

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO  
SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:

CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA

**COMPARAÇÃO ENTRE FRUTOSE -1,6 -  
BISFOSFATO E SOLUÇÃO DE WISCONSIN  
NA PRESERVAÇÃO DE FÍGADOS DE  
RATOS:**

**A INFLUÊNCIA DO  
ESTADO NUTRICIONAL DO DOADOR**

Dissertação de Mestrado

Stela Maria Mota

Porto Alegre, Dezembro de 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO  
SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:  
CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA

**COMPARAÇÃO ENTRE FRUTOSE -1,6 -  
BISFOSFATO E SOLUÇÃO DE WISCONSIN  
NA PRESERVAÇÃO DE FÍGADOS DE  
RATOS:**

# A INFLUÊNCIA DO ESTADO NUTRICIONAL DO DOADOR

Dissertação de Mestrado

Stela Maria Mota

Orientador: Prof. Mário Reis Álvares-da-Silva

Porto Alegre, Dezembro de 2006

*Olho o mapa da cidade  
Como quem examinasse  
A anatomia de um corpo...*

*(É nem que fosse o meu corpo!)*

*Sinto uma dor infinita  
Das ruas de Porto Alegre  
Onde jamais passarei...*

*Há tanta esquina esquisita,  
Tanta nuance de paredes,  
Há tanta moça bonita*

*Nas ruas que não andei  
(E há uma rua encantada  
Que nem em sonhos sonhei...)*

*Quando eu for, um dia desses,  
Poeira ou folha levada  
No vento da madrugada,  
Serei um pouco do nada  
Invisível, delicioso*

*Que faz que o teu ar  
Pareça mais um olhar,  
Suave mistério amoroso,  
Cidade do meu andar  
(Deste já tão longo andar!)*

*E talvez de meu repouso...*

*O MAPA  
Mário Quintana*

## **Dedicatória**

*Este trabalho é dedicado às pessoas que mais amo:*

*Especialmente ao grande amor **Junior**, que veio a mim como um presente de Deus. O seu carinho, afeto e dedicação serviram como um esteio e permitiram que chegássemos juntos a este momento tão feliz.*

*À minha avó **Diva**, que certamente está zelando por mim. Lamento por ela não estar mais entre nós, e não poder participar deste momento especial e que tanto a orgulharia.*

*À minha mãe **Elizabeth**, por ser meu maior exemplo de mulher, e que, como toda “virginiana”, ensinou-me a chegar o mais próximo possível da perfeição.*

*Ao meu pai, **Paulo**, de quem herdei o amor à medicina e a coragem e perseverança para perseguir minhas metas com determinação.*

*Ao meu estimado tio **Oliver**, que, ao longo da vida, tornou-se meu segundo pai.*

*Às minhas queridas irmãs **Ana Paula** e **Betina**.*

## **Agradecimentos Especiais**

*Ao Prof. Dr. Mário Reis Álvares-da-Silva, meu orientador, que mesmo sem me conhecer, prontamente confiou e apostou em minha capacidade. Reúne virtudes como inteligência, perspicácia e equilíbrio emocional e dedica-se com especial devoção à profissão e seus orientandos. Ao longo do caminho tornou-se um mestre e mais do que isto, um grande amigo. Sinto um grande orgulho de poder participar da sua equipe. Agradeço profundamente por tudo.*

*Ao Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira, meu co-orientador extra-oficial, sou grata por ter-me aberto as portas do seu laboratório, no qual me senti tão confortável quanto em minha própria casa. Pesquisador de renome, tem a alma inquieta de cientista, e uma simplicidade no trato quase inacreditável para uma pessoa de tanta relevância no meio acadêmico.*

*À Prof. Dra. Themis Reverbél da Silveira, por se constituir no meu maior exemplo, meta inatingível. Mulher determinada, profissional brilhante, ser humano iluminado, no qual humildemente me inspiro. A Hepatologia não seria a mesma sem a sua presença.*

*Ao meu fiel bolsista e anjo da guarda **Glauber Gasperin**. O mestrado propiciou-me entre outras tantas coisas maravilhosas, a oportunidade de tornarmos grandes amigos.*

## **Agradecimentos**

*Ao Programa de Pós-Graduação em Gastroenterologia, na pessoa do Prof. Dr. Sérgio Gabriel de Barros, pela oportunidade do aprendizado.*

*Ao Prof. Dr. Carlos Thadeu Schmidt Cerski, pela análise histológica.*

*À Prof. Dra. Roseli de Oliveira Möllerke, pelo seu entusiasmo e pelas sugestões fornecidas.*

*À colega Daniela Rodrigues Keiserman, por ter me ensinado com paciência a técnica cirúrgica experimental, fundamental para o desenvolvimento deste projeto.*

*Às queridas amigas Raquel Scherer de Fraga, Ana Carolina de Bragança e Vera Camacho pela generosidade e coleguismo.*

*À Luciana Harlacher, pelo auxílio nos procedimentos cirúrgicos, coleta de material e as intermináveis e prazerosas horas de conversas durante o longo tempo dedicado ao experimento.*

*À toda equipe da Unidade de Experimentação Animal do HCPA, em especial nas pessoas do médico veterinário Marcos Eugênio Soares Duarte, pela sua dedicação, auxílio e paciência e do biólogo e amigo Eduardo Mottola Amaro da Silveira, que tantas vezes madrugou para ajudar-me nos experimentos, acabando por tornar-se meu anestesista oficial e de grande competência.*

*À Equipe do Laboratório de Biofísica da PUCRS, especialmente a Paula Elisa Tischler Heinen, Henrique Bregolin Dias e Carlos Eduardo Leite, pelas inúmeras horas dispensadas a este estudo, além da dedicação, amizade e disponibilidade demonstradas.*

*Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Gastroenterologia, Moema Vianna Goulart e Jamile da Silva Ladeira, pela competência, dedicação e carinho dispensados.*

*A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desta tese e que, involuntariamente, deixaram de ser nominadas.*

*E finalmente à **Nossa Senhora**, minha madrinha e intermediária junto a **Deus** que vem me guiando ao longo desta existência.*

## **SUMÁRIO**

### **LISTA DE ABREVIATURAS**

### **LISTA DE TABELAS**

### **LISTA DE QUADROS**

### **LISTA DE FIGURAS**

## **1. INTRODUÇÃO 1**

- 1.1. O transplante hepático **1**
- 1.2. Doadores com critérios estendidos **5**
- 1.3. Considerações acerca do estado nutricional do doador **6**
- 1.4. O dano de isquemia e reperfusão **7**
  - 1.4.1. Considerações gerais **7**
  - 1.4.2. A lesão de pré-preservação **8**
  - 1.4.3. A lesão de preservação a frio **9**
  - 1.4.4. A lesão de preservação a quente e a lesão de reperfusão **10**
  - 1.4.5. Aferição do dano de preservação **11**
- 1.5. O estresse oxidativo **12**
- 1.6. As soluções de preservação **14**
  - 1.6.1. A solução Universidade de Wisconsin **14**

1.6.2. A frutose-1,6-bisfosfato como solução de preservação **15**

## **2. JUSTIFICATIVA 18**

## **3. OBJETIVOS 19**

3.1. Objetivo geral **19**

3.2. Objetivos específicos **19**

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS 20**

4.1. Delineamento e tamanho da amostra **20**

4.2. Os animais de experimentação **20**

4.2.1. Aspectos gerais **20**

4.2.2. Aspectos dietéticos **21**

4.3. O experimento **23**

4.3.1. Manipulação da Dieta Lieber-De Carli **23**

4.3.2. Coleta de sangue para análise metabólica **24**

4.3.3. O procedimento anestésico **24**

4.3.4. O procedimento cirúrgico **24**

4.3.5. A perfusão e preservação hepáticas **25**

4.3.6. Avaliação metabólica e do estado nutricional **26**

4.3.7. Avaliação do dano isquêmico, da lipoperoxidação e geração de antioxidantes endógenos **28**

4.3.8. A morte dos animais **29**

4.3.9. Local de realização dos experimentos **29**

4.3.10. Descarte dos materiais **30**

4.4. Análise estatística **30**

4.5. Aspectos éticos **30**

## **5. FINANCIAMENTO 32**

## **6. RESULTADOS 33**

### **6.1. Aspectos gerais 33**

### **6.2. Avaliação metabólica e do estado nutricional 36**

#### **6.2.1. Peso dos animais, dos fígados e relação peso dos fígados/peso animais 36**

#### **6.2.2. Albumina e delta-albumina 37**

#### **6.2.3. Glicemia e delta-glicemia 37**

#### **6.2.4. Insulina 39**

### **6.3. A avaliação do dano isquêmico, lipoperoxidação e geração de antioxidantes endógenos 39**

#### **6.3.1. Aspectos gerais 39**

#### **6.3.2. Análise bioquímica da preservação a frio 39**

#### **6.3.3. Análise da lipoperoxidação e da geração de antioxidantes endógenos 40**

### **6.4. Análise anatomopatológica 46**

## **7. DISCUSSÃO 48**

### **7.1. Em relação ao desenho do estudo 48**

### **7.2. Em relação aos resultados da avaliação metabólica e estado nutricional 53**

### **7.3. Em relação aos achados anatomopatológicos 55**

### **7.4. Em relação aos resultados da avaliação bioquímica do dano da isquemia 56**

- 7.5. Em relação aos resultados da lipoperoxidação e geração de antioxidantes endógenos **59**
- 7.6. Em relação aos estados nutricionais e a lesão de preservação nos fígados dos ratos preservados com a solução padrão para transplante **62**
- 7.7. Mecanismos sugeridos para ação protetora da FBP no modelo proposto **64**

## **8. CONCLUSÕES 65**

## **REFERÊNCIAS 66**

## **ANEXOS 83**

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ABTO = Associação Brasileira de Transplante de Órgãos

AD = água destilada

ALT = alaninoaminotransferase

ANOVA = análise de variância

AST = aspartatoaminotransferase

CAPES = Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CIOMS = *Council for International Organizations of Medical Science*

COBEA = Manual Técnico em Bioterismo

CREAL = Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório

CTI = Centro de Tratamento Intensivo

DCE = depuração da creatinina endógena

DPC = desnutrição protéico-calórica

DMC = dieta deficiente em metionina e colina

EO = estresse oxidativo

FBP = frutose-1,6-bisfosfato

FIPE = Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos

HCPA = Hospital de Clínicas de Porto Alegre

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = peróxido de hidrogênio

HTK = Histidina-triptofano-cetoglutarato

IASP = *International Association for the Study of Pain*

IF = isquemia a frio

ILAR = *Guide for Care and Use for Laboratory Animal*

INR = *International Normalized Ratio*

I/R = isquemia e reperfusão

LDH = lactatodesidrogenase

LPO = lipoperoxidação

LSD = *Least Significant Difference*

MELD = *Model for End-Stage Liver Disease*

MDA = malondialdeído

NFPE = não-função primária do enxerto

NIH = *National Instituts of Health*

NO = óxido nítrico

O<sup>2-</sup> = ânion superóxido

OH· = radical hidroxil

ONOO· = peroxinitrito

ONT = Organización Nacional de Transplantes

PROF = Programa de Fomento à Pós-Graduação

PUCRS = Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

RL = radicais livres

RNS = espécies reativas ao nitrogênio

ROS = espécies reativas ao oxigênio

SF = soro fisiológico

TBARS = substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA = ácido tricloroacético

OH· = radical hidroxil

TNF $\alpha$  = fator de necrose tumoral  $\alpha$

T<sub>3</sub> = triiodotironina

Tx H = transplante hepático

UEA = Unidade de Experimentação Animal

UFRGS = Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UNESCO = *United Nation Education Science and Cultural Organization*

UNOS = *United Network for Organ Sharing*

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Peso dos animais e dos fígados, em gramas, e relação entre o peso do fígado/peso do animal, conforme o grupo, após a intervenção nutricional, no final de 4 semanas **37**

**Tabela 2.** Médias das dosagens séricas de albumina em mg/dL antes, após a intervenção dietética e delta-albumina, conforme grupo **38**

**Tabela 3.** Médias das glicemias em mg/dL antes, após a intervenção dietética e delta- glicemia, conforme grupo **38**

**Tabela 4.** Medianas de AST aferidas nas soluções de preservação dos fígados dos animais após 2, 4, 6 e 8h de isquemia a frio, nos diferentes grupos estudados **41**

**Tabela 5.** Medianas de ALT aferidos nas soluções de preservação dos fígados dos animais após 2, 4, 6 e 8h de isquemia a frio, nos diferentes grupos estudados **42**

**Tabela 6.** Medianas de LDH aferidas nas soluções de preservação dos fígados dos animais com 2, 4, 6 e 8h, nos diferentes grupos estudados **43**

**Tabela 7.** Médias e desvios-padrão de TBARS e catalase aferidas no tecido hepático dos animais, nos diferentes grupos estudados **45**

**Tabela 8.** Achados anatomopatológicos após a preservação a frio de fígados de ratos, submetidos à intervenção dietética **46**

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1.** Composição da dieta Lieber-De Carli 22

**Quadro 2.** Os grupos de animais de acordo com a oferta calórica e a solução de preservação a ser utilizada 26

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Evolução dos transplantes hepáticos nos Estados Unidos entre 1988 e 2005 **2**

**Figura 2.** Evolução dos transplantes de fígado no Brasil **4**

**Figura 3.** Mecanismos relacionados à lesão celular durante o período de isquemia a frio **11**

**Figura 4.** Rota glicolítica **17**

**Figura 5.** Fluxograma do estudo **27**

**Figura 6.** Caixas moradia individuais **34**

**Figura 7.** Animais em suas caixas-moradia, alimentando-se conforme grupo **35**

**Figura 8.** Animal sob campânula no momento da indução anestésica **35**

**Figura 9.** Aspecto macroscópico dos animais após laparotomia, evidenciando-se a gordura intrabdominal mais pronunciada na foto 2 **36**

**Figura 10.** Medianas de AST, ALT e LDH em UI/L em 2, 4, 6 e 8h nos 7 diferentes grupos estudados **44**

**Figura 11.** Aspecto do fígado de um animal alimentado com dieta normal, preservado com UW **47**

**Figura 12.** Aspecto do fígado de um animal alimentado com dieta hiperlipídica, preservado com UW **47**



## RESUMO

O uso de órgãos providos de doadores com critérios estendidos tem-se tornado bastante comum em transplante hepático (TxH). Com frequência, os doadores encontram-se agudamente desnutridos ou apresentam critérios sugestivos de síndrome metabólica e, conseqüentemente, esteatose hepática. Há sugestões de que estados nutricionais alterados possam se refletir na qualidade do enxerto, e são necessárias medidas para contrabalançar estes efeitos. A solução da Universidade de Wisconsin (UW) é o padrão para TxH, e alguns estudos experimentais sugerem que a frutose-1,6-bisfosfato (FBP) possa ser útil na preservação de órgãos. O presente estudo tem o objetivo de comparar a influência do estado nutricional sobre o dano de isquemia a frio, utilizando soluções de preservação distintas.

Foram utilizados ratos 35 Wistar machos, divididos em 3 grupos, de acordo com a dieta: I: dieta normal; II: dieta restrita e III: dieta hiperlipídica (dieta Lieber-De Carli modificada). Os animais foram aleatoriamente alocados e receberam dieta padronizada por 4 semanas, de acordo com o grupo. Foi realizada hepatectomia, sob anestesia inalatória, e os fígados foram preservados durante 8 horas em solução de FBP ou de UW. O dano de preservação foi estimado através de alíquotas do líquido de preservação (LP), com dosagem de AST, ALT e LDH, lipoperoxidação (através de TBARS), geração de antioxidantes endógenos e exame anatomopatológico.

O estado nutricional teve influência na qualidade da preservação. Os fígados de ratos submetidos à dieta restrita foram os que tiveram a menor lesão de isquemia a frio, enquanto que os submetidos à dieta hiperlipídica, a pior ( $p < 0,05$ ).

Nos ratos submetidos à dieta normal e restrita, a lesão de isquemia a frio foi menos intensa por todos os critérios nos ratos preservados com FBP ( $p < 0,05$ ). Nos ratos submetidos à dieta hiperlipídica, não houve diferença entre as soluções.

## ABSTRACT

Donor shortage is becoming a huge problem in the last years, and this fact indeed stimulates the use of organs from extended criteria donors for liver transplant (LT). These donors are submitted to the risks of acute malnutrition and, often, there are metabolic syndrome and liver steatosis. Nutritional donor status may influence graft quality after harvesting. Most of LT centers use to adopt University of Wisconsin (UW) solution for preservation, and some experimental studies suggest that in this scenario FBP also could be used. This study aims to evaluate the influence of donor nutritional status on ischemic injury of UW or FBP preserved rat livers.

There were studied 35 male Wistar rats, randomly assigned into 3 groups, accordingly to the diet: I- normal diet; II: restricted diet; III: high-fat liquid diet (Lieber-De Carli modified diet), offered by 4 weeks. Livers were preserved after hepatectomy during 8 hours either with FBP or UW. Ischemic injury was assessed by AST, ALT, LDH, TBARS, catalase and also by histopathological study.

Nutritional donor status does affected graft quality. Livers from rats submitted to restricted diet had lower ischemic injury, while those from high-fat diet got worse results ( $p < 0.05$ ). Regarding preservation solution, ischemic injury was less pronounced in livers from rats that received normal or restricted diets, and were preserved with FBP ( $p < 0.05$ ). There was no difference between both solutions on the ischemic injury of livers from high-fat diet fed rats.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. O Transplante Hepático

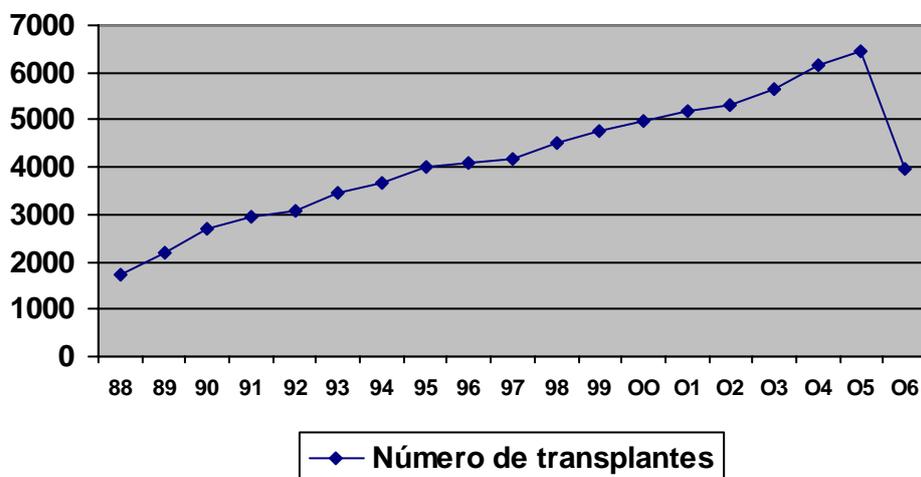
O recrutamento de sofisticado armamentário terapêutico, tanto clínico-endoscópico como cirúrgico, tem contribuído nos últimos anos para a melhor e mais eficiente abordagem das hepatopatias. O transplante hepático (TxH) é um divisor de águas, posto que modificou as perspectivas dos pacientes hepatopatas gravemente enfermos. Foi com o advento do transplante que a medicina deixou de abandonar os indivíduos portadores de hepatopatias terminais, antes condenados ao óbito.

O desenvolvimento técnico-cirúrgico e o surgimento de agentes imunossupressores na década de 50 foram os alicerces fundamentais para que, em 1963, fosse realizado pela equipe de Thomas Starzl, em Denver Colorado, Estados Unidos, o primeiro transplante em humanos (Starzl, 1996a). Os anos subsequentes foram marcados por insucessos, mas permitiram o aperfeiçoamento da técnica. Com o advento da ciclosporina, um potente fármaco imunossupressor, em 1983, através de um melhor controle da rejeição, o TxH pôde de fato alcançar melhores resultados, estimulando sua disseminação. (Williams, 1990; Vera *et al*, 1993; Starzl, 1996b; Yoshida & Lake, 1997).

Sendo assim, vinte anos após o primeiro TxH, na Conferência de Consenso do *National Institutes of Health (NIH)*, realizada em Bethesda, Estados Unidos, o procedimento foi resgatado da condição de técnica experimental e passou

a ser considerado, então, um método terapêutico (Levy, 1998). Tendo recebido a chancela do tempo, o transplante é atualmente o tratamento de escolha para uma série de doenças crônicas e agudas graves do fígado (Everson & Trotter, 2003).

Segundo a *United Network for Organ Sharing* (UNOS), organização americana responsável pela procura e distribuição de órgãos, foram realizados 78.935 transplantes hepáticos naquele país entre janeiro de 1998 e julho de 2006 (UNOS, 2006). A Figura 1 mostra a evolução no número de transplantes nos Estados Unidos. Atualmente há 145 programas de TxH nos Estados Unidos, realizando uma média de 45 transplantes ao ano, com sobrevida média do enxerto em 1 ano de 81,9%. (UNOS, 2006).



