, V.; POWER, D. A. New insights into the molecular biology of the glomerular filtration barrier and associated disease. **Nephrology**, v. 10, p. 157-166, 2005.

LILLEHEI, R. C. *et al.* In vitro preservation of whole organs by hypothermia and hyperbaric oxygenation. **Cryobiology**, v. 1, p. 181-193, 1964.

MAATHUIS, M. H. J.; LEUVENINK, H. G. D.; PLOEG, R. J. Perspectives in Organ Preservation. **Transplantation**, v. 83, p. 1289-1298, 2007.

MARSHALL, V. Preservation by simple hypothermia. In: COLLINS, G. M.; DUBERNARD J. M.; LAND, W.; PERSIJN, G. G. **Procurement, preservation and allocation of vascularized organs**. New York: Kluwer Academic Publishers, 1997, p. 115-129.

MATHIESON, P. W. The cellular basis of albuminuria. **Clinical Science**, v. 107, p.533-538, 2004.

MENDELOFF, J. *et al.* Procuring organ donors as a health investment: how much should we be willing to spend? **Transplantation**, v.78, n.12, p. 1704-1710, 2004.

MENASCHE, P. *et al.* Experimental evaluation of Celsior, a new heart preservation solution. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 8, p. 207, 1994.

MORARIU, A. M. *et al.* Hyperaggregating effect of HES components and University of Wisconsin solution on human red blood cells: a risk of impaired graft perfusion in organ procurement? **Transplantation**, v. 76, p. 37-43, 2003.

- MOSBAH, I. B. *et al.* IGL-1 solution reduces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in rat liver transplantation. **Cell Death and Disease**, v. 3, p. 279, 2012.
- MÜHLBACHER, F.; LANGER, F.; MITTERMAYER, C. Preservation solutions for transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 31, p. 2069-2070, 1999.
- MÜHLBERGER, I. *et al.* Biomarkers in renal transplantation ischemia reperfusion injury. **Transplantation**, v. 88, n. 3, p. 14-19, 2009.
- MULLINS, C. D. *et al.* The economic impact of laparoscopic living-donor nephrectomy on kidney transplantation. **Transplantation**, v. 75, p.1505-1512, 2003.
- MURRAY, J. E.; MERRILL, J. P.; HARRISON, J. H. Renal homotransplantations in identical twins. **Surgical Forum**, v. 6, p. 432, 1955.
- NOGUEIRA, R. D. M.; VASCONCELOS, P. R. L. Coconut water as culture medium in storage corneal medium: experimental study in rabbits. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 59, n. 6, p. 395-401, 2000.
- NUNES, J. F. A inseminação artificial como método alternativo para o melhoramento da caprinocultura leiteira. In: SIMPÓSIO DA CAPRINOCULTURA DO ESTADO DO RIO, 1., **Anais...** Niterói, 1986.
- NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M. Produção de água de coco em pó (ACP) para utilização em processos biotecnológicos. In: SEMINÁRIO DE GESTÃO DA INOVAÇÃO TECNOLÓGICA NO NORDESTE - INOVA 2007, 3., 2007. Fortaleza. **Anais (Guia Oficial INOVA 2007)**. Fortaleza: INDI - Instituto de Desenvolvimento Industrial do Ceará, 2007. p. 16.
- PASCUAL, J.; ZAMORA, J.; PIRSCH, J. D. A systematic review of kidney transplantation from expanded criteria donors. **American Journal of Kidney Disease**, v. 52, n. 3, p. 553-586, 2008.
- PEDOTTI, P. *et al.* A comparative prospective study of two available solutions for kidney and liver preservation. **Transplantation**, v.77, p. 1540, 2004.
- PLOEG, R. J. *et al.* Effect of preservation solution on results of cadaveric kidney transplantation. **Lancet**, v. 340, p. 129-137, 1992.
- POLLAK, M. R. *et al.* The Glomerulus: The Sphere of Influence. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 9, p. 1461-1469, 2014.
- ROMÃO JUNIOR, J. E. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. **Jornal Brasileiro De Nefrologia**, v. 26, n. 3, p. 1-3, 2004.
- ROSEN, S.; EPSTEIN, F. H.; BREZIS, M. Determinants of intrarenal oxygenation: factors in acute renal failure. **Renal Failure**, v. 14, p. 321-325, 1992.
- RUSSELL, J. D. *et al.* The quality of life in renal transplantation - a prospective study. **Transplantation**, v. 54, p. 656-660, 1992.
- SCHETTINO, C. J. M. *et al.* Coconut water solutions for the preservation of spleen, ovary, and skin autotransplants in rats. **Transplantation Proceedings**, v. 7, n. 2, p. 536-544, 2015.
- SHAW, M.; SRIVASTAVA, B. I. S. Purine like substances from coconut endosperm and their effect on senescence in excised cereal leaves. **Plant Physiology**, v. 38, p. 528-531, 1963.

SILVA, J. R. V. *et al.* Effect of coconut water and Braun-Collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved in situ. **Theriogenology**, v. 54, p. 809-822, 2000.

SILVA, J. R. V. *et al.* Survival and growth of goat primordial follicle after in vitro culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. **Animal Reproduction Science**, v. 81, p. 273-86, 2004.

SILVA, A. E. F. *et al.* The Influence of Powdered Coconut Water (ACP-318) in In Vitro Maturation of Canine Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 1042-1046, 2010.

SOUTHARD, J. H.; BELZER, F. O. Organ preservation. **Annual Review of Medicine**, v. 46, p. 235-247, 1995.

TAYLOR, M. J. Hypothermia. In: FINK, G. ed. **Encyclopedia of Stress**. San Diego: Academic Press. p. 484. 2000.

TYRITZIS, S. I. *et al.* Effects of prolonged warm and cold ischemia in a solitary kidney animal model after partial nephrectomy: an ultrastructural investigation. **Ultrastructural Pathology**, v. 35, n. 2, p. 60-65, 2011.

WOLFE, R. A. *et al.* Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. **New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 1725-1730, 1999.

ANEXOS

ANEXO A - Aprovação na comissão de ética no uso de animais (CEUA)



CEUA INSTITUTO PARA DESENVOLVIMENTO DA EDUCAÇÃO LTDA IPADE
CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS

Of. No. 027/15

Protocolo do CEUA: 027/15

Pesquisador Responsável: Prof. ROMULO DA COSTA FARIAS

Título do Projeto: ESTUDO COMPARATIVO DA PRESERVAÇÃO DE ORGÃOS E TECIDOS UTILIZANDO SOLUÇÃO DA UNIVERSIDADE WISCONSIN E SOLUÇÃO À BASE DE ÁGUA DE COCO.

Levamos ao conhecimento de V. Sa que a Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA – IPADE considerou **APROVADO** o projeto supracitado na reunião do dia 26(vinte e seis) de novembro de 2015.

Descrição do animal utilizado:

Espécie: Coelho

Número 14

Amostral:

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE ao término do estudo, período máximo 26/11/2016.

Fortaleza, 26 de novembro de 2015.

Olga Vale Oliveira Machado
Coordenadora

CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE

Prubri viana (01) via

22/01/16