**Figura 1.** Evolução dos transplantes hepáticos nos Estados Unidos entre 1988 e julho de 2006. Fonte: UNOS, 2006.

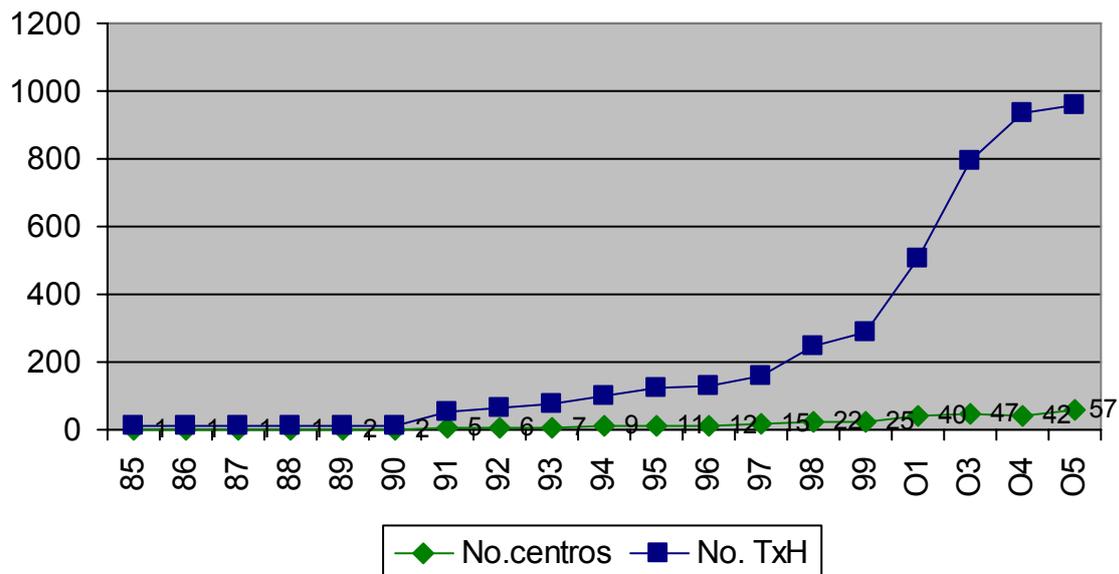
No Brasil, o primeiro transplante hepático foi realizado em São Paulo em 1985, e os dados da Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO) são

claros em demonstrar notável incremento no número de transplantes a partir do ano de 1991. O número de centros transplantadores de fígado evoluiu de 2 em 1989 para 57 em 2005 (ABTO, 2005). O número de pacientes transplantados igualmente aumentou: foram 10 em 1990 e 956 em 2005, realizados em 11 estados da federação (ver Figura 2).

A despeito do aumento no número de transplantes, até o mês de julho de 2006, 17.140 pacientes aguardavam por um novo fígado nos Estados Unidos, sendo que 12.354 (72%) o faziam por mais de 12 meses. Isto é particularmente perverso quando se analisa a evolução histórica, pois entre 1988 e 2004 houve um incremento de 3,6 vezes no número de pacientes transplantados naquele país, mas a lista de espera, em contrapartida, aumentou 12,1 vezes. Não surpreende, portanto, que neste período o número de óbitos em lista tenha sofrido um acréscimo em torno de 5 vezes. Estes fatos determinaram, em 2002, a introdução de uma nova política de alocação de pacientes em lista, e desde então, número de mortes na espera por um fígado, tem se mantido estável em torno de 1.800 óbitos/ano (UNOS, 2006). O principal fator a limitar o número de pacientes beneficiados com transplantes, não só nos Estados Unidos, é a escassez de órgãos (Norman, 1997; Bosch, 1999; Jiménez-Romero *et al*, 1999; Melendez & Heaton, 1999; McMaster & Vadeyar, 2000; Busuttil & Tanaka, 2003, Chang *et al*, 2003). Embora tenha havido aumento no número de doadores nos últimos anos, o número de candidatos tem crescido de forma muito mais rápida. A Espanha, considerada modelo na captação de órgãos, conseguiu a impressionante taxa de 33,7 doadores por milhão de habitantes em 1999 (Chang *et al*, 2003). Mesmo assim, o tempo de espera em lista também tem se estendido neste

país (ONT, 2005). Nos Estados Unidos a taxa de doadores efetivos não passou de 21,6 por milhão de habitantes naquele ano (Chang *et al*, 2003), e a situação brasileira é ainda mais preocupante. Dados da ABTO dão conta que a taxa de doação de órgãos e tecidos é muito baixa. No ano de 2005 a média foi de 6,3 doadores por milhão de habitantes, ainda 10% menor que no ano de 2004. O Rio Grande do Sul, por sua vez, tem a melhor captação do país, com uma taxa de 11,5 doadores de fígado por milhão de habitantes (ABTO, 2005), mas estes números são insuficientes para atender a demanda. A capacidade das sociedades em gerar mais órgãos para os transplantes parece estar próxima de seu limite, o que deve trazer mais mortes nas listas de espera em um futuro próximo.

A limitação de órgãos e a crescente mortalidade em lista de espera impulsionaram a discussão dos critérios para alocação dos mesmos. Em fevereiro de 2002 foi adotado nos Estados Unidos, o escore MELD (*Model for End-Stage Liver Disease*), desenvolvido por pesquisadores da *Mayo Clinic*, Rochester, Estados Unidos, que privilegia dados objetivos para definir qual paciente deve receber o enxerto disponível (Kamath et al, 2001; Freeman, 2004). Este modelo baseia-se em três parâmetros laboratoriais: bilirrubina total, tempo de protrombina expresso em INR (*International normalized ratio*) e creatinina, através de um cálculo logarítmico para se obter um índice correlacionado à mortalidade esperada em 3 meses (Malinchoc et al, 2000). No Brasil, a política de alocação de órgãos, até início do corrente ano, contemplava a cronologia e vinha sendo alvo de severas críticas (Sette et al, 2003). Recentemente o MELD também foi adotado como critério vigente em nosso país, através da Portaria Ministerial nº 1.160 publicada no Diário Oficial em 29 de maio. (Ministério da Saúde, 2006).



*Disease*), desenvolvido por pesquisadores da *Mayo Clinic*, Rochester, Estados Unidos, que privilegia dados objetivos para definir qual paciente deve receber o enxerto disponível (Kamath et al, 2001; Freeman, 2004). Este modelo baseia-se em três parâmetros laboratoriais: bilirrubina total, tempo de protrombina expresso em INR (*International normalized ratio*) e creatinina, através de um cálculo logarítmico para se obter um índice correlacionado à mortalidade esperada em 3 meses (Malinchoc et al, 2000). No Brasil, a política de alocação de órgãos, até início do corrente ano, contemplava a cronologia e vinha sendo alvo de severas críticas (Sette et al, 2003). Recentemente o MELD também foi adotado como critério vigente em nosso país, através da Portaria Ministerial nº 1.160 publicada no Diário Oficial em 29 de maio. (Ministério da Saúde, 2006).

**Figura 2.** Evolução dos transplantes hepáticos no BrasilFonte: ABTO, 2005. TxH= transplantes hepáticos.

Em face da escassez de enxertos, a discussão não se restringe à melhoria dos critérios de alocação dos pacientes. Novas estratégias, para contrabalançar o desequilíbrio na equação candidatos-doadores, vêm sendo consideradas. O uso de fígado artificial, o transplante de hepatócitos, o xenotransplante constituem-se em promessas experimentais. O transplante intervivos é uma alternativa, e vem sendo cada vez mais empregado em nosso país (ABTO, 2005), embora isto possa ser motivo de crítica. A consequência natural é a crescente aceitação de órgãos provindos dos chamados “doadores marginais”, mais apropriadamente denominados doadores com critérios estendidos (Morris, *et al*, 2004; Pokorny *et al*, 2005).

## 1.2. Doadores com critérios estendidos:

Um conceito que defina doador com critérios estendidos (DCE), que seja amplamente aceito, ainda não está disponível e vem evoluindo ao longo da última década (Gruttadaria *et al*, 2005). Via de regra considera-se um órgão não ideal aquele proveniente de um doador em condições não-ótimas, quais sejam: a) idade superior a 60 anos; b) longa permanência em centros de tratamento intensivo (CTI), em especial com mais de 4 dias de ventilação mecânica; c) prolongados períodos de hipotensão ou altas doses de vasopressores; d) hipernatremia (sódio sérico acima de 155mEq/L); e) creatinina sérica acima de 1,2mg/dL; f) provas de função hepática alteradas, embora este seja um quesito bastante polêmico; g) índice de massa corporal acima de 30; h) presença de esteatose superior a 30%; e i) tempo de isquemia a frio acima de 10 horas, entre outros critérios menos comuns e seguidos de forma individual em cada centro transplantador (Gastaca *et al*, 2005; Pokorny *et al*, 2005).

A aceitação destes doadores expande o número de órgãos utilizados e, por conseguinte, tende a aumentar o número de transplantes realizados, mas expõe os receptores a riscos ainda não conhecidos ou adequadamente documentados por estudos clínicos (Busuttil & Tanaka, 2003; Pokorny *et al*, 2005). É de conhecimento geral que pior o doador pior o enxerto, elevando-se as chances do mesmo ser danificado durante os procedimentos de retirada e implante (De Carlis *et al*, 1996; Pokorny *et al*, 2005). As conseqüências desta atitude por certo ainda não estão devidamente calculadas. Para Schaffer & Sorrell, 1996, face à crônica escassez de órgãos, qualquer medicação, técnica ou intervenção que contribua para a sua maior

disponibilidade ou que traga benefícios à sua viabilidade deve ser extremamente bem-vinda.

Rocha et al, 2004, estudando retrospectivamente uma série brasileira de 148 pacientes submetidos a transplante hepático concluíram que o uso de doadores marginais é seguro, com efeito positivo sobre o tempo de espera em lista.

### 1.3. Considerações acerca do estado nutricional do doador

Os doadores de órgãos podem pertencer a diferentes grupos, a saber:

a) doadores com coração batendo: doador com morte encefálica, doador vivo relacionado, doador vivo não-relacionado e doador anencefálico; b) doadores com o coração parado; e c) animais (Magalhães et al, 2004). O doador de múltiplos órgãos costuma ser o indivíduo em morte encefálica internado em CTI. O motivo da morte encefálica, via de regra, envolve dano direto ao sistema nervoso central. Segundo dados da UNOS, 2006, nos Estados Unidos a causa de óbito em 55.370 (64,5%) de 85.966 doadores de fígado foi o traumatismo crânio-encefálico ou o acidente vascular cerebral.

O estado nutricional dos doadores, por outro lado, pode variar consideravelmente. Aquele indivíduo que ao ingressar na CTI evolui à morte encefálica de forma rápida em geral não apresenta desnutrição protéico-calórica (DPC). É o paciente que se encontra em seu estado de nutrição habitual, e muitas vezes, está adequadamente nutrido. No entanto, mesmo este paciente pode apresentar alterações nutricionais relevantes, em especial a obesidade, que é um fator de risco associado ao desenvolvimento de eventos vasculares cerebrais. A esteatose hepática, que pode ocorrer secundária à obesidade, é um reconhecido fator de risco para não-função primária do enxerto (NFPE) (Takahashi *et al*, 2000; Fiorini *et al*, 2005). Tanto isto é verdadeiro que a maior parte dos grupos de transplante não aceita órgãos com esteatose acima de 65% (Imber *et al*, 2002). Além disto, uma proporção significativa de doadores é constituída de suicidas e vítimas de acidentes

de trânsito, ambas as populações associadas a consumo de quantidades expressivas de álcool e, por conseguinte, expostas a maior risco de esteatose.

Um grupo que merece especial atenção é aquele em que há uma longa internação hospitalar em CTI, com um quadro grave que se arrasta por dias, com infecção superposta na maioria dos casos. Os indivíduos que apresentam tal evolução podem se tornar agudamente desnutridos. O estado nutricional tem correlação íntima com o fígado: a presença de desnutrição protéico-calórica (DPC) afeta negativamente o órgão, com menor tendência à regeneração hepatocelular (McCullough, 2000). Assim, pode-se postular que um indivíduo agudamente desnutrido apresentaria pior função hepática, e que um órgão retirado nestas condições seria menos adequado para transplante do que aquele retirado de um indivíduo bem nutrido.

A preocupação com o tema não é recente. O grupo de Belzer, em 1994, publicou estudo em que discutia o assunto. Para eles, o estado nutricional do doador afeta a evolução clínica pós-transplante (Sumimoto *et al*, 1994). Singer *et al*, 2001, avaliaram o efeito do estado nutricional em doadores em morte encefálica, chamando atenção para o fato de que a desnutrição é freqüente e pode interferir com a função de diferentes órgãos, dentre eles o fígado. Os autores concluem que a nutrição desempenha um papel importante na modulação da função orgânica pós-transplante.

Ademais, os cirróticos com freqüência são desnutridos, especialmente os candidatos a transplante (Álvares-da-Silva & Silveira, 1998; Figueiredo *et al*, 2000; Stephenson *et al*, 2001; Álvares-da-Silva *et al*, 2004; Campos *et al*, 2004; Gottschall *et*

*al*, 2004; Álvares-da-Silva & Silveira, 2005). O transplante, por sua magnitude, os expõe a um grande estresse cirúrgico adicional, e no período pós-operatório não é raro que complicações clínicas retardem o início da alimentação. Isto significa a persistência de um balanço energético negativo, o que poderia vir a ser ainda mais prejudicial e deletério naquele paciente que recebe um fígado de um doador desnutrido.

#### **1.4. O dano de isquemia/reperfusão**

##### 1.4.1. Considerações gerais

A ausência de função do enxerto no período pós-transplante imediato é provavelmente multifatorial, mas o dano de preservação tem sido freqüentemente implicado (Natori *et al*, 1999; Cohen *et al*, 2000; Almada *et al*, 2003). Obrigatoriamente a realização de um transplante envolve isquemia tecidual. A redução da oxigenação pode atingir o enxerto em diferentes fases do processo de troca do órgão doente pelo sadio (Carrasco *et al*, 1996; Shackleton, 1998). Acredita-se que virtualmente todos os enxertos sejam danificados durante o transplante (Gaffey *et al*, 1997; Wang *et al*, 1998; Cohen *et al*, 2000).

Aos fenômenos nocivos secundários a este processo, tanto aqueles decorrentes das condições pré-mórbidas do doador, da isquemia a quente do órgão antes e durante a sua retirada, do estoque a frio, bem como daqueles provenientes da restituição do fluxo sanguíneo, após sua implantação no receptor, dá-se o nome de lesão de preservação ou ainda lesão de isquemia/reperfusão (I/R). A lesão de

I/R é o fenômeno pelo qual o dano celular em um órgão hipóxico é acentuado após a restauração do fluxo de oxigênio (Teoh & Farrell, 2003).

A preservação de um órgão é a chave inicial para o sucesso do transplante (Southard & Belzer, 1996). No entanto, vários fatores podem determinar dano no enxerto, nas diferentes etapas envolvidas:

#### 1.4.2. A lesão de pré-preservação

A lesão de pré-preservação origina-se de condições patológicas já existentes no órgão doado, como esteatose, lesão por álcool ou fármacos, ou ainda a presença concomitante de outras doenças hepáticas. Eventos associados à morte cerebral, como hipotensão ou hipóxia, provocam efeito semelhante a uma isquemia a quente e possuem a clara tendência de danificar o enxerto (Strasberg, 1997).

A estes fatores somam-se outros potenciais danos durante a cirurgia para a ablação do órgão, como a hipotensão ou a parada cardiorrespiratória (Strasberg, 1997). Nos indivíduos com morte cerebral podem ocorrer alterações endocrinológicas, dentre elas a síndrome eutireóidea, situação em que há redução dos níveis séricos de triiodotironina (T3). Isto pode levar à deterioração da função cardíaca e estimular o metabolismo em anaerobiose (Imberti *et al*, 1998).

A hipóxia tecidual tem papel importante na gênese da lesão de pré-preservação. Os doadores que necessitam de grandes doses de dopamina para manter estável sua pressão arterial estão sob risco de considerável lesão hepática (Mirza *et al*, 1999). A parada cardiorrespiratória, mesmo breve, pode induzir lesão isquêmica adicional ao fígado.

A esteatose hepática é um fator de risco importante ao funcionamento do enxerto pós-transplante (Markin *et al*, 1993; Strasberg, 1997; Miki *et al*, 1998, Melendez & Heaton, 1999, Imber *et al*, 2002). A análise da biópsia de congelação realizada logo antes do transplante é considerada um método útil para excluir órgãos lesados e, conseqüentemente, com maior risco de mau funcionamento (Markin *et al*, 1993). Mesmo na avaliação de doador para transplante intervivos pode haver espaço para uma biópsia pré-operatória, visando especialmente avaliar a extensão da esteatose hepática (Flamm *et al*, 2000).

#### 1.4.3. A lesão de preservação a frio

A conservação em gelo é a técnica rotineiramente empregada para a preservação (Southard & Belzer, 1996), através da combinação do resfriamento da superfície do órgão e da sua perfusão com solução de preservação gelada (Hertl *et al*, 1996). A hipotermia reduz a taxa metabólica e assim prolonga o tempo que as células anóxicas podem reter atividades metabólicas essenciais (Jaeschnke, 1996). Para cada 10°C de redução da temperatura ocorre paralelamente uma queda de 50% na atividade metabólica. A 1°C o metabolismo situa-se em torno de 5% do normal. No entanto, a função de algumas proteases continua a despeito do frio, podendo danificar o órgão (Strasberg, 1997).

Quando há isquemia, por definição há ausência de fluxo sanguíneo, caracterizando hipóxia tecidual. A hipóxia determina a diminuição do aporte de oxigênio à célula, com redução dos fosfatos ricos em energia, redução da atividade da bomba Na/K e alteração na troca de água e íons. Isto promove acúmulo intracelular de íons e conseqüente influxo de água, com edema celular, ao que se

seguem glicólise em anaerobiose e queda do pH, culminando em dano isquêmico (Strasberg, 1997; Massberg & Messmer, 1998).

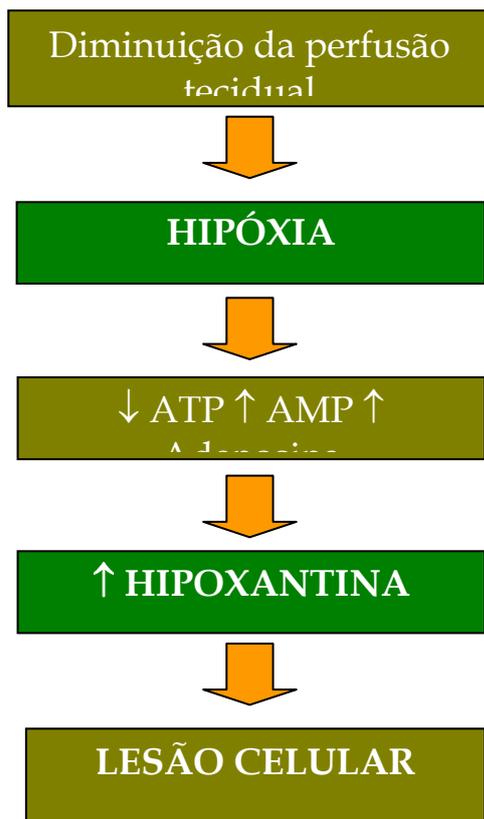
Durante a fase de isquemia o metabolismo celular anaeróbico promove degradação da adenosina para hipoxantina e conversão da xantina-desidrogenase para xantina-oxidase. Com o restabelecimento do fluxo sanguíneo, o oxigênio reage com a hipoxantina e catalisado pela xantina-oxidase produz oxirradicais que interagem de forma destrutiva com as membranas celulares. A hipoxantina desempenha um papel fundamental nestes eventos (Shackleton, 1998). A Figura 3 resume o que ocorre no ambiente celular quando há isquemia tecidual.

#### 1.4.4. A lesão de preservação a quente e a lesão de reperfusão

O dano de aquecimento ocorre no período entre a retirada do órgão do gelo e sua efetiva implantação no receptor, intervalo este que varia habitualmente entre 30 e 60 minutos. Períodos longos de isquemia a quente, especialmente de acima de 90 (Cisneros *et al*, 1991) ou 120 minutos (Strasberg, 1997), correlacionam-se diretamente com não-função primária do enxerto.

A reintrodução do fluxo, ou a reperfusão, quando o sangue portal está novamente banhando o fígado (As *et al*, 1999) representa ainda outro momento de potencial dano, por vezes mais notável que as fases prévias (Teoh & Farrell, 2003) sendo sua extensão dependente do grau de comprometimento do enxerto nas fases anteriores (Strasberg, 1997). O complexo I/R, por conseguinte, resulta tanto da isquemia quanto da reintrodução do fluxo sanguíneo, no denominado “paradoxo do oxigênio” (Minor & Isselhard, 1995; Post *et al*, 1995; Arora & Gores, 1996). A manutenção inicial da isquemia e a geração de radicais livres de oxigênio

desempenham papel determinante na gênese da lesão de reperfusão (Minor & Isselhard, 1995).



**Figura 3.** Mecanismos relacionados à lesão celular durante o período de isquemia a frio. A hipoxantina desempenha papel central na lesão celular, que será agravada na fase seguinte da lesão de I/R, a reintrodução do fluxo sanguíneo. Modificada de Schackleton, 1998.

#### 1.4.5. A aferição do dano de preservação

A liberação das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e desidrogenase láctica (LDH) na solução de preservação é consideradas um importante índice para avaliar a qualidade da preservação do órgão (Jamieson *et al*, 1988), sendo um sensível marcador de danos pré-existentes ou adquiridos durante o período de isquemia a frio (Lange *et al*, 1996). Enquanto as aminotransferases são enzimas que marcam dano hepatocelular, elevando-se

quando há necrose ativa do parênquima, a LDH é uma enzima da rota glicolítica que cataliza a conversão de lactato em piruvato, e que é liberada quando há lesão celular, em situações inespecíficas em que há hipóxia e necrose (Souza *et al*, 2005). Na prática clínica esta aferição não costuma ser realizada, sendo seu uso reservado à pesquisa (Moresco *et al*, 2004).

Ademais, o exame anatomopatológico também pode ser utilizado na avaliação do dano de I/R. A biópsia de congelação, realizada no período de isquemia a frio, tem utilidade limitada neste contexto. De fato, seu uso é reservado para aqueles casos em que existem dúvidas quanto à qualidade do enxerto, como, por exemplo, em um doador infectado pelo vírus da hepatite B ou C, para reconhecer a presença ou não de hepatite em atividade, o que restringiria sobremaneira o aproveitamento do órgão. Por outro lado, naqueles casos em que há esteatose hepática, sua quantificação pode ser decisiva na decisão de prosseguir ou interromper o transplante. Já no que se refere apenas à detecção de lesão secundária à isquemia, o exame anatomopatológico pouco acrescenta (Álvares-da-Silva, 2000; Moresco *et al*, 2004), pois as lesões ainda mais evidentes surgem após a reperfusão.

### **1.5. O estresse oxidativo**

Em um ambiente de pesquisa outros parâmetros podem ser avaliados na tentativa de aferir o dano de preservação, em especial o estresse oxidativo (EO), reconhecidamente envolvido na patogênese da disfunção inicial do enxerto no período pós-transplante (Cogger *et al*, 2004). Os radicais livres (RL) podem ser definidos como espécies químicas capazes de existirem de forma independente e

que apresentem um ou mais elétrons desemparelhados. As espécies reativas do nitrogênio (RNS) incluem o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), enquanto as espécies reativas do oxigênio (ROS) incluem o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), o radical hidroxil (OH<sup>•</sup>) e o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Halliwell & Gutteridge, 1989). Os RL são altamente reativos, tem grande instabilidade e meia-vida curta, de forma que não se deslocam para longe de seu sítio de formação, estabilizando-se ao interagir com qualquer biomolécula adjacente (Southorn & Powis, 1988). Isto faz com que a sua aferição se faça de maneira indireta (Burke *et al*, 2002). A lesão mitocondrial que se segue à reperfusão do fígado em isquemia é considerada a principal fonte geradora de ROS, pois durante a isquemia a cadeia respiratória está reduzida (Belló-Klein, 2002; Teoh & Farrell, 2003).

A vida em aerobiose se caracteriza pela contínua produção de ROS que é contrabalançada pelo consumo de defesas antioxidantes não enzimáticas e pela atividade das enzimas antioxidantes. Assim, em condições fisiológicas, o balanço entre agentes pró-oxidantes e as defesas antioxidantes mantém-se em equilíbrio. Quando esse balanço é rompido em favor dos agentes oxidantes, diz-se que a célula ou organismo se encontra sob estresse oxidativo, com potenciais danos (Belló-Klein, 2002; Busquets *et al*, 2002; Cogger *et al*, 2004). Conseqüentemente, a quantificação do EO torna-se importante para inferir o grau de disfunção hepática no período de preservação do enxerto. Vários fenômenos envolvidos neste processo podem ser úteis na estimativa do grau de EO, como a oxidação de lipídios (lipoperoxidação), a dosagem dos produtos do NO, e a quantificação de substâncias antioxidantes.

A lipoperoxidação (LPO) tem sido freqüentemente relatada como um dos principais mecanismos de lesão celular provocada pelos ROS, sendo definida como uma oxidação de lipídios poliinsaturados (Buege & Aust, 1978). Esse mecanismo é uma reação em cadeia que dá origem a vários produtos de degradação, entre eles o malondialdeído (MDA) que é utilizado como indicador de peroxidação lipídica. O MDA pode ser medido através da dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Halliwell & Gutteridge, 1989) e vem sendo usado como estimativa do EO em vários estudos (Rhoden *et al*, 1996; Lefevre *et al*, 1998; Jain *et al*, 2002; Cogger *et al*, 2004, Moreira *et al*, 2004).

O NO é produzido a partir da L-arginina, através de uma reação catalizada pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS). Posteriormente, se decompõe em  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ , que podem ser deletérios por promover a oxidação e nitrosaminação de macromoléculas biológicas, incluindo a indução da LPO, danos no DNA e inativação de enzimas ou proteínas estruturais (Cadmium, 2002).

Os antioxidantes, por sua vez, compreendem substâncias que retardam ou inibem a ação das ROS e podem ser divididos em dois principais grupos: enzimáticos e não-enzimáticos. Dentre os primeiros, a superóxido dismutase, a catalase e a glutatona peroxidase são mais utilizadas na avaliação do EO (Llesuy, 2002; Cogger *et al*, 2004; Grezzana *et al*, 2004). Os métodos não-enzimáticos, como o  $\alpha$ -tocoferol, o ácido ascórbico e o ácido úrico são bem menos empregados.

## **1.6. As soluções de preservação**

### 1.6.1. Solução Universidade de Wisconsin

A solução da Universidade de Wisconsin (UW) é a solução de preservação mais utilizada pelos grupos de TxH há mais de 15 anos, tendo substituído o uso da solução EuroCollins (Upadhy & Strasberg, 2000). A sua introdução no mercado, no final dos anos 80, foi considerada um marco na história do transplante (Vera *et al*, 1993; Kahn, 1996; Cohen *et al*, 2000) e possibilitou uma isquemia a frio mais longa, com menor lesão tecidual. Outras soluções têm sido sugeridas (Lemasters *et al*, 2001; Quintana *et al*, 2005), mas ainda não demonstraram sua vantagem em relação à UW. A composição da solução UW visa reduzir os efeitos negativos da hipotermia, combatendo o edema celular intersticial e a acidose, bem como fornecer antioxidantes, inibindo ROS, e provendo substrato para a repleção de ATP após a reperfusão (Southard & Belzer, 1996). Apesar deste desenho teórico, ela protege principalmente o enxerto contra os danos decorrentes da fase isquêmica, sendo menos protetora na reoxigenação (Kahn, 1996). Sua principal ação, e o que lhe faz superior em relação a outras soluções, parece ser a capacidade de proteção endotelial (Clavien, 1998). De fato, as células endoteliais dos sinusóides, são os alvos iniciais do dano de preservação (Natori *et al*, 1999).

### 1.6.2. A frutose-1,6-bisfosfato como solução de preservação

A frutose-1,6-bisfosfato (FBP) é um intermediário altamente energético da glicólise (Kirtley & McKay, 1977), formado endogenamente na rota glicolítica, que tem sido relacionado a uma série de efeitos terapêuticos (Nunes *et al*, 2002; Vexler *et al*, 2003). Ver Figura 4. Em 1991, Lazzarino *et al*, estudando corações de ratos, demonstraram que a FBP preserva o ATP intracelular durante períodos de perfusão anóxica, e outros estudos têm sido publicados acerca do uso de FBP na I/R relacionada à cirurgia cardíaca (Riedel *et al*, 2004; Gal *et al*, 2000) e em modelos de transplante, como o de intestino delgado (Sola *et al*, 2003; Sola *et al*, 2004; Genesca *et al*, 2005) e o pulmonar (Chu *et al*, 2002).

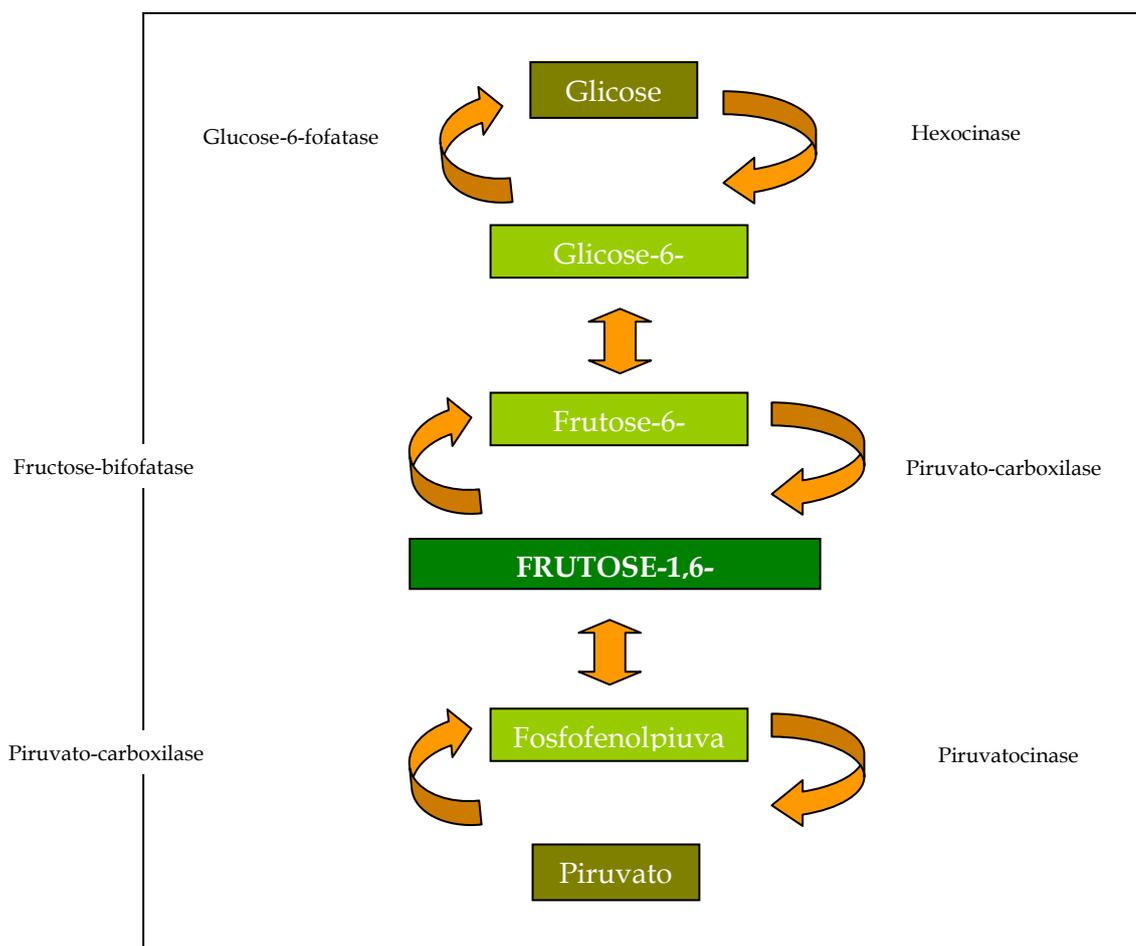
A capacidade da FBP em preservar o ATP intracelular deve ser discutida no contexto da morte celular após a reperfusão, que pode ser secundária à necrose ou apoptose. A apoptose é uma forma programada de remoção de células sem que haja o recrutamento de uma resposta inflamatória ou destruição do ambiente celular, ao contrário da necrose, em que há perda de integridade da membrana plasmática e um grande estímulo à resposta inflamatória (Teoh & Farrell, 2003). O que determina a forma de morte celular pós-reperfusão é o seu conteúdo de ATP. Se diminuído, há necrose, e se mantido em níveis acima de 10 a 20% dos valores habituais, há apoptose. Assim, o conteúdo de ATP intracelular age como uma chave que determina o tipo de morte celular e a consequente resposta inflamatória que ela desencadeará (Lemasters *et al*, 2001). Kim *et al*, 2003, demonstraram em cultura de hepatócitos de ratos o aumento da apoptose quando as células eram incubadas com frutose.

A FBP parece reduzir a lesão tecidual associada à isquemia, choque e dano tóxico, por sua capacidade de aumentar a utilização anaeróbica de carboidratos e inibir a geração de RL pelos neutrófilos (Markow *et al*, 1980; Rao & Mehendale, 1989). Markow *et al*, 2002, demonstraram em modelo animal de transplante cardíaco a redução na proliferação de células T com o uso de FBP. Resultados similares, mas utilizando como modelo, sepse em humanos, foram descritos (Nunes *et al*, 2003a), sugerindo que a FBP tenha um efeito imunomodulador. O mesmo grupo demonstrou, estudando ratos com sepse induzida pela infusão intraperitoneal de *Escherichia coli*, uma menor mortalidade nos ratos tratados com FBP (Nunes *et al*, 2002). De acordo com Nunes *et al*, 2003b, esta ação contra a sepse parece ser devida mais à ação antiinflamatória que antimicrobiana da FBP.

Cuesta e colaboradores, em recente publicação, 2006, estudando a lesão hepática induzida por D-galactosamina em ratos *in vivo* e *in vitro*, confirmaram as atividades antiinflamatórias e imunomoduladoras da FBP, através da redução de endotoxemia, da degradação mastocitária e da liberação de histamina e fator de necrose tumoral-  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Mais que isto, sugeriram um novo mecanismo de ação da FBP. Esta teria uma capacidade exógena de reduzir o consumo de ATP através da modulação dos canais de potássio das membranas das células de Kupffer.

Hirokawa *et al*, 2002, já havia estudado a ativação das células de Kupffer em fígados de ratos, através da aferição de NO e TNF $\alpha$  no líquido de preservação em modelo de isquemia a frio por 24 horas, comparando sua expressão em fígados preservados com UW ou com UW associada à FBP. Os autores

concluíram que houve menor elevação de NO e TNF $\alpha$  nos fígados preservados com solução de UW associada à FBP, salientando a proteção das células de Kupffer, que mantiveram sua capacidade fagocítica. Resultados diversos encontraram, em 2004, Moresco *et al*, estudando fígados de ratos submetidos a um período de 24 horas de isquemia a frio. Comparando a solução de UW com FBP e, ainda, a solução de UW acrescida de FBP, concluíram que a preservação hepática foi pior com esta última. Os resultados foram similares entre FBP e UW. Ademais, a LPO aferida pela reação de TBARS foi menor nos fígados preservados com FBP. Os autores sugeriram que, considerando o alto custo da solução de UW, a FBP poderia ser uma alternativa interessante na composição de outras soluções.



**Figura 4:** Rota glicolítica. O metabolismo da glicose inicia-se com a fosforilação de glicose em glicose-6-fosfato (G6P), que é catalizada pela hexoquinase. Na etapa seguinte, a G6P é isomerizada em frutose-6-fosfato, que é fosforilada a FBP. Posteriormente a FBP é convertida em fosfoenolpiruvato, que sofre ação da piruvato-cinase e transfere um fosfato para o ADP, transformando-se em piruvato. Há consumo de ATP em todas etapas da rota glicolítica. (Kirtley & McKay, 1977).

O nosso grupo tem pesquisado acerca do tema, e resultados ainda parciais e submetidos para publicação do uso de FBP em modelo animal de I/R em comparação com UW têm confirmado os de Moresco *et al*, 2004. A FBP parece ser uma boa alternativa para a preservação a frio do enxerto hepático (Fraga *et al*, 2005; Dal Molin *et al*, 2005).

## 2. JUSTIFICATIVA

A preservação do enxerto é parte fundamental para o sucesso do transplante hepático. Mesmo a solução de UW sendo bastante eficaz, ela ainda não é a ideal, pois não são raros os casos de ausência de função de enxerto no período pós-operatório. Ademais, seu custo é significativo. Neste cenário, a pesquisa de soluções de preservação alternativas parece ser relevante.

O dano de I/R é um *continuum* de lesão que se inicia no doador, mesmo antes da ablação do órgão. Desta forma, características do doador têm influência no estímulo a maior ou menor lesão após o transplante, dentre elas o seu estado nutricional. A presença de esteatose, freqüentemente relacionada à síndrome metabólica e ao consumo de dietas ricas em lipídios, tem sido ligada à disfunção mitocondrial, fonte inicial da geração de ROS. A restrição alimentar e a desnutrição aguda, por sua vez, podem restringir a reserva energética celular. A FBP tem demonstrado sua utilidade em situações de estresse oxidativo como sepse, e seu uso em modelos de isquemia a frio têm produzido bons resultados. A sua oferta durante a isquemia a frio, período em que há glicólise em anaerobiose, poderia poupar os fosfatos intracelulares ricos em energia, diminuindo a tendência à necrose e reduzindo a lesão celular.

A comparação entre FBP e solução de UW na isquemia hepática a frio, em um cenário de diferentes estados nutricionais do doador, é o que justifica este estudo. A hipótese é que a FBP, ao prover maior substrato energético ao hepatócito, poderia ser protetora contra os danos promovidos pela restrição alimentar ou pela dieta hiperlipídica.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar a influência do estado nutricional sobre o dano de isquemia a frio, aferido por parâmetros bioquímicos (AST, ALT, LDH), anatomopatológicos, de lipoperoxidação (TBARS) e geração de antioxidantes endógenos (catalase), em fígados de ratos com dieta normal, restrita ou hiperlipídica.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

3.2.1. Comparar o dano de isquemia a frio após a preservação de fígados de ratos submetidos à dieta normal e preservados com FBF, solução UW ou solução fisiológica (SF).

3.2.2. Comparar o dano de isquemia a frio após a preservação de fígados de ratos submetidos à dieta de restrição e preservados com FBP ou solução UW.

3.2.3. Comparar o dano de isquemia a frio após a preservação de fígados de ratos submetidos à dieta hiperlipídica e preservados com FBP ou solução UW.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Delineamento e tamanho da amostra**

Foi realizado um estudo experimental, cujos fatores em estudo são o estado nutricional e a solução de preservação, e o desfecho o dano de isquemia a frio. Para determinar a dieta que foi oferecida aos animais foi feito um estudo inicial em 10 ratos. Para posterior cálculo amostral realizou-se um estudo piloto com 5 animais em cada braço com observação dos resultados.

### **4.2. Os animais de experimentação**

#### **4.2.1. Aspectos gerais**

Foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, machos em fase reprodutiva, com idade de aproximadamente 120 a 150 dias, pesando entre 270 e 480g, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), alocados na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Foram estudados também animais “idosos” com idade em torno de 50 semanas, mas não considerados para os propósitos deste estudo. Os resultados da avaliação destes animais estão descritos no Anexo 1.

Respeitou-se um período de observação dos animais de sete dias antes do início de todos os experimentos. Os animais foram mantidos em caixas-moradia individuais, confeccionadas em policarbonato, transparentes, medindo 65 x 25 x

15cm, com assoalho recoberto de serragem e contendo em seu interior comedor de alumínio (20mm<sup>3</sup>) e toca de aço inoxidável desenvolvida para seu conforto. Estavam submetidos a ciclo normal claro e escuro, com luzes acesas das 7 às 19h, em ambiente com temperatura controlada, entre 18 e 22°C e receberam água *ad libitum*. Os animais foram divididos em três grupos conforme a oferta nutricional, por 4 semanas até 12 horas antes do experimento: Grupo I: controles com dieta normal (controle); Grupo II: animais submetidos à restrição alimentar (restrição); e Grupo III: submetidos à dieta rica em lipídios (hiperlipídica).

#### 4.2.2. Aspectos dietéticos:

Inicialmente, foi ofertada *ad libitum* a 10 animais a ração sólida, habitualmente utilizada no UEA do HCPA (Nuvilab CR1®-Nuvital Nutrientes Ltda, Colombo, Paraná). Os animais foram mantidos em caixas-moradia individuais por 1 semana e a quantidade de ração consumida foi avaliada a cada dia. Os resultados obtidos estão demonstrados no Anexo 2. A média diária resultante foi de 21,6g, sendo adotados 22g como padrão. Esta foi a quantidade diária disponibilizada a cada animal do Grupo I por 4 semanas.

Aos ratos do Grupo II a dieta proporcionada foi a metade daquela oferecida aos ratos do Grupo I (11g/dia). Aos ratos do Grupo III foi ofertada por 4 semanas, *ad libitum*, dieta hiperlipídica com 1 kcal/mL, à base de óleos vegetais com 71% da energia derivada de gordura, 18% de proteína, e 11% de carboidrato, denominada dieta Lieber-De Carli (Lieber *et al*, 2004). O Quadro 1 demonstra os componentes da referida dieta.

A escolha dos animais e alocação dos mesmos em cada grupo foi realizada de forma aleatória. Para a distribuição aleatória, os animais, em cotas de 10, foram previamente imobilizados (sendo envolvidos em tecido macio) e marcados na cauda com uso de pincel atômico. A partir dessa numeração foi feita a distribuição aleatória nos grupos.

### Quadro 1. Composição da dieta Lieber-De Carli

Componentes	Proporções em g/L
Caseína	41,4
L-cistina	0,5
DL-metionina	0,3
Óleo de milho	48,5
Óleo de oliva	28,4
Óleo de açafrão	2,7
Maltose dextrina	25,6
Colina	0,53
Fibra	10,0
Goma Guar	3,0

Modificado de Lieber *et al*, 2004

Conteúdo vitamínico/1000 ml: tiamina 1,5 mg; riboflavina 1,5 mg, piridoxina 1,75 mg; ácido nicotínico 7,5 mg; pantotenato de cálcio 4,0 mg; ácido fólico 0,5 mg; biotina 50 µg; vitamina B-12 25 µg; ácido p-aminobenzóico 12,5 mg; inositol 25 mg; vitamina A 6000 UI, vitamina D 400 UI, Vitamina E 30 UI; vitamina K 125 µg. Conteúdo de oligoelementos e minerais/1000ml (em mg): cálcio 1300;

fósforo 1000; sódio 255; potássio 900; magnésio 125; manganês 13,5; ferro 8,8; cobre 1,5; zinco 7,5; iodo 0,05; selênio 0,025; cromo 0,5; cloretos 390; sulfatos 250; e fluoretos 0,25.

### 4.3. O experimento

#### 4.3.1. Manipulação da Dieta Lieber -De Carli

A manipulação da dieta seguiu as seguintes etapas: a) foram pesadas as vitaminas do complexo B e ácido fólico: B5 (400mg), B1 (150mg), B6 (175mg), B3 (750mg), B2 (150mg) e ác. fólico (50mg), diluídas em 100ml de água destilada (AD) e reservado 1ml para a dieta; b) pesadas as vitaminas B12 (25mg) e biotina (50mg), diluídas em 100ml de AD e reservado 0,1ml; c) pesados os óleos de milho 48,5g, oliva 28,4g e prímula 2,7g (em substituição ao óleo de açafrão da dieta original) e homogeneizados por 5 minutos; d) em Graal foram colocadas L-cistina (0,5g), DL-metionina (0,3g) e bitartarato colina (0,53g), trituradas e acrescidas a 100ml de AD; e) pesou-se e triturou-se vitamina A (6000UI), vitamina D (400UI), vitamina E (30UI), vitamina K (125mcg), sendo estas acrescidas aos óleos homogeneizados; f) pesou-se e triturou-se em Graal ácido para-aminobutírico (PABA) (12,5mg), inositol (25mg), que foram misturados a 100ml de AD; g) pesou-se caseína (41,4g) e dissolveu-se em 100 ml de AD; h) pesou-se maltodextrina (25,6g), misturou-se em 100ml de AD; i) pesou-se fibra - *Psyllium sp* - (10g) e goma-guar (3g), sendo misturados a 100ml de AD; h) foram pesados e triturados os seguintes minerais e oligoelementos: quelato de cálcio (1300mg), quelato de fósforo (1000mg), cloreto de sódio (255mg), quelato de potássio (900mg), quelato de magnésio (125mg), quelato de manganês (13,5mg), quelato de ferro (8,8mg), quelato de cobre (1,5mg), quelato de zinco (7,5mg), iodeto de potássio (0,05mg), quelato de selênio (0,025mg) e picolinato de cromo (0,5mg) e acrescidos a 100 ml de AD. Todas as pesagens dos substratos foram feitas em balança de precisão marca Gehaka BG 400; i) todas as soluções hidrossolúveis foram

misturadas em Becker e acrescidas aos óleos contendo as vitaminas lipossolúveis; j) foi acrescida AD até se atingir o volume final de 1000 ml; k) todo o conteúdo foi então submetido ao *mixer* marca Black & Decker modelo SB 40, por 60 segundos, resultando uma mistura líquida de densidade leve. A dieta foi mantida em frascos plásticos de 1000ml, fechados e armazenados em geladeira, com validade de 30 dias.

#### 4.3.2. Coleta de sangue para análise metabólica

Os animais dos Grupos II e III tiveram sangue coletado para análise metabólica em dois momentos. A primeira, pela retirada de sangue do lago venoso retro-ocular, antes do início do regime alimentar de 4 semanas, sob anestesia com Ketamina 1,16mg/10ml (Laboratório Vetbrands) e Xilazina 200mg/10ml (Laboratório Calier do Brasil Ltda.), por via intra-peritoneal. Após a perda do reflexo doloroso, o sangue foi coletado com auxílio de capilar de vidro introduzido no plexo venoso retro-ocular, conforme técnica padronizada. A segunda amostra foi obtida ao final das 4 semanas, através de punção cardíaca, sob anestesia inalatória, durante o procedimento cirúrgico, que será descrito a seguir.

Os animais do Grupo I, considerados controles, tiveram uma única amostra sanguínea retirada, após 4 semanas de dieta, durante o procedimento cirúrgico, conforme descrito para os demais grupos.

#### 4.3.3. O procedimento anestésico

No dia da cirurgia, os animais foram retirados de sua caixa-moradia, após 12h de jejum, e procedida indução anestésica com isoflurano 1,5% (Isoflurano®, Laboratório Abbott) por via inalatória, em campânula de policarbonato transparente. A seguir, após imobilidade e perda de reflexo de endireitamento, o animal foi colocado em decúbito dorsal em mesa cirúrgica apropriada. A manutenção da anestesia foi feita através da administração do anestésico por meio de máscara inalatória conectada ao carro de anestesia. Para controle das concentrações administradas de anestésico foi empregado vaporizador calibrado.

#### 4.3.4. O procedimento cirúrgico

Após anestesia, os animais foram submetidos aos seguintes procedimentos: a) assepsia do abdômen com solução de iodo-povidine; b) laparotomia ampla por meio de incisão em U; c) exposição de intestino, que permaneceu rebatido à direita do operador sob proteção de gaze umedecida com cloreto de sódio a 0,9%; d) dissecação romba delicada por meio de hastes plásticas flexíveis com algodão e identificação das veias renal direita, cava inferior e porta; e) punção da veia renal, injeção de 0,1ml (0,8U) de solução de heparina (Liquemine®, Laboratório Roche) e posterior ligadura do vaso; f) passagem de fio de sutura de seda 3-0 como reparo, um na veia cava inferior e dois na veia porta para auxílio dos passos subseqüentes; g) canulação da veia porta com cateter intravenoso de permanência 20G (Abboath® no. 20, Johnson & Johnson); h) conexão do cateter portal com o equipo ligado à solução de preservação; i) ampliação da laparotomia à toracotomia, e coleta de sangue por punção cardíaca; j) liberação do fluxo da solução de preservação para a veia porta; k) abertura da veia cava inferior para facilitar a perfusão hepática; l) exsanguinação e morte do animal sob anestesia; m) retirada do fígado para preservação.

#### 4.3.5. A perfusão e preservação hepáticas

Foram utilizadas para perfusão e preservação hepáticas, de acordo com o grupo, duas soluções distintas: solução de UW (Viaspan®, 320mOsM/L) ou solução salina de FBP (10mmol/l em NaCl 0,9%, 330 mOsM/L), ambas a 4°C. A infusão de 125ml, durante aproximadamente 2 minutos, da solução de preservação foi feita através de cateter portal, de forma contínua, com pressão de 60cm H<sub>2</sub>O.

Mais 5 animais submetidos ao regime alimentar determinado com normal, bem como aos mesmos procedimentos anestésicos e cirúrgicos, conforme descrito, tiveram seus fígados perfundidos e preservados apenas com solução salina ou solução fisiológica (SF) (NaCl 0,9%, Laboratório B.Braun, 308mOsM/L), para posterior comparação com os animais do Grupo I. Estes foram chamados de Grupo IV. O Quadro 2 resume os grupos em estudo.

**Quadro 2.** Os grupos de animais de acordo com a oferta calórica e a solução de preservação a ser utilizada

---

Grupos	Subgrupos
Grupo I	Dieta normal UW
	Dieta normal FBP
Grupo II	Dieta restrita UW
	Dieta restrita FBP
Grupo III	Dieta hiperlipídica UW
	Dieta hiperlipídica FBP
	Dieta hiperlipídica FBP

---

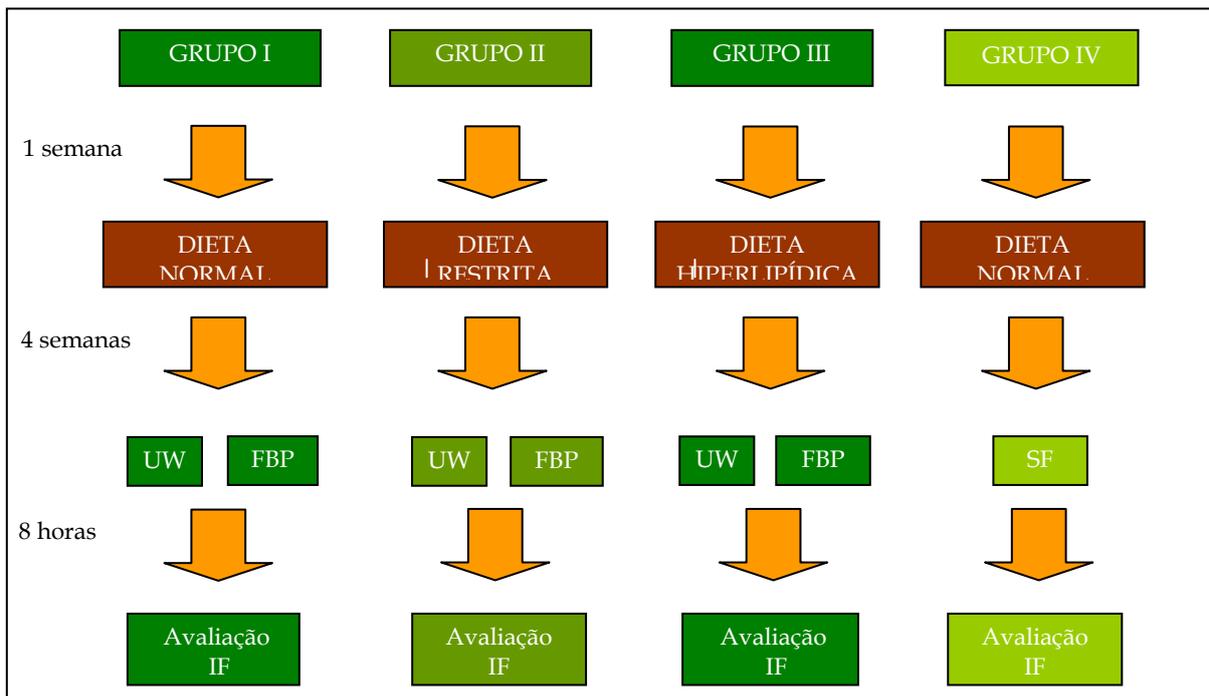
Grupo IV	Dieta normal SF
----------	-----------------

---

A preservação do fígado dos animais ocorreu em 50ml de solução de UW ou FBP, conforme o subgrupo, também à temperatura controlada de 4°C, por 8 horas. Os fígados ficaram acondicionados em recipiente de vidro. A Figura 5 demonstra o fluxograma de atividades executadas.

#### 4.3.6. A avaliação metabólica e do estado nutricional

Os animais foram pesados em balança digital (Marte, modelo AS5500C) antes do período de oferta dietética (grupos II e III) e imediatamente antes do procedimento cirúrgico (todos os grupos). Os fígados de todos os animais foram pesados na mesma balança no final do período de preservação.



**Figura 5.** Fluxograma do estudo. Os ratos foram observados durante 1 semana e após este período alocados aleatoriamente em um dos grupos e submetidos à dieta por 4 semanas. Ao cabo deste período foi realizada hepatectomia sob anestesia e os fígados preservados em solução de UW ou de FBP por 8 horas. Os procedimentos relacionados à avaliação da lesão por isquemia a frio foram então realizados. Onde: UW= solução da Universidade de Wisconsin; FBP= frutose-1,6-bisfosfato; SF= soro fisiológico; IF= lesão de isquemia a frio.

A dosagem da glicemia de jejum de 12h foi realizada através do método cinético UV (aparelho Hitachi 917-Roche) no sangue venoso do animal antes do período de oferta dietética (grupos II e III) e durante o procedimento cirúrgicos (todos os grupos). Através da fórmula: [glicemia pós-intervenção - glicemia pré-intervenção], foi calculado o delta-glicemia. A dosagem da insulina de jejum de 12h, através de radioimunoensaio (Aparelho ECLIA-Modular E 170-Roche), foi feita nos mesmos períodos. Foi determinada a albumina pelo método colorimétrico verde bromocresol (Aparelho Hitachi 917-Roche). Através da fórmula: [albumina pós-intervenção - albumina pré-intervenção], foi calculado o delta-albumina.

Antes da oferta dietética (grupos II e III) e durante o procedimento cirúrgico (todos os grupos), procedeu-se à coleta de sangue para a dosagem de albumina com um kit para humanos através do método colorimétrico verde bromocresol (aparelho Hitachi 917-Roche).

4.3.7. A avaliação do dano isquêmico e da lipoperoxidação e geração de antioxidantes endógenos

Foram retiradas alíquotas da solução de preservação nos tempos 2, 4, 6 e 8 horas. Para avaliação de lesão por isquemia a frio foram dosadas no líquido de preservação AST, ALT e LDH, através do método cinético UV (aparelho Hitachi 917-Roche).

A coleta do material para as análises dependentes do tecido hepático foi padronizada da forma que se segue: 2 finas fatias de aproximadamente 1mm de espessura, eram retiradas com auxílio de lâmina de bisturi, no sentido crânio-caudal da porção média de ambos lobos principais (mediano e esquerdo) e encaminhadas para estudo anatomopatológico; o restante de cada lobo era bipartido em partes iguais, sendo estas separadas em 2 porções, que então somadas a divisão dos lobos secundários, totalizavam aproximadamente 3 a 7g cada; estas respectivas porções eram então acondicionadas em Tubos Falcon contendo uma proporção de 9,0mL de SF ou tampão fosfato para cada grama de tecido e mantida em gelo, para posterior confecção dos homogeneizados e verificação de TBARS e atividade da catalase, respectivamente.

A maceração do tecido hepático foi feita em homogeneizador automatizado (Potter Elvehjem) a 1.500rpm, durante 2 minutos.

A medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi feita com o aquecimento de 125µL do sobrenadante do homogeneizado do tecido hepático, com TBA 0,67% e ácido tricloroacético (TCA) 10% por 15 minutos em banho-maria fervente a 100°C. O produto corado extraído com ácido n-butílico, centrifugado por 10 minutos a 3000rpm e medido por espectrofotometria em 535nm, através da técnica descrita por Halliwell & Gutteridge, 1989. Os dados foram expressos em nmol/g de tecido.

A atividade da catalase foi determinada através da reação entre tampão fosfato 50mM, de pH neutro, e peróxido de hidrogênio 0,3µmol, do homogeneizado do tecido hepático, com a leitura realizada em espectrofotômetro de 240nm, conforme método de Boveris & Chance (1973). As dosagens das proteínas foram feitas pelo método de biureto (Lowry *et al*, 1951). Os dados foram expressos em UI/mg.-proteína de proteína.

A análise anatomopatológica dos segmentos de fígado foi realizada no final das 8h de preservação a frio. Após fixação, o tecido foi embebido em parafina e seccionado a 3µm. Os fragmentos foram montados sobre uma lâmina. Na seqüência fixados com xilol e corados com hematoxilina/eosina. As lâminas foram observadas em microscópio óptico a 40, 100 e 400x. A análise do dano de preservação a frio foi feita por um único patologista, examinando amostras codificadas de tecido. Foram analisadas a presença de infiltrado inflamatório portal e alterações isquêmicas centrolobulares de acordo com sua intensidade: ausente (0), leve (1) e acentuada (2). A esteatose foi classificada de acordo com o tipo (macro ou microvesicular) e

intensidade: ausente (0), menor que 5% (1), entre 5 e 33% (2), entre 33 e 66% (3) e maior que 66% (4).

#### 4.3.8. A morte dos animais

A morte dos animais ocorreu, sob anestesia, por sangria no momento da abertura da veia cava inferior.

#### 4.3.9. Local de realização dos experimentos

Os procedimentos anestésico-cirúrgicos foram realizados na UEA do Centro de Pesquisa do HCPA. A centrifugação das alíquotas de líquido de preservação e a dosagem de AST, ALT, LDH, glicemia, insulina e albumina feitas no Laboratório de Patologia Clínica do Centro de Pesquisa do HCPA. A mensuração de TBARS e catalase, feitas no Laboratório de Biofísica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). A análise anatomopatológica do tecido hepático realizou-se no Laboratório de Patologia do CEA do Centro de Pesquisa do HCPA. A manipulação das dietas foi feita no Blanc Laboratório de Manipulação, em Porto Alegre, sob a supervisão da Farmacêutica Graciema Bauer Dini (CRF 4346).

#### 4.3.10. Descarte de materiais

Todo o material biológico foi colocado em embalagens para resíduo biológico e descartado no serviço de coleta do lixo hospitalar do HCPA. Quanto aos procedimentos histológicos, obedeceram-se os cuidados pertinentes à adequada manipulação do material utilizado como formol, Bouin e xilol, constando de luvas e máscaras. Os resíduos químicos obtidos a partir desses experimentos foram descartados por meio do Instituto de Química da UFRGS.

#### **4.4. Análise estatística**

A todas as variáveis foi aplicado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, os dados que demonstraram normalidade serão expressos como média e desvio padrão, os demais como mediana e intervalo interquartilico. Para comparar as variáveis de medida única foi utilizada ANOVA *one-way*, seguida do teste de comparações múltiplas de Duncan. A comparação de medidas seriadas foi feita pela ANOVA para medidas repetidas, seguida do teste de Tukey e teste das diferenças mínimas LSD (*least significant difference*), após transformação em postos ou *ranks*. O  $\alpha$  assumido como significativo foi de 0,05.

Os dados referentes à análise histológica serão apresentados de forma descritiva. Serão apresentadas as freqüências relativas e absolutas de aparecimento de eventuais alterações histológicas nos grupos estudados.

#### **4.5. Aspectos éticos**

Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com a legislação vigente no Brasil, Lei 6.638 (Diário Oficial da União - 08/05/1979), que estabelece normas para práticas didático-científicas da vivisseção de animais, assim como regulamenta o registro dos Biotérios e Centros de Experimentação.

Atendendo a decreto que determina que o exercício da medicina de animais de laboratório é atividade profissional privativa do médico veterinário - Decreto Lei 64.704 de 17/06/1969 (Capítulo II, Art. 2º, itens "c" e "d") -, o projeto foi

realizado sob a supervisão da médica veterinária Dra. Roseli de Oliveira Möllerker, responsável técnica pelo CEA, especializada em animais de laboratório.

Todos os procedimentos operacionais realizados foram embasados em *Guide for the Care and Use for Laboratory Animals - ILAR/EUA* e *Manual para Técnicos em Bioterismo (COBEA/Brasil)*, e em acordo com *Ethical Guideline for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals*, conforme indicado por *International Association for the Study of Pain (IASP)*. Estes obedeceram às normas propostas pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO, 27 de janeiro de 1978) e Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (*Council for International Organizations of Medical Sciences - CIOMS*). O projeto foi enviado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do HCPA/UFRGS, em fevereiro de 2005, sob o número 05-048.

## 5. FINANCIAMENTO

O presente estudo foi financiado através do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) HCPA (R\$ 8.000,00 - oito mil reais), do Programa de Fomento à Pós-Graduação da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -PROF/CAPES - UFRGS (R\$ 1.730,00 - um mil setecentos e trinta reais) e por recursos próprios (R\$ 1.850,00 - um mil oitocentos e cinquenta reais). O custo totalizou R\$ 11.580,00 - onze mil quinhentos e oitenta reais.

A aluna recebeu bolsa de mestrado da CAPES.



## 6. RESULTADOS

### 6.1. Aspectos gerais

Durante o período de quarentena inicial, nenhum animal apresentou qualquer alteração física ou comportamental que sugerisse comprometimento de seu estado de saúde, sendo todos incluídos no estudo.

No decorrer dos experimentos houve perda de 4 animais: 2 por dificuldade de canulação da veia porta, durante o procedimento cirúrgico, tendo ocorrido morte por hemorragia, sob anestesia; 1 por perfusão inadequada do fígado, quando da liberação da solução de preservação, em razão da canulação seletiva de um dos ramos portais e 1 em decorrência de depressão respiratória determinada pela anestesia peritoneal, utilizada durante coleta sanguínea do lago venoso retro-ocular, antes da intervenção alimentar. Todos os animais perdidos foram repostos por outros de peso e idade semelhantes.

A Figura 6 demonstra os animais em suas caixas-moradia.

Durante as 4 semanas de regime alimentar, os animais do grupo controle consumiram a totalidade da dieta ofertada (22g/dia), exceto raras sobras ocasionais e desprezíveis. No grupo de restrição não se observou resíduos da dieta diária ofertada em nenhuma ocasião. Os ratos do grupo da dieta hiperlipídica consumiram 7.950mL da dieta Lieber-De Carli modificada ao final das 4 semanas, perfazendo uma média de 26,5mL/animal/dia ou 26,5 kcal/animal/dia.

A Figura 7 demonstra os animais em suas caixas-moradia, recebendo a dieta conforme o grupo e a Figura 8 a realização do procedimento anestésico, na fase de indução e manutenção.

Os animais do grupo da dieta hiperlipídica apresentaram com frequência, evacuações pastosas, volumosas e fétidas. Com a evolução dos dias de intervenção dietética foi observada pilo-ereção em todos os animais deste grupo, tendo seus pêlos adotado uma coloração mais amarelada. O comportamento também se modificou, tendo os mesmos se tornado mais agressivos que os animais dos outros grupos.



**Figura 6.** Caixas moradia individuais. Confeccionadas em policarbonato transparente, identificadas com o número do animal e alocadas na UEA-HCPA.

Estes animais apresentaram uma maior proporção de gordura intra-abdominal, em relação aos controles e aos animais sob restrição alimentar – a Figura 9 demonstra estes achados.

A média de peso de todos os ratos incluídos foi de 356g ( $\pm 42$ ) e dos fígados 11,67g ( $\pm 2,49$ ). O Anexo 2 demonstra todos os dados encontrados neste estudo.



1

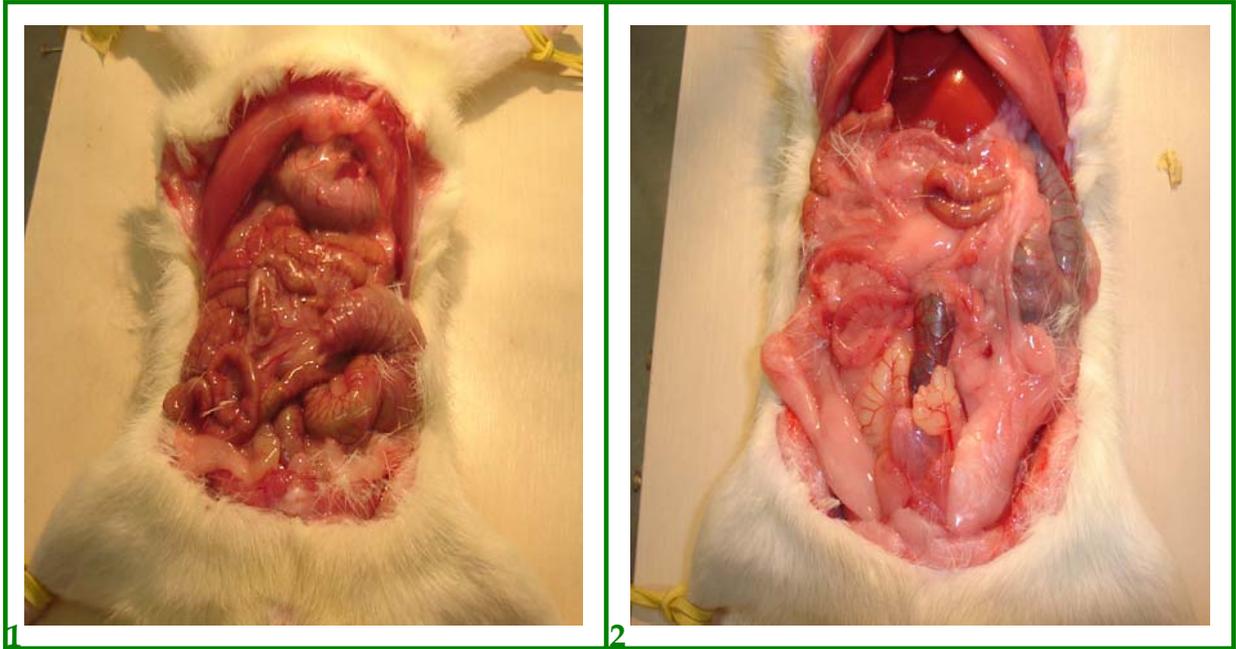
2

**Figura 7.** Animais em suas caixas-moradia, alimentando-se conforme grupo. 1= animal controle recebendo dieta normal (Nuvital CR1); 2= animal recebendo dieta hiperlipídica.



**Figura 8.** Animal sob campânula no momento da indução anestésica.





**Figura 9.** Aspecto macroscópico dos animais após laparotomia, evidenciando-se a gordura intrabdominal mais pronunciada na foto 2. 1= animal controle com dieta normal; 2= animal do grupo da dieta hiperlipídica.

## 6.2. Avaliação metabólica e do estado nutricional

### 6.2.1. Peso dos animais, dos fígados e relação peso dos fígados/peso animais

Quando comparadas as médias de peso dos animais após 4 semanas de intervenção nutricional, estas diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ). A média de peso dos animais com dieta restrita foi 10,3% menor que a encontrada nos animais que receberam dieta normal, assim como a média dos pesos dos animais submetidos à dieta hiperlipídica foi 10,8% maior que nestes últimos.

Com relação às médias dos pesos dos fígados e da relação peso fígado/peso corpóreo do animal, estas foram estatisticamente inferiores no grupo de

animais sob restrição alimentar, quando comparadas aos demais ( $p < 0,05$ ). As médias do peso dos animais, seus fígados e da relação peso do fígado/peso do animal estão representadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Peso dos animais e dos fígados, em gramas, e relação entre o peso do fígado/peso do animal, conforme o grupo, após a intervenção nutricional, no final de 4 semanas.

Grupos	N	Peso animais (g)	Peso fígados (g)	Relação peso fígado/peso animal
Grupo I (controle)	10	357,70* (±35,12)	12,51 (±1,80)	0,035 (±0,0054)
Grupo II (restrição)	10	321,00* (±22,23)	9,30** (±1,60)	0,028*** (±0,0039)
Grupo III (hiperlipídica)	10	396,20* (±35,98)	13,19 (± 2,16)	0,033 (±0,0033)

Os dados estão expressos como média e desvio padrão. \*  $p < 0,001$  (entre os três grupos) \*\*  $p < 0,001$  (Grupo II vs demais grupos); \*\*\*  $p = 0,07$  (Grupo II vs I) - ANOVA, com análise pelo teste de Duncan.

### 6.2.2. Albumina e delta-albumina

Não houve diferença estatística entre as médias das dosagens séricas de albumina quando feita a comparação entre os grupos alimentares antes e após intervenção dietética. Entretanto, quando avaliadas as médias do delta-albumina, os

animais controles que receberam dieta normal apresentaram uma variação estatisticamente maior ( $p < 0,05$ ). Estes dados estão representados na Tabela 2.

### 6.2.3. Glicemia e delta-glicemia

As médias das glicemias antes e após a intervenção dietética, bem como o delta-glicemia foram superiores nos animais submetidos à dieta hiperlipídica, em comparação aos que receberam dieta normal ou restrita ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre as médias das glicemias e delta-glicemia entre estes dois últimos grupos - ver Tabela 3.

**Tabela 2.** Médias das dosagens séricas de albumina em mg/dL antes, após a intervenção dietética e delta-albumina, conforme grupo.

Grupos	N	Albumina- pré (mg/dL)	Albumina- pós (mg/dL)	$\Delta$ albumina (mg/dL)
Grupo I (controle)	10	3,83	2,9	-1,28*
Grupo II (restrição)	10	3,85	3,4	-0,40
Grupo III (hiperlipídica)	10	4,0	3,2	-0,65

Os dados estão expressos como média e desvio padrão. \*  $p = 0,001$  (Grupo I vs II) - ANOVA com análise pelo teste de LSD

**Tabela 3.** Médias das glicemias em mg/dL antes, após a intervenção dietética e delta- glicemia, conforme grupo.

Grupos	N	Glicemia-pré (mg/dL)	Glicemia-pós (mg/dL)	Δ glicemia (mg/dL)
Grupo I (controle)	10	316,2	225,5	-90,7
Grupo II (restrição)	10	390,0	235,5	-143,0
Grupo III (hiperlipídica)	10	271,0*	374,0**	+153,0***

Os dados estão expressos como média e desvio padrão. \*p=0,02 (Grupo III vs demais); \*\*p=0,002 (Grupo III vs demais); \*\*\*p=0,001 - ANOVA, com análise pelo teste de LSD.

#### 6.2.4. Insulina

Foram obtidas leituras da dosagem sérica de insulina em apenas 3 dos 35 animais estudados com o método utilizado (químio-luminescência ECLIA-Aparelho Modular E 170-Roche). A faixa de detecção do método especificada pelo fabricante, situa-se entre 2,6 e 24μUI/mL. O anexo 2 demonstra quais animais tiveram insulina detectada, e suas respectivas dosagens.

### 6.3. A avaliação do dano isquêmico, lipoperoxidação e geração de antioxidantes endógenos

#### 6.3.1. Aspectos gerais

As comparações que se seguem nos subitens abaixo referem-se aos diferentes grupos citados no Quadro 2.

### 6.3.2. Análise bioquímica da preservação a frio

As medianas dos níveis de AST, ALT e LDH, aferidas nos líquidos de preservação, estão descritas, respectivamente, nas Tabelas 4, 5 e 6.

Quando analisadas AST e LDH nos ratos controle, encontrou-se diferença significativa entre os seus níveis quando comparadas as soluções de UW e FBP. Nesta última, os níveis foram significativamente menores. Em relação à ALT, no entanto, não houve diferença neste grupo em relação às soluções. Neste mesmo grupo de animais, quando comparadas as soluções de UW e FBP com SF, notou-se que em relação à AST e LDH, os achados com SF foram equivalentes aos obtidos com FBP. Porém, em relação à ALT, os achados com SF foram inferiores àqueles obtidos com UW e FBP.

Nos animais submetidos à dieta restrita, os achados foram idênticos àqueles encontrados no grupo controle.

Nos animais submetidos à dieta hiperlipídica, no entanto, não houve diferença significativa nos níveis de AST e LDH entre as soluções empregadas. Neste grupo os níveis de ALT foram superiores nos fígados de ratos preservados com FBP.

A figura 10 demonstra, respectivamente, a comparação entre as medianas de AST, ALT e LDH entre os sete diferentes subgrupos estudados.

### 6.3.3. Análise da lipoperoxidação e da geração de antioxidantes endógenos

Ao compararmos os níveis de TBARS no homogeneizado do tecido hepático após a preservação, estes foram significativamente menores nos subgrupos de animais controle e naqueles submetidos à dieta restrita que tiveram seus fígados preservados com FBP. Não houve diferença ao serem comparadas às duas soluções nos fígados dos animais que receberam dieta hiperlipídica.

A atividade da enzima catalase foi significativamente maior nos animais pertencentes aos subgrupos que tiveram seus fígados preservados com UW, tanto nos que receberam dieta normal, restrita ou hiperlipídica.

A Tabela 7 demonstra as comparações entre os níveis de TBARS e a atividade da catalase entre os sete grupos.

**Tabela 4.** Medianas de AST aferidas nas soluções de preservação dos fígados dos animais após 2, 4, 6 e 8h de isquemia a frio, nos diferentes grupos estudados.

Grupos	n	AST 2h	AST 4h	AST 6h	AST 8h
I-UW • (controle)	5	121* (86,5-146,5)	153* (115,5-173,5)	181* (133,5-193)	205* (155-220)
I-FBP • (controle)	5	24* (17,5-37)	35* (27,5-71,5)	53* (32-104)	94* (40-133)
II-UW •• (restrição)	5	68** (34,5-97,5)	80** (44-120)	105** (54-153)	113** (75-184,5)
II-FBP •• (restrição)	5	6** (3-27,5)	9** (8-39,5)	15** (12,5-62,5)	24** (18,5-80)
III-UW••• (hiperlipídica )	5	27# (21,5-60,5)	39# (27-72)	60# (44,5-74,5)	65# (54,5-85,5)
III-FBP••• (hiperlipídica )	5	19# (16,5-32,5)	29# (25,5-56)	38# (35,5-59,5)	95# (66,5-105)
IV-SF •••• (controle)	5	31***,+ (25,5-53)	39***,+ (28,5-79,5)	61***,+ (44,5-106)	86***,+ (52-150,5)

Os dados estão expressos como mediana e amplitude interquartilica. Estas foram transformadas em postos e analisadas, 2 a 2, conforme grupo alimentar pelo teste ANOVA para medidas repetidas.

• Comparação entre as medianas de AST dos animais controle que receberam dieta normal preservados com UW ou FBP - \*p=0,02. •• Comparação entre as medianas de AST dos animais do grupo de dieta restrita preservados com UW e FBP - \*\*p=0,01. ••• Comparação entre as medianas de AST dos animais que receberam dieta hiperlipídica preservados com UW e FBP- #p=NS.

••••• Comparação entre as medianas de AST dos animais controle que receberam dieta normal e foram preservados com SF em relação aos animais controle preservados com UW - \*\*\* $p=0,003$  ou FBP -  $^+p=NS$ . Onde AST= aspartatoaminotransferase, em UI/L.

**Tabela 5.** Medianas de ALT aferidos nas soluções de preservação dos fígados dos animais após 2, 4, 6 e 8h de isquemia a frio, nos diferentes grupos estudados.

Grupos	n	ALT 2h	ALT 4h	ALT 6h	ALT 8h
I-UW •	5	75#	104#	129#	141#
(controle)		(52-121)	(73-159,5)	(87-190)	(99,5-254)
I-FBP •	5	65#	89#	127#	150#
(controle)		(57-85,5)	(72,5-89)	(80,5-156)	(109,5-165)
II-UW ••	5	49#	58#	84#	106#
(restrição)		(33,5-54,5)	(39-71)	(49,5-103)	(68-162,5)
II-FBP ••	5	24#	41#	43#	61#
(restrição)		(22,5-28)	(32-61)	(36-72,5)	(49,5-95)
III-UW•••	5	21*	52*	53*	76*
(hiperlipídica )		(17,5-36)	(28-65)	(31-67,5)	(50,5-78)
III-FBP•••	5	64*	106*	114*	126*
(hiperlipídica )		(36-87)	(66-111,5)	(71-134,5)	(86,5-160)
IV-SF ••••	5	28#	30#	38#	48#
(controle)		(22-46,5)	26,0-59,5	(33-72,5)	(42-97)

Os dados estão expressos como mediana e amplitude interquartílica. Estas foram transformadas em postos e analisadas, 2 a 2, conforme grupo alimentar pelo teste ANOVA para medidas repetidas.

• Comparação entre as medianas de AST dos animais controle que receberam dieta normal preservados com UW ou FBP - #p=NS. •• Comparação entre as medianas de AST dos animais do grupo de dieta restrita preservados com UW e FBP - #p=NS. ••• Comparação entre as medianas de AST dos animais que receberam dieta hiperlipídica preservados com UW e FBP- \*p=0,02. •••• Comparação entre as medianas de AST dos animais controle que receberam dieta normal e

foram preservados com SF em relação aos animais controle preservados com UW - # p=NS. Onde  
AST= aspartatoaminotransferase, em UI/L.

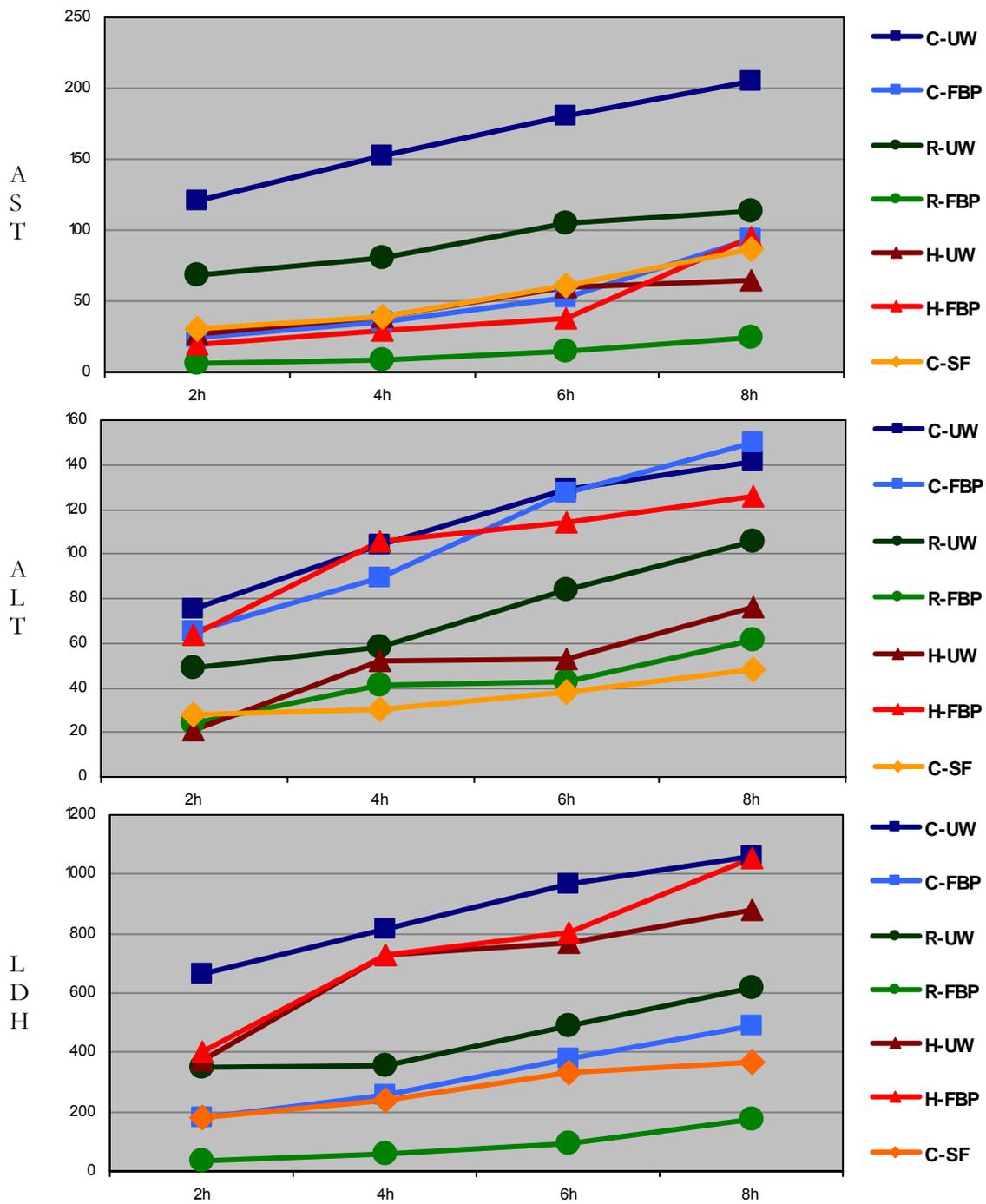
**Tabela 6.** Medianas de LDH aferidas nas soluções de preservação dos fígados dos animais com 2, 4, 6 e 8h, nos diferentes grupos estudados.

Grupos	n	LDH 2h	LDH 4h	LDH 6h	LDH 8h
I-UW •	5	664*	817*	968*	1062*
(controle)		(490,5-805,5)	(639,5-1010,5)	(708-1188)	(809-1566)
I-FBP •	5	178*	258*	380*	488*
(controle)		(55,5-254,5)	(74,5-372,5)	(91,5-458,5)	(114-652,5)
II-UW ••	5	349**	358**	489**	619**
(restrição)		(216-475,5)	(268,5-562,5)	(340-710)	(380-802,5)
II-FBP ••	5	34**	56**	94**	173**
(restrição)		(21,5-137)	48,5-228,0	(65-247,5)	(102-442)
III-UW•••	5	370#	729#	770#	881#
(hiperlipídica )		(286-577)	464,0-812,0	(581,5-890)	(583-1071)
III-FBP•••	5	402#	730#	802#	1055#
(hiperlipídica )		(222,5-762,5)	447,5-1056,5	629,0-1157,5	(848,5-1636)
IV-SF •	5	178***,+	240***,+	334***,+	368***,+
(controle)		(148-206)	(194,5-338,5)	(268,5-435,5)	(343,5-517,5)

Os dados estão expressos como mediana e amplitude interquartílica. Estas foram transformadas em postos e analisadas, 2 a 2, conforme grupo alimentar pelo teste ANOVA para medidas repetidas.

• Comparação entre as medianas de LDH dos animais controle que receberam dieta normal preservados com UW ou FBP - \*p=0,002. •• Comparação entre as medianas de LDH dos animais do grupo de dieta restrita preservados com UW e FBP - \*\*p=0,01. ••• Comparação entre as medianas de LDH dos animais que receberam dieta hiperlipídica preservados com UW e FBP- #p=NS. •••• Comparação entre as medianas de AST dos animais controle que receberam dieta normal e

foram reservados com SF em relação aos animais controle preservados com UW - \*\*\* $p=0,0001$  ou FBP - + $p=NS$ . Onde LDH= lactatodesidrogenase, em UI/L.



**Figura 10:** Medianas de AST, ALT e LDH em UI/L em 2, 4, 6 e 8h nos 7 diferentes grupos estudados. Comparações: a) AST: C-UW vs C-FBP ( $p=0,0001$ ); C-UW vs R-UW ( $p=0,004$ ); C-UW vs R-FBP ( $p=0,0001$ ); C-UW vs H-UW ( $p=0,0001$ ); C-UW vs H-FBP ( $p=0,0001$ ); C-UW vs C-SF ( $p=0,0001$ ), b) ALT: C-UW vs C-FBP ( $p=NS$ ); C-UW vs R-UW ( $p=NS$ ); C-UW vs R-FBP ( $p=0,01$ ); C-UW vs H-UW ( $p=0,02$ ); C-UW vs H-FBP ( $p=NS$ ); C-UW vs C-SF ( $p=0,01$ ), c) LDH: C-UW vs C-FBP ( $p=0,0001$ ); C-UW vs R-UW ( $p=0,005$ ); C-UW vs R-FBP ( $p=0,0001$ ); C-UW vs H-UW ( $p=NS$ ); C-UW vs H-FBP ( $p=NS$ ); C-UW vs C-SF ( $p=0,0001$ ) Onde AST=aspartatoaminotransferase; ALT=alaninoaminotransferase; LDH= lactatodesidrogenase; C-UW= controle com dieta normal preservados com UW; C-FBP= controle com dieta normal preservados com FBP; R-UW=

dieta restrita preservados com UW; R-FBP= dieta restrita preservados com FBP; H-UW= dieta hiperlipídica preservados com UW; H-FBP= dieta hiperlipídica preservados com FBP.

**Tabela 7.** Médias e desvios-padrão de TBARS e catalase aferidas no tecido hepático dos animais, nos diferentes grupos estudados.

Grupos	n	TBARS	Catalase
I-UW (controle)	5	47,4 (±5,4)	130,1 (±32,6)
I-FBP (controle)	5	35,6 (±4,9)	54,1 (±18,2)
II-UW (restrição)	5	47 (±4,8)	70,9 (±13,7)
II-FBP (restrição)	5	33,2 (±5,1)	48 (±10,2)
III-UW (hiperlipídica )	5	63,8 (±3,5)	34,6 (±7)
III-FBP (hiperlipídica )	5	57 (±10,9)	24,2 (±2,1)
IV-SF (controle)	5	212,4 (±41,6)	53,5 (±6,2)

Os dados estão expressos como média e desvio-padrão. Os dados foram transformados em *ranks* para as comparações: a) TBARS (nmol/g tecido): C-UW vs C-FBP (p=0,01); C-UW vs R-UW (p=NS); C-UW vs R-FBP (p=0,002); C-UW vs H-UW (p=0,01); C-UW vs H-FBP (p=NS); C-UW vs C-SF (p=0,001), b) Catalase (UI/mg.-proteína): C-UW vs C-FBP (p=0,001); C-UW vs R-UW (p=NS); C-UW vs R-FBP (p=0,0001); C-UW vs H-UW (p=0,001); C-UW vs H-FBP

( $p=0,0001$ ); C-UW vs C-SF ( $p=0,03$ ). Onde TBARS=substâncias reativas ao tiobarbitúrico; C-UW= controle com dieta normal preservados com UW; C-FBP= controle com dieta normal preservados com FBP; R-UW= dieta restrita preservados com UW; R-FBP= dieta restrita preservados com FBP; H-UW= dieta hiperlipídica preservados com UW; H-FBP= dieta hiperlipídica preservados com FBP.

#### 6.4. Análise anatomopatológica

Os resultados obtidos na análise histopatológica dos fígados dos animais estão representados na tabela 8.

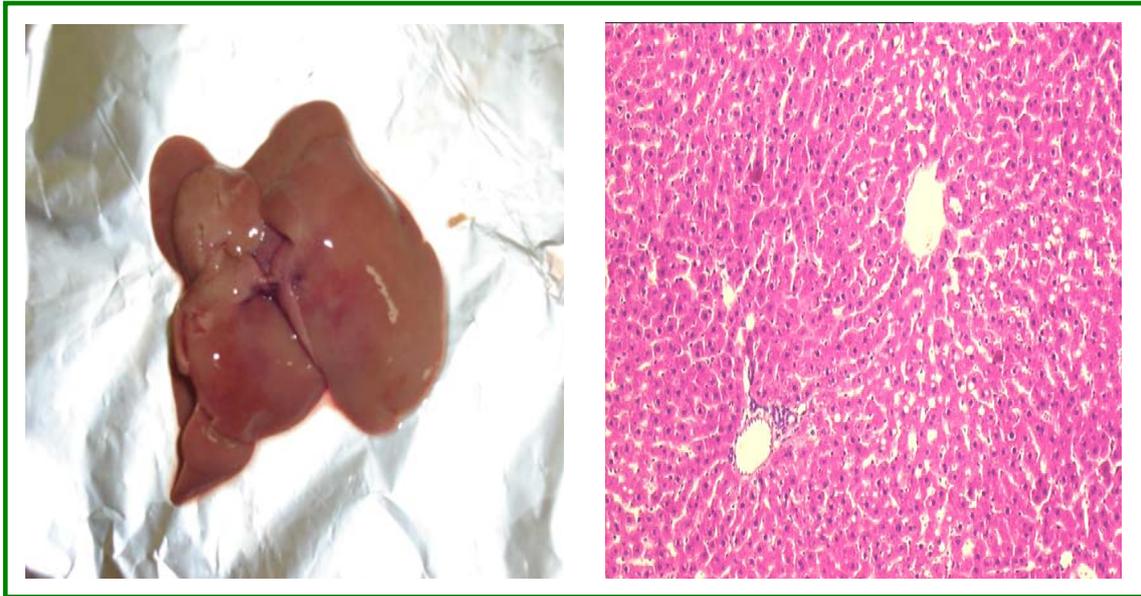
**Tabela 8.** Achados anatomopatológicos após a preservação a frio de fígados de ratos, submetidos à intervenção dietética.

Grupo	N	Esteatose	Infiltrado inflamatório	Balonização
Grupo I (controle)	10	1 (10%)	0 (0%)	4 (40%)
Grupo II (restrição)	10	0 (0%)	0 (0%)	2 (20%)
Grupo III (hiperlipídica)	10	0 (0%)	0 (0%)	8 (80%)

Proporções dos achados anatomopatológicos nos diferentes grupos estudados. Onde esteatose= esteatose <5%; infiltrado inflamatório= infiltrado linfoplasmocitário; balonização= degeneração hidrópica leve.

A Figura 11 demonstra os aspectos macroscópicos e microscópicos de um fígado de um animal do grupo submetido à dieta normal.

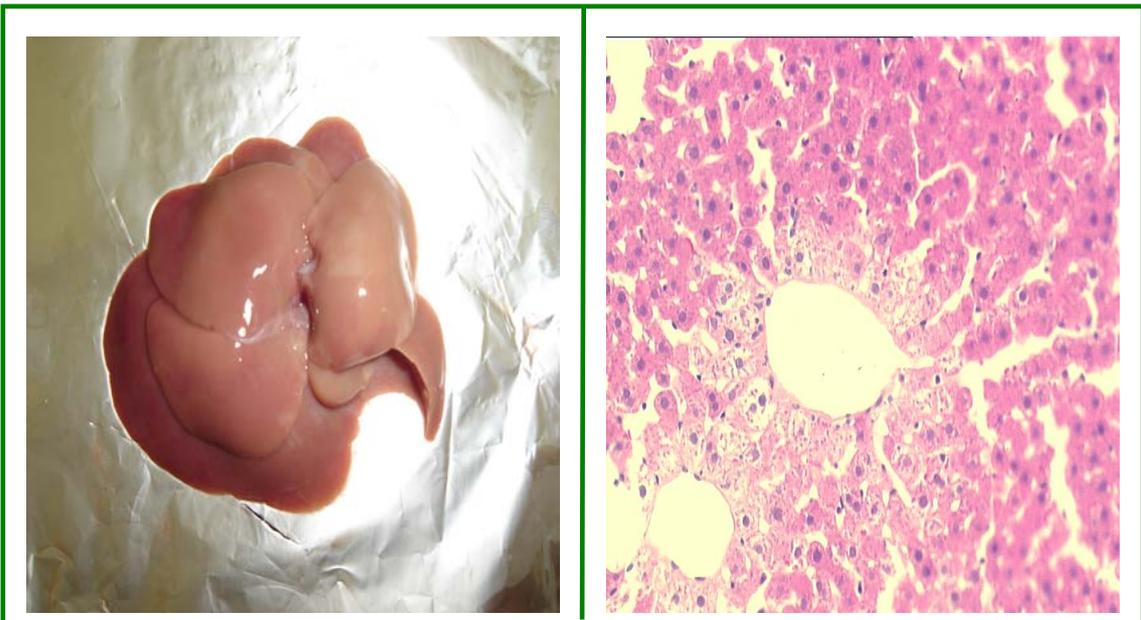
A Figura 12 demonstra os aspectos macroscópicos e microscópicos de um fígado de um animal do grupo submetido à dieta hiperlipídica.



1

2

**Figura 11.** Aspecto do fígado de um animal alimentado com dieta normal, preservado com UW. 1= aspecto macroscópico; 2= aspecto histológico normal, HE, 100x.



1

2

**Figura 12.** Aspecto do fígado de um animal alimentado com dieta hiperlipídica, preservado com UW. 1= aspecto macroscópico; 2= aspecto histológico: degeneração hidrópica centrolobular, HE, 200x.

## 7.DISSCUSSÃO

### 7.1. Em relação ao desenho do estudo

A busca por uma solução de preservação ideal, constitui-se ainda hoje em uma das grandes fronteiras técnicas a ser vencida no transplante hepático. Algumas soluções vêm sendo estudadas na prática médica, como as soluções de Celsior e HTK (histidina-triptofano-cetogluturato), sem que demonstrem uma significativa superioridade em relação à UW (Berlakovich *et al*, 2000; Janssen *et al*, 2004; Cheng *et al*, 2005). No presente estudo, a opção feita pelo desenho experimental deveu-se ao interesse na avaliação do papel da FBP neste cenário. Embora já tenham sido atribuídas a ela inúmeras propriedades citoprotetoras em diferentes situações patológicas, o seu uso restringe-se ao campo experimental.

A escolha desta substância decorreu de sua potencial capacidade em prover o enxerto de substrato energético para contrapor os efeitos do dano de preservação, o que poderia ser bastante útil nos órgãos retirados de doadores nutricionalmente comprometidos, com reservas de ATP depletadas. De acordo com nosso conhecimento, não há estudo publicado com desenho semelhante.

O TxH ortotópico em ratos constitui uma técnica amplamente adotada no contexto da pesquisa. O uso de ratos apresenta algumas vantagens em relação às demais espécies, sobretudo em razão da sua disponibilidade e baixo custo, embora requeira um vasto treinamento técnico-cirúrgico (Lausada *et al*, 2002). No presente estudo, o foco de interesse era o doador e a lesão decorrente da isquemia a frio. Assim, optou-se por um modelo experimental sem a concorrência do transplante. Se houvesse sido feita a reperfusão, por certo se estaria adicionando outras variáveis

independentes do estado inicial do enxerto. As alterações bioquímicas e anatomopatológicas verificadas, neste caso, devem-se unicamente às condições do doador e do tempo de isquemia definido pelo estudo.

Cabe ser discutido o tipo de anestesia. A droga escolhida como anestésico foi o isoflurano, administrado por via inalatória, contrastando com muitos trabalhos que utilizam anestésicos por via intraperitoneal (Moresco *et al*, 2004a; Kim *et al*, 2003; Nunes *et al*, 2002). A principal razão desta escolha, foi o desejo de aproximar o experimento aos procedimentos rotineiros utilizados no TxH, eliminando possíveis vieses. A técnica inalatória requer aparelhagem adequada, além do risco de extravasamento do anestésico através das conexões, tornando o pesquisador suscetível a risco. Por outro lado apresenta significativas vantagens, como a facilidade de administração da droga, a concomitante oferta de oxigênio através do vaporizador e a maior segurança do animal devido a possibilidade do constante ajuste de doses conforme os seus parâmetros respiratórios (Waynforth & Flecknell, 1992).

A preservação a frio foi feita durante 8 horas. Este tempo poderia ser questionado, já que a solução de UW poderia ser capaz de garantir a viabilidade do enxerto por até 24 horas. No entanto, este tempo não é utilizado na prática, uma vez que acima de 12 horas há maior risco de lesão celular, especialmente do epitélio biliar e conseqüentes piores resultados no período pós-transplante (Kahn, 1996; Lemasters *et al*, 2001). A padronização de um período de 12 horas de isquemia frio foi cogitada, já que em estudo anterior, foram suficientes para demonstrar dano de preservação (Moresco *et al*, 2004a). No entanto, este período foi inviabilizado pelo

horário de funcionamento da UEA do HCPA, e foi adotado, então, para os propósitos deste estudo, o maior tempo possível, 8 horas.

A aferição bioquímica da preservação a frio foi feita pela dosagem de AST, ALT e LDH, nas alíquotas retiradas das soluções de preservação nos intervalos padronizados. Estas enzimas costumam se alterar em situações de dano ao tecido hepático. Na prática clínica são habitualmente aferidas no período pós-operatório. Em ambiente de pesquisa, podem ser avaliadas no líquido de preservação e correlacionam-se bem com a lesão de isquemia a frio. A AST é considerada o marcador mais sensível de disfunção do enxerto (Everson & Kam, 2001). A LDH é uma enzima da rota glicolítica, e embora pouco específica, é liberada quando há dano celular, como hipóxia e necrose, como na situação de interesse.

O EO vem sendo apontado como um dos principais fatores responsáveis por dano ao enxerto. Por certo, as lesões mais exuberantes relacionadas ao dano de I/R ocorrem com a restauração do fluxo sanguíneo. A quantificação do RL e de substâncias antioxidantes torna-se um importante parâmetro para inferir a viabilidade do órgão no pós-transplante e costuma estar restrita ao ambiente de pesquisa. Como o estímulo à geração de RL é mais intenso após a reperfusão, estudos que se atêm à isquemia poderiam talvez prescindir desta avaliação. No entanto, pareceu-nos interessante avaliar alguns parâmetros. A mitocôndria representa o foco inicial da lesão de I/R, e ela é a responsável pela geração de ROS. Estas substâncias reagem com os lipídios das membranas celulares adjacentes provocando a lipoperoxidação. Esta pode ser avaliada indiretamente pela formação de malondialdeído através da determinação de TBARS. Quando há geração de ROS,

costuma haver a ativação de substâncias antioxidantes endógenas, como a catalase. Estes foram os dois fatores escolhidos para serem determinados no presente estudo. Cabe salientar que muitas das publicações acerca do tema restringem a avaliação do EO à determinação de apenas uma variável, em geral TBARS (Iasi *et al*, 2003; Moresco *et al*, 2004a; Moresco *et al*, 2004b).

O destaque dado ao estado nutricional do doador reflete uma realidade já discutida, mas também o interesse do grupo por este tema (Álvares-da-Silva *et al*, 1998, Álvares-da-Silva *et al* 2004, Gottschal *et al*, 2004). Por certo, a manipulação e o controle da ingestão calórica, bem como da qualidade dos nutrientes, tornam-se facilitados no campo de experimentação. Isto permite a simulação de situações clínicas. Estimamos que o estado nutricional do doador possa modificar a qualidade do enxerto. Outros pesquisadores já traçaram considerações a respeito deste tema (Sumimoto *et al*, 1994; Singer *et al*, 2001), mas através do transplante em animais e da cultura de células.

A maioria dos modelos experimentais para determinação de obesidade e insulino-resistência utilizam as chamadas “dietas de cafeteria” - ou seja, dietas em que a ração é acrescida de suplementos calóricos (Tan *et al*, 2005; Champion & Martinez, 2004). Estas dietas têm menor credibilidade científica e geralmente demandam longo período de observação, ou se valem do uso de roedores com defeitos genéticos que favorecem o surgimento de obesidade. A dieta deficiente em colina e metionina (DMC) é largamente empregada na gênese de esteato-hepatite não-alcoólica (Souza de Oliveira *et al*, 2006, Nagasawa *et al*, 2006), mas provocar esta doença não era o foco de interesse do presente estudo. A opção pela dieta Lieber-De

Carli foi feita porque teoricamente ela contém todos os nutrientes essenciais de acordo com as recomendações do *National Research Council e NIH*, órgãos governamentais dos Estados Unidos, e poderia reproduzir o que ocorre em humanos com aumento do peso. Mais ainda, a proposta era que os animais apresentassem esteatose hepática ao final de quatro semanas de ingestão *ad libitum*, sem a necessidade de gavagem, o que acrescentaria um estresse desnecessário aos mesmos.

O fato de a Dieta Lieber-De Carli ser líquida, no entanto, motivou a confecção de comedores especiais, desenvolvidos especialmente para isto. Os animais alimentaram-se adequadamente com os referidos comedores.

Projetos utilizando intervenção dietética, em animais alojados em grupo, na mesma caixa-moradia, vêm sendo rotineiramente criticados. Existe uma hierarquia instintiva estabelecida entre os animais, de forma que o rato considerado dominante acaba ingerindo maior quantidade de alimentos que os demais. Por isso, foi tomado o cuidado de ser mantido um animal por gaiola, como em outros estudos (Souza de Oliveira *et al*, 2006). Como o isolamento pode interferir no conforto destes animais, foram utilizadas caixas-moradia de policarbonato transparentes, colocadas lado a lado, de forma que eles tivessem a impressão de convivência em grupo. As gaiolas eram dotadas de toca de aço inox, desenvolvida para os momentos onde o animal desejasse proteção da luz e isolamento, como é comum em roedores.

É importante que se discuta os parâmetros utilizados para análise nutricional e metabólica. O peso corpóreo do animal e do seu fígado, e a proporção peso do fígado/peso do animal, bem como suas variações após intervenção

dietética, constituem-se em ferramentas simples, porém eficazes, para estimativa do estado nutricional. Especialmente quando estas variações ultrapassam 10% do basal, em um período de observação curto como o de quatro semanas. A dosagem sérica de albumina é um parâmetro classicamente aceito para estimativa do estado nutricional, tanto em ambiente de pesquisa, quanto na prática clínica. O interesse especial na glicemia e insulina de jejum está relacionado à importância da resistência periférica à insulina, seus desdobramentos fisiopatogênicos no fígado e suas possíveis conseqüências sobre a lesão de preservação. Obesidade e diabetes melito são condições comuns na população geral e freqüentemente correlacionadas à doença hepática gordurosa não alcoólica. Acredita-se que uma das chaves para o desenvolvimento de esteatose hepática e sua progressão para formas mais graves de doença, como a esteato-hepatite não alcoólica, seja a insulino-resistência. (Lieber *et al*, 2005). O efeito da resistência periférica à insulina sobre a lesão de I/R ainda está para ser definido. Outros parâmetros da síndrome metabólica poderiam ter sido avaliados, assim como colesterol e triglicérides, mas a limitação orçamentária, e especialmente, o pequeno volume de sangue que usualmente se obtém na coleta do lago venoso retro-ocular, obrigaram a que fossem feitas escolhas.

A avaliação anatomopatológica é parte essencial de qualquer experimento em Hepatologia. No estudo em questão, o principal foco desta avaliação era surpreender as alterações decorrentes da manipulação nutricional, especialmente a presença ou não de esteatose. As lesões decorrentes do dano de preservação, por certo, teriam importância secundária, pois é sabido que a biópsia

hepática realizada imediatamente após a preservação costuma demonstrar alterações pouco relevantes (Gaffey *et al*, 1997).

## 7.2. Em relação aos resultados da avaliação metabólica e estado nutricional

A avaliação metabólica e nutricional demonstrou, conforme eram esperadas, diferenças entre os animais submetidos às diferentes dietas. No grupo que recebeu dieta hiperlipídica, o peso dos animais foi superior àqueles dos demais grupos após o período de intervenção nutricional. No entanto, os pesos dos fígados e a relação entre o peso dos fígados/peso dos animais somente foi maior naqueles submetidos à dieta hiperlipídica, quando em comparação com os que receberam dieta restrita.

Igualmente, os ratos alimentados com a dieta Lieber-De Carli apresentaram níveis mais altos de glicemia que os ratos dos demais grupos. É interessante notar que este grupo apresentava índices de glicemia mais baixos que os outros animais antes da intervenção nutricional, embora não tenha havido diferença significativa neste aspecto. Quando também avaliado o delta-glicemia, este foi significativamente maior nos ratos que receberam dieta à base de lipídios. Este achado parece contundente, e salienta o estímulo à criação, neste modelo, de um fator reconhecidamente ligado à esteatose, a hiperglicemia.

A determinação da insulinemia, ao lado dos níveis sanguíneos de glicose, seria importante para evidenciar a presença de resistência insulínica. Houve, no entanto, dificuldades com a dosagem de insulina na maioria dos animais. Acredita-se que isto tenha ocorrido em função de que o teste por radioimunoensaio empregado foi feito com *kit* para humanos. A determinação da insulina com *kits* para ratos acrescentaria custos que não seriam suportados pelo orçamento do estudo. De qualquer forma, há sangue estocado para análises posteriores,

especialmente de polipeptídeo C, a forma ideal para a confirmação da insulino-resistência. Infelizmente, embora autorizada a importação do *kit* para sua realização, este não foi desembaraçado pela Receita Federal a tempo dos resultados serem apresentados neste momento.

Os animais submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram macroscopicamente maior concentração de gordura visceral que os outros animais. A Figura 10 demonstra claramente estes achados. Deve-se salientar que a presença de gordura visceral, é um dos principais eventos relacionados à síndrome metabólica.

Desta forma, acredita-se que o método de indução de uma condição metabólica que favorecesse o surgimento de esteatose hepática foi bem sucedido neste modelo, ao menos pela presença de níveis elevados de glicemia e gordura visceral. Em analogia com humanos doadores de órgãos e que apresentam esteatose hepática, excluídos aqueles em que a causa é alcoólica, provavelmente os demais sejam portadores de síndrome metabólica.

Outro achado interessante neste cenário é o fato de que os animais submetidos à dieta restrita apresentaram menor peso corpóreo e menor peso do fígado. Neste grupo, igualmente, a relação peso do fígado/peso corporal foi inferior. De fato, esta a razão foi menor do que aquela descrita como normal, de 3 a 4% (Panis *et al*, 1997).

Um achado intrigante foi a redução da albumina, aferida pelo delta-albumina, no grupo de animais submetidos à dieta normal. Embora tenha sido feito um estudo inicial para determinação dos requerimentos dietéticos habituais diários

dos animais, e mesmo que os achados tenham sido similares a de outro estudo realizado neste mesmo centro (Horn *et al*, 2006) e estarem dentro dos limites recomendados pelo fabricante da dieta utilizada ([www.nuvital.com.br](http://www.nuvital.com.br)), talvez esta oferta tenha sido insuficiente. No entanto, o que pode ser visto pela análise dos dados apresentados no Anexo 3, a albumina sérica pré-intervenção foi obtida de acordo com uma ferramenta estatística. Como não havia sido determinada a albumina prévia neste grupo, esta foi estimada pela média das albuminemias dos animais dos demais grupos antes do regime alimentar.

### 7.3. Em relação aos achados anatomopatológicos

O modelo de esteatose, desenvolvido por Lieber e colaboradores, 2004, utilizava ratos Sprague-Dawley de 120 dias. No presente estudo os ratos eram da linhagem Wistar com idade de 150 dias e nenhum deles desenvolveu esteatose após intervenção nutricional. De fato, um único caso de esteatose leve, menor que 5%, ocorreu em um animal do grupo de dieta normal. Isto poderia levar à consideração de que não se tenha obtido êxito com o modelo proposto. No entanto, algumas hipóteses foram levantadas para explicar este fato. Talvez a linhagem e a idade dos animais, bem como o tempo da intervenção dietética, tenham interferido. Os autores, no seu artigo original, utilizaram a dieta por 3 semanas. Teria uma semana a mais de uso da dieta contribuído para uma piora do animal? Se do ponto de vista clínico, na última semana estes animais tornaram-se visivelmente doentes, é difícil crer que teriam perdido alguma esteatose hepática que se tivesse desenvolvido. Outro dado a ser considerado é o formato e o tamanho dos comedores. Estes propiciavam algum discreto extravasamento, e obrigava a reposição da dieta. Como isto era impraticável à noite, e como os roedores têm hábito noturno, talvez possa ter prejudicado o rendimento da intervenção dietética. Um fato interessante é que a maioria dos animais acrescia serragem à dieta líquida, talvez movida pela necessidade instintiva de roedor, na tentativa de deixar a dieta sólida, e nesta situação ingeriam grande quantidade de celulose associada à dieta. No entanto, os animais que receberam a dieta hiperlipídica obtiveram ganho de peso de 10,8%, tinham subjetivamente mais gordura visceral, e apresentaram glicemia e delta-

glicemia mais elevadas em relação ao grupo controle, o que demonstra alguma efetividade da dieta.

É notável que tenha sido observada, nos fígados destes animais, uma proporção significativamente maior de degeneração hidrópica centrolobular (degeneração balonizante) em relação aos ratos dos grupos controle e de dieta restrita. A degeneração balonizante é descrita como uma alteração decorrente do aumento anormal no diâmetro das células, que se tornam maior que 1,5 a 2 vezes o habitual. Estudos recentes, baseados em análise de regressão logística múltipla, destacam a degeneração balonizante hepatocitária como um fator independente associado à esteato-hepatite não alcoólica (Gramlich *et al*, 2004; Kleiner *et al*, 2005). Outros estudos semelhantes vão além, sugerindo que a degeneração hidrópica é uma variável independente associada à fibrose sinusoidal e perivenular, e, portanto, relacionada à maior progressão e gravidade da doença (Gramlich *et al*, 2004).

A degeneração balonizante hepatocitária nas hepatites virais é definida como alteração hidrópica decorrente da dilatação irregular do retículo endoplasmático liso (REL). Entretanto, na esteato-hepatite não-alcoólica não há uma definição clara do que determina esta alteração. Estudos utilizando microscopia eletrônica de transmissão sugerem que o alargamento hepatocitário decorra do acúmulo de depósitos microscópicos de lipídios encapsulados no interior do REL, com frequência associados a um material eletrodense semelhante à lipofucsina, que determina a aparência de rarefação citoplasmática característica da degeneração balonizante. Caldwell e colaboradores, 2006, salientam que a presença de lipofucsina eletrodensa é um marcador de lipoperoxidação. Desta forma, o achado de

degeneração balonizante nos ratos submetidos à dieta hiperlipídica deve ser valorizado.

#### **7.4. Em relação aos resultados da avaliação bioquímica do dano isquêmico**

Os resultados deste estudo devem ser analisados em dois cenários distintos: primeiro, a comparação entre os animais controles e aqueles submetidos à dieta restrita, e, segundo, os animais controles comparados aos que receberam dieta hiperlipídica. Esta forma de análise facilita a compreensão dos fenômenos observados. Esta comparação, por sua vez, será feita considerando-se as diferentes soluções de preservação.

A avaliação do dano isquêmico, através da determinação de AST, ALT e LDH no líquido de preservação, é um parâmetro utilizado em outros estudos. Dentre eles, a AST é considerada o principal elemento, pois, em uma fase de dano agudo, os seus níveis costumam alterar-se mais precocemente que os de ALT (Bao *et al*, 1994; Rosen *et al*, 1998). No presente estudo, os níveis de AST e LDH foram menores nos fígados de ratos submetidos à dieta normal ou restrita e preservados com FBP, quando comparados com os correspondentes preservados com UW. Moresco e colaboradores, 2004a e 2004b, estudando fígados de ratos alimentados com dieta padrão e submetidos à preservação por 12 ou 24 horas, encontraram resultados diferentes. Os autores demonstraram que FBP e UW foram equivalentes em relação aos níveis de AST e LDH. O presente estudo, no entanto, sugere que a FBP protege o fígado contra o dano isquêmico, quando em comparação com a UW, quando este é avaliado por critérios bioquímicos. Estes achados, ao menos em

relação aos ratos que receberam dieta normal, são similares ao de outro estudo realizado pelo nosso grupo (Fraga *et al*, 2005).

Um dado surpreendente foi obtido pela análise de outros cinco animais que receberam dieta normal e que tiveram seus fígados preservados com SF. Este subgrupo apresentou parâmetros bioquímicos de lesão isquêmica mais favoráveis, do que aquele cujos fígados foram preservados com UW, equiparando-se aos bons resultados obtidos com FBP. O fator determinante para que fosse feito o estudo da preservação com SF decorreu dos achados superiores encontrados com o uso de FBP no estudo supracitado de Fraga e colaboradores, 2005. A FBP é solubilizada em cloreto de sódio 0,9% e isto levou ao questionamento dos bons resultados do referido estudo: seriam eles atribuíveis à FBP ou à solução salina? Até este momento da avaliação dos resultados do estudo em tela, a dúvida persiste.

Quando comparados os níveis de AST e LDH obtidos entre os grupos preservados com FBP e submetidos à dieta normal e restrita, não houve diferença significativa, sugerindo que esta solução pode ter propriedades protetoras a um órgão nutricionalmente comprometido, em tese com substratos energéticos depletados. Todavia, a mesma comparação feita entre os ratos que foram preservados com UW demonstrou piores resultados nos animais que receberam dieta normal. Este achado foi surpreendente, e não há uma explicação que pareça lógica e o justifique.

A comparação entre os níveis de AST nos fígados de ratos submetidos à dieta normal ou hiperlipídica e preservados com FBP, quando comparados com os correspondentes preservados com UW, demonstrou terem ocorrido piores

resultados nos animais submetidos à dieta normal e preservados com UW. Quando considerada a LDH, os melhores resultados foram obtidos com a preservação de fígados de ratos com dieta normal, preservados com FBP. Nos ratos submetidos à dieta hiperlipídica, não houve diferença entre as duas soluções.

Quando comparados os níveis de AST e LDH obtidos entre os grupos preservados com FBP e submetidos à dieta normal ou hiperlipídica, não houve diferença significativa em relação à AST, porém, em relação à LDH, o grupo que recebeu dieta hiperlipídica apresentou piores resultados. Isto põe em dúvida a propriedade protetora desta solução em um órgão potencialmente exposto à síndrome metabólica. Talvez esta substância não consiga reverter o estímulo patogênico determinado pela dieta hiperlipídica. A mesma comparação feita entre os ratos que foram preservados com UW novamente demonstrou piores resultados nos animais que receberam dieta normal em relação à AST. O motivo pelo qual isto ocorreu não encontra ainda uma explicação. Não houve diferença em relação à LDH na solução de preservação de fígados de ratos preservados com UW. Talvez, a UW tenha conseguido neste grupo, os submetidos à dieta hiperlipídica exercer algum papel protetor.

Isto fez com que fosse realizada uma análise comparativa de todos os sete subgrupos em relação aos parâmetros bioquímicos estudados, de forma que pudesse fornecer uma idéia mais clara e mais ampla dos resultados obtidos. A Figura 11 demonstra estes resultados e deixa evidente que o grupo de pior desempenho foi aquele dos ratos alimentados com dieta normal e preservados com a solução padrão para TxH, a UW. Por outro lado, o grupo que apresentou os

resultados mais favoráveis foi o dos animais em restrição alimentar que tiveram seus fígados preservados com FBP. Este fato sugere que a restrição alimentar, ou a desnutrição aguda, atestada no estudo pela diminuição do peso corporal, pode não estar associada a piores resultados no TxH. Este achado não é de todo inusitado. De fato, outros estudos experimentais, desenvolvidos pelo grupo de Belzer, vêm demonstrando que a restrição alimentar pode aumentar a tolerância à isquemia a frio por períodos mais prolongados, bem como a sobrevida no TxH em animais, mesmo que estes enxertos possam ter menores concentrações de glicogênio e ATP celular (Sumimoto *et al*, 1993; Lindell *et al*,1996). A razão disto permanece ignorada. Mais ainda, os autores sugerem que o uso de suplementos energéticos no período pré-transplante imediato poderia contrabalançar a redução do glicogênio e ATP, melhorando ainda mais esta tolerância à isquemia (Lindell *et al*,1996). No presente estudo, pode-se inferir que a FBP tenha desempenhado exatamente este papel nos ratos sob restrição alimentar.

#### **7.5. Em relação aos resultados da lipoperoxidação e geração de antioxidantes endógenos**

A repercussão da lesão mitocondrial hepática representa o principal mecanismo relacionado ao dano de preservação. De tal forma, avaliá-la é essencial. Os níveis de TBARS no homogeneizado do tecido hepático após a preservação foram significativamente inferiores nos subgrupos de animais controle e com dieta restrita que tiveram seus fígados preservados com FBP, quando comparados aos correspondentes preservados com UW. Isto não se evidenciou no grupo da dieta

hiperlipídica. Estes achados entram em total conformidade com aqueles obtidos na avaliação bioquímica do dano de preservação, e reforçam o papel protetor da FBP sobre os fígados dos animais controle e sob restrição. Novamente esta substância parece não ter exercido proteção aos fígados dos ratos com dieta hiperlipídica, em termos de lipoperoxidação.

É interessante notar que, com a análise das TBARS, ficou claro que os bons resultados obtidos com a preservação com SF não se sustentam quando avaliada a lipoperoxidação. Com isto, pode-se afirmar que a solução salina, como era de se esperar, não protege contra o dano mitocondrial.

Quando comparadas as TBARS obtidas do tecido hepático, entre os grupos preservados com FBP e submetidos à dieta normal e restrita, não houve diferença significativa, reforçando a possibilidade de que esta realmente tenha propriedades protetoras sobre um órgão nutricionalmente comprometido. As TBARS dos fígados dos ratos destes estados alimentares e que foram preservados com UW, também se comportaram de forma semelhante, demonstrando neste caso que a UW, em termos de lipoperoxidação, como era esperado, também parece exercer certa proteção ao fígado dos animais em restrição. Aqui não houve a figura de um pior resultado nos fígados de ratos com dieta normal e preservados com UW, como havia paradoxalmente ocorrido na avaliação bioquímica.

A comparação entre as TBARS nos fígados de ratos submetidos à dieta normal ou hiperlipídica e preservados com FBP, quando comparados com os correspondentes preservados com UW, demonstrou piores resultados nos animais submetidos à dieta hiperlipídica e preservados com UW. Os melhores foram obtidos

com a preservação de fígados de ratos com dieta normal, preservados com FBP. Não houve, considerando apenas os animais submetidos à dieta hiperlipídica, diferença nos resultados alcançados com FBP ou UW. Ambas as soluções apresentaram piores resultados quanto à lipoperoxidação neste grupo alimentar do que no grupo controle.

Ademais, os resultados sugerem que a FBP não foi capaz de atenuar a lipoperoxidação ocorrida nos animais que receberam a dieta hiperlipídica, já que houve uma diferença desfavorável para os animais sob esta dieta em relação aos da dieta normal. Novamente há uma convergência entre os achados bioquímicos da preservação com os da avaliação da lipoperoxidação.

Quando feita a análise comparativa dos sete subgrupos estudados em relação à TBARS, o de pior desempenho foi aquele dos animais com dieta normal cujos fígados foram preservados com SF. Isto não surpreende, pois é sabido que a solução de UW é dotada de componentes antioxidantes, como a glutatona, e a FBP, como já mencionado, possui propriedades antioxidantes.

Quando consideradas as análises de TBARS das soluções de UW e FBP, os piores resultados ocorreram no grupo de animais da dieta hiperlipídica, independente da solução empregada. Este dado reforça a hipótese de que estes fígados foram consideravelmente prejudicados pela intervenção dietética e que a FBP não foi capaz de contrabalançar esta injúria. O grupo que parece ter tido menor lesão isquêmica através das dosagens de TBARS foi aquele correspondente aos animais sob restrição alimentar e cujos fígados foram preservados com FBP. Mais uma vez a análise de lipoperoxidação confirmou os achados da bioquímica da

preservação, reforçando uma maior tolerância destes animais a isquemia a frio determinada pela restrição alimentar e pelas propriedades protetoras da FBP.

A atividade da enzima catalase foi significativamente maior nos animais pertencentes aos subgrupos que tiveram seus fígados preservados com UW, tanto nos que receberam dieta normal ou restrita. Este achado vai de encontro àqueles obtidos com a avaliação bioquímica da preservação e da lipoperoxidação, já que se considera o aumento desta enzima desejável, sendo esta uma substância antioxidante.

É interessante notar que, quando analisamos a atividade da catalase, os maus resultados obtidos com a preservação com SF dos fígados dos animais que receberam dieta normal, em termos de lipoperoxidação, não ficaram assim tão claros, quando comparados aos obtidos com FBP. Estes tiveram resultados semelhantes aos animais controle com dieta normal e sob restrição alimentar preservados com FBP. Os piores resultados com a preservação com SF foram observados quando este grupo foi comparado àquele cujos fígados foram preservados com UW, que por este parâmetro acabou impondo-se como melhor solução.

Quando comparada as dosagens de catalase obtidas do tecido hepático, entre os grupos preservados com FBP e submetidos à dieta normal ou restrita, os resultados foram idênticos aos observados com TBARS, não havendo diferença significativa, reforçando mais uma vez a hipótese de que esta realmente tenha propriedades protetoras sobre um órgão nutricionalmente comprometido. Por outro lado, a mesma comparação feita entre os ratos que foram preservados com UW

demonstrou diferença estatística. Neste caso a preservação hepática foi mais favorável ao grupo de animais controle com dieta normal, sugerindo que a solução de UW talvez não seja capaz de exercer proteção hepática neste cenário.

Por fim, o pior desempenho, em relação à atividade da catalase, ocorreu no grupo de animais com dieta hiperlipídica, independente da solução empregada.

#### **7.6. Em relação aos estados nutricionais e a lesão de preservação nos fígados dos ratos preservados com a solução padrão para transplante**

Este tópico analisa a influência dos diferentes estados nutricionais dos animais estudados sobre a lesão de preservação, levando-se em consideração a solução de UW. Porque analisá-la em separado remete à própria razão deste estudo: verificar se o estado nutricional do doador interfere na lesão de preservação. Esta análise, em um desenho contemplando apenas a isquemia a frio, como neste projeto, é uma condição inovadora, e esta influência é, de fato, pouco conhecida. Da mesma forma, o papel desempenhado pela UW, na proteção de órgãos alterados pelo estado nutricional do doador, também não está bem sedimentada.

Quando analisado o dano de isquemia a frio através da dosagem de AST, nas diferentes alíquotas retiradas da solução de UW, foi verificado que entre os animais com dieta normal e restrita, não houve diferença significativa na qualidade da preservação. Pode-se inferir que a solução de UW teria a capacidade de contrabalançar a carência energética nos fígados retirados de animais sob dieta restrita. O grupo de Singer e colaboradores (Singer *et al*, 2001; Singer *et al*, 2005)

publicou estudos acerca do tema, revisando os efeitos nutricionais da morte encefálica, e sugerem que haja depleção dos estoques energéticos. Para estes autores, talvez haja espaço para a intervenção nutricional nos doadores.

Nos ratos submetidos à dieta hiperlipídica, os resultados foram piores, demonstrando certa limitação na preservação de órgãos alterados por dieta rica em lipídios.

Quando considerados os níveis de LDH na solução de preservação de fígados de ratos com dieta normal e hiperlipídica, não foi identificada diferença estatística. Porém, os níveis desta enzima foram menores nas alíquotas retiradas da solução de UW dos animais sob dieta restrita. Isto sugere que devem existir componentes da solução da UW que minimizam os efeitos da desnutrição aguda.

Com base nos resultados de TBARS aferidos no tecido hepático preservado com UW, os ratos alimentados com dieta normal e sob restrição tiveram menor lesão por lipoperoxidação em relação aos da dieta hiperlipídica. Estes achados entram em conformidade com achados bioquímicos já descritos.

A atividade da catalase foi maior nos animais que receberam dieta normal, e menor nos que receberam dieta hiperlipídica - estes achados foram significativos estatisticamente.

Analisando estes dados em conjunto, pode-se inferir que a restrição alimentar não provoca uma lesão adicional ao fígado que se reflita em maior dano de preservação do que aquele que ocorre com uma dieta normal. No entanto, quando o fígado está submetido ao risco de desenvolvimento de lesão esteatótica, parece haver maior estímulo ao surgimento de lesão isquêmica de preservação. Este

dados vai ao encontro do reconhecido impacto da esteatose sobre a qualidade do enxerto. A novidade, é que a desnutrição não a afeta. É interessante notar que estes resultados foram similares aos encontrados com a solução de FBP.

## 7.7. Mecanismos sugeridos para a ação protetora da FBP no modelo proposto

Os melhores resultados obtidos com a preservação dos fígados dos animais submetidos à dieta normal e restrita com a solução salina de FBP em comparação com UW, podem ser atribuídos a algumas propriedades peculiares desta substância. A FBP é um substrato da rota glicolítica e que, acreditava-se no passado, teria a capacidade de atravessar a membrana celular e fornecer ATP para o funcionamento da célula (Catani *et al*, 1980; Eddy *et al* 1981; Hardin & Roberts, 1994).

No entanto, há fortes indícios de que a FBP, como outros açúcares fosforilados, não consiga atravessar a membrana celular, em decorrência do tamanho da sua molécula e polaridade. Foi apenas muito recentemente que Cuesta e colaboradores, 2006, estudando a lesão hepática induzida por D-galactosamina, comprovaram que a FBP teria uma capacidade exógena de reduzir o consumo de ATP, e que esta se daria através da modulação dos canais de potássio nas membranas das células de Kupffer. Assim, é feita a hipótese de que os resultados obtidos com a preservação com FBP no presente estudo, devam-se à sua capacidade de preservar o consumo de ATP intracelular. Neste sentido, é notável que os animais submetidos à dieta restrita e preservados com FBP tenham tido o melhor desempenho global neste estudo.

## 8. CONCLUSÕES

De acordo com os métodos utilizados neste estudo e os resultados obtidos no mesmo, podem ser enunciadas as seguintes conclusões:

1. O estado nutricional exerce influência sobre o dano de isquemia a frio, quando aferido por parâmetros bioquímicos, pela lipoperoxidação e geração de antioxidantes endógenos, em fígados de ratos com dieta normal, restrita ou hiperlipídica.
2. Os melhores resultados na avaliação do dano de preservação foram obtidos nos animais que foram submetidos à restrição alimentar, enquanto que os piores ocorreram nos animais que receberam dieta hiperlipídica.
3. A FBP foi superior à UW na preservação a frio de fígados de ratos alimentados com dieta normal, através da avaliação de variáveis bioquímicas, lipoperoxidação.
4. A FBP apresentou resultados similares aos da preservação com SF nos animais submetidos à dieta normal, quando avaliada por critérios bioquímicos.
5. A preservação com SF demonstrou melhores resultados do que os obtidos com UW na preservação a frio de fígados de ratos alimentados com dieta normal, através da avaliação de variáveis bioquímicas.
6. A preservação com FBP nos animais que receberam dieta normal foi superior à obtida com SF, quando analisadas variáveis relacionadas à lipoperoxidação.
7. A preservação com UW, embora com resultados inferiores à FBP, nos animais que receberam dieta normal, foi superior à obtida com SF, quando analisadas variáveis relacionadas à lipoperoxidação.

8. A solução de FBP foi superior à UW na preservação a frio de fígados de ratos sob restrição alimentar, através da avaliação de variáveis bioquímicas, lipoperoxidação.

9. As soluções de FBP e UW não diferiram na preservação a frio de fígados de ratos submetidos à dieta hiperlipídica, através da avaliação de variáveis bioquímicas e lipoperoxidação.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALMADA LA, SCANDIZZI AL, GUIBERT EE, FURNO G, RODRÍGUEZ JV. Biliary inorganic phosphate as a tool for assessing cold preservation-reperfusion injury: a study in the isolated perfused rat liver model. *Liver Transpl* 2003; 9: 160-9.

ÁLVARES-DA-SILVA, MR & SILVEIRA, TR. O estudo da força do aperto da mão não-dominante em indivíduos sadios. Determinação dos valores de referência para o uso da dinamometria. *GED*, 1998, 17 (6): 203-6.

ÁLVARES-DA-SILVA MR. A influência do dano de isquemia/reperfusão na função do enxerto e na evolução imediata em pacientes submetidos a transplante hepático - o papel da biópsia de reperfusão [tese]. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

ÁLVARES-DA-SILVA MR, GOTTSCHALL CB, WAECHTER FL, HADLICH E, SAMPAIO JA, FRANCESCONI CF. O Uso de nutrição enteral precoce pós-transplante hepático. *Arq Gastroenterol* 2004; 41: 147-9.

ÁLVARES-DA-SILVA MR & SILVEIRA TR. Comparison between handgrip strength, subjective global assessment and prognostic nutritional index in assessing malnutrition and predicting clinical outcome in cirrhotic outpatients. *Nutrition*, 2005; 21 (2): 113-7.

ARORA AS & GORES GJ. The role of metals in ischemia/reperfusion injury of the liver. *Semin Liver Dis*, 1996, 16 (1): 31-8.

AS AB, LOTZ Z, TYLER M, KAHN D. Impact of early arterialization in the liver allograft. *Transplant Proc* 1999; 31: 406-7

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS. Disponível em <http://www.abto.com.br>. Último acesso em novembro de 2006.

BAO YM, ADAM R, SAMUEL D, CASTAING D, BISMUTH H. Influence of high aminotransferase levels on rejection in liver transplantation. *Transplant Proc*. 1994; 26: 259-60.

BELLÓ-KLEIN A. Dano oxidativo e regulação biológica pelos radicais livres. In: MARRONI NP (ed), *Estresse Oxidativo e antioxidantes*. Editora da ULBRA, Canoas, 2002, pp. 15-9.

BERLAKOVICH GA, WINDHAGER T, PUNZ A, POKORNY H, LANGER F, LOSERT UM, MUEHLBACHER F, STEINIGER R. Storage of the rat liver with Celsior in relation to hepatic energy metabolism [abstract]. *Liver Transpl*. 2000; 6: C-10.

BOSCH X. Spain leads the world in organ donation and transplantation. JAMA 1999; 282: 17-8.

BUEGE JA, AUST SD. Microsomal lipid peroxidation. Meth Enzymol. 1978, 52:302-9.

BURKE A, FITZGERALD GA, LUCEY MR. A prospective analysis of oxidative stress and liver transplantation. Transplantation. 2002; 74(2): 217-21.

BUSQUETS J, SERRANO T, FIGUERAS J, RAMOS E, TORRAS J, RAFECAS A, FABREGAT J, XIOL X, LAMA C, IBANEZ L, JAURRIETA E. Influence of donor postreperfusion changes on graft evolution after liver transplant. Transplant Proc. 2002 Feb; 34(1): 252-3.

BUSUTTIL RW & TANAKA K. The utility of marginal donors in liver transplantation. Liver Transpl 2003; 9: 661-3.

CACCIARELLI TV, ESQUIVEL CO, MOORE DH, COX KL, BERQUIST WE. Factors affecting survival after orthotopic liver transplantation in infants. Transplantation 1997; 64(2): 242-8.

CADMIUM A, SASTRY RP et al. Spectrophotometric determination of serum nitrite and nitrate by copper. Analytical Biochemistry. 2002, 306: 79-82.

CALDWEL HS, SWERDLOW RH, KHAN EM, IEZZONI JC, HESPENHEIDE EE, PARKS JK, PARKER JR WD. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. Journal of Hepatology 1999; 31 430-34

CALDWEL HS, REDICK JA, CHANG CY, DAVIS CA, ARGO CK, AL OSAIMI KAMS. Letters to Editor. American Journal of Gastroenterology 2006. 1677-1678.

CAMPION J & MARTINEZ JA. Ketoconazole, an antifungal agent, protects against adiposity induced by a cafeteria diet. Horm Metab Res 2004 Jul;36(7):485-91.

CAMPOS AC, MATIAS JE, COELHO JC. Nutrição enteral precoce em transplante hepático (editorial). Arq Gastroenterol 2004; 41: 145-6.

CARRASCO L, SANCHEZ-BUENO F, SOLA J, RUIZ JM, RAMIREZ P, ROBLES R, RODRIGUEZ JM, PARRILLA P. Effects of cold ischemia time on the graft after orthotopic liver transplantation. A bile cytological study. Transplantation, 1996, 61(3): 393-6.

CATTANI L, COSTRINI R, CERILLI C. Fructose -1,6- diphosphate dependence on the toxicity and uptake of potassium ions. Agressologie. 1980; 21: 263-4.

CISNEROS C, GUILLÉN F, GOMEZ R, GUTIERREZ J, VORWALD P, MONTERO A, MORENO E. Analysis of warm ischemia time for prediction of primary nonfunction of the hepatic graft. Transplant Proc 1991; 23: 1976.

CHANG GJ, MAHANTY HD, ASCHER NL, ROBERTS JP. Expanding the donor pool: can the Spanish model work in the United States? Am J Transplant 2003; 3: 1259-63.

CHENG Y, LIU YF, CHENG DH, LI BF, ZHAO N. Evaluation of CMU-1 preservation solutions using an isolated perfused rat liver model. World J Gastroenterol. 2005; 11: 2522-5

CHU SJ, CHANG DM, WANG D, CHEN YH, HSU CW, HSU K. Fructose-1,6-diphosphate attenuates acute lung injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Crit Care Med* 2002; 30: 1605-9.

CLAVIEN P-A. Sinusoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperfusion. *Hepatology*, 1998, 28 (2): 281-5.

COHEN AJ, BURCZYNSKI FJ, ROSSER BG, LIPSCHITZ J, MINUK GY. The effects of various organ preservation solutions on hepatocyte membrane potentials, intracellular calcium concentrations, and outcome following liver transplantation. *Am J Surg* 2000; 179: 154-60.

COGGER VC, MULLER M, FRASER R, McLEAN AJ, KHAN J, LE COUTEUR DG. The effects of oxidative stress on the liver sieve. *J Hepatol* 2004; 41: 370-6.

COLQUHOUN SD & BUSUTTIL RW. Graft failure: cause, recognition and treatment. In: Busuttil RW & Klintmalm GB, eds. *Transplantation of the liver*. WB Saunders Company, Philadelphia, 1996, pp. 607-16.

CUESTA E, BOADA J, CALAFELL R, PERALES JC, ROIG T, BERMUDEZ JORDI. Fructose 1,6-bisphosphate prevented endotoxemia, macrophage activation, and liver injury induced by D-galactosamine in rats. *Critical Care* 2006; 34 (3): 807-14

DAL MOLIN SZF. Anestésicos inalatórios e seu efeito sobre o dano de isquemia e reperfusão: comparação entre isoflurano e sevoflurano em modelo experimental em fígado de ratos. (tese). 2005. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

De CARLIS, L, SANSALONE, C, RONDINARA, G, COLELLA, G, SLIM, AO, ROSSETTI, O, ASENI, P, DELLA VOLPE, A, BELLI, LS, ALBERTI, A, FESCE, R, FORTI, D. Is the use of marginal donors justified in liver transplantation? Analysis of results and proposal of modern criteria. *Transpl Int* 1996; 9 (Suppl.1): S414-7.

EDDY LJ, CHAMBERS D, HONIG S, DOWNEY JM. Lack of a direct metabolic effect of fructose-1,6-diphosphate in ischemic myocardium. *Am J Physiol.* 1981; 241: H576-H582.

EVERSON GT & KAM I. Immediate postoperative care. In: Maddrey WC, Schiff ER, Sorrell M (eds). *Transplantation of the liver.* 3<sup>rd</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001, pp. 131-62.

EVERSON GT & TROTTER J. Role of adult living donor liver transplantation in patients with hepatitis C. *Liver Transpl* 2003; 9(Suppl 2):S64-8.

FIGUEIREDO FA, DICKSON ER, PASHA TM. Utility of standard nutritional parameters in detecting body cell mass depletion in patients with end stage liver disease. *Liver Transpl* 2000; 6: 575-81.

FIORINI RN, DONOVAN JL, RODWELL D, EVANS Z, CHENG G, MAY HD, MILLIKEN CE, MARKOWITZ JS, CAMPBELL C, HAINES JK, SCHMIDT MG, CHAVIN KD. Short-term administration of (-)-epigallocatechin gallate reduces hepatic steatosis and protects against warm hepatic ischemia/reperfusion injury in steatotic mice. *Liver Transpl* 2005; 11: 298-308.

FLAMM, S, ALONSO, E, BLEI, AT, WHITINGTON, P, FRYER, J, STUART, F, SUPERINA, R, ABECASSIS, M. The role of liver biopsy in the evaluation of living donors. [abstract] *Liver Transpl* 2000; 6: C-13.

FRAGA RS. Comparação entre frutose-1,6-bisfosfato e solução da universidade de wisconsin na preservação de fígados de rato: a proteção contra o dano de isquemia/reperfusão. (tese) 2005 Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

FREEMAN RB. Overview of the MELD/PELD system of liver allocation. Indications for liver transplantation in the MELD era: evidence-based patient selection. *Liver Transpl* 2004; 10 (Suppl 2): S2-S3.

GAFFEY, MJ, BOYD, JC, TRAWEEK, ST, ALI, MA, REZEIG, M, CALDWELL, SH, IEZZONI, JC, McCULLOUGH, C, STEVENSON, WC, KHUROO, S, NEZAMUDDIN, N, ISHITANI, MB, PRUETT, TL. Predictive value of intraoperative biopsies and liver function tests for preservation injury in orthotopic liver transplantation. *Hepatology*, 1997, 25: 184-9.

GAL J, RIEDEL BJ, ROTH E, BOGAR L, TEKERES M, ROYSTON D. Effect of fructose-1,6-diphosphate on myocardial purina and pyrimidin metabolism during coronary artery bypass grafting surgery. *Orv Hetil* 2000; 141: 2021-5.

GASTACA M, VALDIVIESO A, PIJOAN J, ERRAZI G, HERNANDE M, GONZALES J, FERNANDEZ J, MATARRANZ A, MONTEJO M, VENTOSO A, MARTINEZ G, FERNANDEZ M, URBINA O. Donor older than 70 years in liver transplantation. *Transplantation proceedings* 2005; 37: 3851-54.

GENESCA M, SOLA A, AZUARA D, DE OCA J, HOTTER G. Apoptosis inhibition during preservation by fructose-1,6-diphosphate and theophylline in rat intestinal transplantation. *Crit Care Med* 2005; 33: 827-34.

GOTTSCHALL CBA, ÁLVARES-DA-SILVA MR, CAMARGO AC, BURTETT RM, SILVEIRA TR. Avaliação nutricional de pacientes com cirrose pelo vírus da hepatite C: a aplicação da calorimetria indireta. *Arq Gastroenterol* 2004; 41: 220-4.

GRAMLICH T, KLEINER DE, Mc CULLOUGH AJ, MATTEONI CA, BOPARAI N, YOUNOSSI ZM. Pathologic features associated with fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Human Patology* 2004; 35 (2):196-99

GREZZANA TJ, CORSO CO, ZANOTELLI ML, MARRONI CA, BRANDAO AB, SCHLINDWEIN E, LEIPNITZ I, MEINE MH, FLECK AJr, CASSAL A, HOPE L, HOPPEN R, KISS G, GLEISSNER AL, CERSKI T, BELLÓ-KLEIN A, SEVERO V, INNOCENTI C, CANTISANI GP. Oxidative stress, hepatocellular integrity, and hepatic function after initial reperfusion in human hepatic transplantation. *Transplant Proc* 2004; 36: 843-5.

HALLIWELL C & GUTERIDGE JMC (eds). *Free radicals in biology and medicine*. 2<sup>nd</sup> ed Clarendon Press, Oxford, 1989.

HARDIN C.D, ROBERTS T.M. Metabolism of exogenously applied fructose-1,6-bisphosphate in hypoxic vascular smooth muscle. *Am J Physiol*. 1994; 267: H2325-H2332.

HERTL, M, HOWARD, TK, LOWELL, JÁ, SHENOY, S, HARVEY, PR, STRASBERG, SM. Changes in liver core temperature during preservation and rewarming in human and porcine liver allografts. *Liver Transpl Surg* 1996; 2: 111-7.

HIROKAWA F, NAKAI T, YAMAUE H. Storage solution containing fructose-1,6-bisphosphate inhibits the excess activation of Kupffer cells in cold liver preservation. *Transplantation* 2002; 74: 779-83.

HORN MM, RAMOS AR, WINKELMANN L, MATTE US, GOLDANI HA, SILVEIRA TR. Seminiferous epithelium of rats with food restriction and carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Int Braz J Urol* 2006; Jan-Feb;32(1):94-9;

IASI M, FAVERO SG, SOLER WV, IASI MSF, CORDOVANY TBN, RITTES JC, SZUTAN LA, ROLIN EG et al. Oxidative stress in liver transplantation with special reference to Santa Casa-SP solution: a preclinical study. *Transplant Proc.* 2003; 35: 1134-5.

IMBER CJ, ST PETER SD, LOPEZ I, GUIVER L, FRIEND PJ. Current practice regarding the use of fatty livers: a trans-Atlantic survey. *Liver Transpl* 2002; 8(6): 545-9.

IMBERTI, R, VAIRETTI, M, GUALEA, MR, FELETTI, F, POMA, G, RICHELMI, P, PRESEGLIO, I, BELLOMO, G. The effects of thyroid hormone modulation on rat liver injury associated with ischemia-reperfusion and cold storage. *Anesth Analg* 1998; 86: 1187-93.

JAESCHNKE, H. Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. *J Hepatol* 1996; 25: 774-80. JAIN SK, PEMBERTON PW, SMITH A, McMAHON RF, BURROWS PC, ABOUTWERAT A, WARNES TW. Oxidative stress in chronic hepatitis C: not just a feature of late stage disease. *J Hepatol* 2002; 36: 805-11.

JAMIESON N.V, LINDELL S, SUNDBERG R, et al. An analysis of the components in UW solution using the isolated perfused rabbit liver. *Transplantation* 1988; 46: 512-6.

JANSSEN H, JANSSEN PH, BROELSCH CE. UW is superior to Celsior and HTK in the protection of human liver endothelial cells against preservation injury. *Liver Transpl.* 2004; 10: 1514-23.

JIMÉNEZ-ROMERO, C, MORENO-GONZÁLEZ, E, COLINA RUÍZ, F, CARAZO, FP, LOINAZ SEGUROLA, C, RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, F, GONZÁLEZ PINTO, I, GARCÍA GARCÍA, I, RODRÍGUEZ ROMANO, D, MORENO SANZ, C. Use of octogenarian livers safely expands the donor pool. *Transplantation* 1999; 68: 572-5.

KAHN, D. Liver transplantation: does prolonged storage promote non-anastomatic biliary structures? *HPB Surgery* 1996; 9: 113-5.

KAMATH PS, WIESNER RH, MALINCHOC M, KREMERS W, THERNEAU TM, KOSBERG CL, D'AMICO G, DICKSON ER, KIM WR. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology.* 2001; 2:464-70.

KIM JS, QIAN T, LEMASTERS JJ. Mitochondrial permeability transition in the switch from necrotic to apoptotic cell death in ischemic rat hepatocytes. *Gastroenterology* 2003; 124: 494-503.

KIRTLEY ME & McKAY M. Fructose-1,6-bisphosphate, a regulator of metabolism. *Moll Cell Biochem* 1977; 18: 141-9.

LANGE R, ERHARD J, RAUEN U, HELLINGER A, DE GROOT H, EIGLER FW. Injury to hepatocytes and non-parenchymal cells during the preservation of human livers with UW or HTK solution: a determination of hepatocellular enzymes in the effluent perfusate for preoperative evaluation of the transplant quality. *Transpl Int*, 1996; 9 Suppl 1: S472-6.

LAUSADA NR, GONDOLESI GE, ORTIZ E, DREIZZEN E, RAIMONDI JC. Orthotopic liver transplant in rats. Surgical technique, complications and treatment. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 2002; 32: 63-70.

LAZZARINO G, NUUTINEN ME, TAVAZZI B, CERRONI L, DI PIERRO D, GIARDINA B. Preserving effect of fructose-1,6-bisphosphate on high-energy phosphate compounds during anoxia and reperfusion in isolated langendorff-perfused rat hearts. *J Moll Cell Cardiol* 1991; 23: 13-23.

LEMASTERS JJ, BUNZENDAHL H, THURMAN RG. Preservation of the liver. In: Maddrey WC, Schiff ER, Sorrell M (eds). *Transplantation of the liver*. 3<sup>rd</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001, pp. 251-74.

LEFEVRE G, BELJEAN-LEYMARIE M, BEYERLE F, BONNEFONT-ROUSSELOT D, CRISTOL JP, THEROND P, TORREILLES J. Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1998; 56 (3): 305-19.

LEVY, GA. I Favor Neoral/Cyclosporine-based immunosuppression. The American Association for the Study of Liver Diseases & The International Liver Transplantation Society. Postgraduate course: Hepatic allograft rejection and evolving immunosuppressive strategies, 1998, pp 43-50.

LLESUY SF. Introdução y espécies activas de oxigeno. In: MARRONI NP (ed), Estresse Oxidativo e antioxidantes. Editora da ULBRA, Canoas, 2002, pp. 21-32.

LIEBER CS, LEO MA, MAK KM, XU Y, CAO Q, REN C, PONOMARENKO A, DE CARLI LM. Model of nonalcoholic steatohepatitis. Am J Clin Nutr 2004; 79: 502-9.

LINDEL SL, HANSEN T, RANKIN M, DANIELEWICZ R, BELZER FO, SOUTHARD JH. Donor nutritional status - a determinant of liver preservation injury. Transplantation 1996; 61 (2): 239-47

MAGALHÃES RA, SANCHES MD, PEREIRA WA. Doador. In: PEREIRA WA (Ed). Manual de transplante de órgãos e tecidos, 3a. ed, MEDSI Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004, pp. 202-29.

MALINCHOC M, KAMATH PS, GORDON FD, PEINE CJ, RANK J, ter-BORG PL. A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. Hepatology 2000; 31: 864-71.

MARKIN, RS, WISECARVER, JL, RADIO, SJ, STRATTA, RJ, LANGNAS, AN, HIRST, K, SHAW, BW Jr. Frozen section evaluation of donor livers before transplantation. Transplantation, 1993, 56(6): 1403-9.

MARKOW AK, RAYBURN TS, TALTON DS, NETHERLAND DE, MOORE C, HEATER B, COHEY HH. Fructose-1,6-diphosphate alone and in combination with cyclosporine potentiates rat cardiac allograft survival and inhibits lymphocyte proliferation and interleukin-2 expression. *Transplantation*. 2002; 74(11): 1651-4.

MASSBERG, S & MESSMER, K. The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc*, 1998, 30: 4217-23.

McCULLOUGH, AJ- Malnutrition in liver disease. *Liver Transplant* 2000; 6(Suppl 1): S85-S96

McMASTER, P & VADEYAR H. Spain model: world leaders in organ donation. *Liver Transplant* 2000; 6: 501-3.

MELLENDEZ, HV & HEATON, ND. Understanding "marginal" liver grafts. *Transplantation* 1999; 68: 469-70.

MIKI T, GOLLER A, RAO A; WANG X, YIN WY, TANDIN A, FENG JJ, STARZL TE VALDIVIA LA. Tacrolimus enhances the immunosuppressive effect of cyclophosphamide but not that of leflunomide or mycophenolate mofetil in a model of discordant liver xenotransplantation. *Transplant Proc*. 1998; 30(4):1091-2.

MINOR, T & ISSELHARD, W. Impaired vascular conductance after global hepatic ischemia. Significance of the oxygen paradox and the vascular endothelium. In: Messmer, K, Menger, MD & Land, E (eds): *Microcirculation in organ transplantation*. Progress in applied microcirculation. Karger, Basel, 1995; pp 33-42.

MIRZA, D, GUNSON, B, Da SILVA, R, MAYER, A, BUCKELS, J, McMASTER, P. Policies in Europe on “marginal quality” donor livers. *Lancet* 1994; 344: 1480-3.

MOREIRA AJ, FRAGA C, ALONSO M, COLLADO PS, ZETTLER C, MARRONI C, MARRONI N, GONZALEZ-GALLEGO J. Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem Pharmacol* 2004; 68(10): 1939-46.

MORESCO RN, SANTOS RCV, ALVES FILHO JCF, OLIVEIRA JR. Effect of fructose-1,6-bisphosphate in the cold storage after 12 and 36 hours of rat liver preservation. *Transplant Proc.* 2004a; 36: 2593-5.

MORESCO RN, SANTOS R.C.V, ALVES FILHO J.C.F, CUNHA A.A, REIS C, REICHEL C.L, OLIVEIRA J.R. Protective effect of fructose-1,6-bisphosphate in the cold storage solution for liver preservation in rat hepatic transplantation. *Transplant Proc.* 2004b; 36: 1261-4.

MORRIS P. Medical history: transplantation – a medical miracle of the 20<sup>th</sup> Century. *NEJM* 2004: 2678-80.

MUELLER, AR, PLATZ, KP, KRAUSE, P, STEINMÜLLER, T, GLANEMANN, M, NEUMANN, U, LOBECK, H, NEUHAUS, P. Is the use of marginal liver grafts justified? *Transpl Proc* 1999; 31: 401-2.

NAGASAWA T, INADA Y, NAKANO S, TAMURA T, TAKAHASHI T, MARUYAMA K, YAMAZAKI Y, KURODA J, SHIBATA N. Effects of bezafibrate, PPAR pan-agonist, and GW501516, PPAR delta-agonist, on development of

steatohepatitis in mice fed a methionine-and choline deficient diet. *Eu J Pharmacol* 2006; 536 (1-2): 182 -91

NARDO B, MASETTI M, URBANI L, CARACENI P, MONTALTI R, FILIPPONI F, MOSCA F, MARTINELLI G, BERNARDI M, DANIELE PINNA A, CAVALLARI A. Liver transplantation from donors aged 80 years and over: pushing the limit. *Am J Transplant* 2004; 4(7): 1139-47.

NARDO B, MONTALTI R, BELTEMPO P, BERTELLI R, PUVIANI L, PACILE V, VIVARELLI M, CAVALLARI A. Octogenarian livers successfully transplanted in patients with fulminant hepatic failure. *Transplant Proc* 2005; 37 (1): 389-391: 928-40.

NATORI, S, SELZNER, M, VALENTINO, KL, FRITZ, LC, SRINIVASAN, A, CLAVIEN, P-A, GORES, GJ. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism. *Transplantation* 1999; 68: 89-96.

NORMAN, DJ. Allocation of livers for liver transplantation. Ethics and politics. *Clin Liver Dis* 1997; 1: 281-6.

NUNES FB, PIRES MG, ALVES FILHO JC., WACHTER PH, OLIVEIRA JR. Physiopathological studies in septic rats and the use of fructose-1,6-bisphosphate as cellular protection. *Crit Care Med.* 2002; 30(9): 2069-74.

NUNES FB, GRAZIOTTIN CM, ALVES FILHO JC, LUNARDELLI A, PIRES MG, WACHTER PH, OLIVEIRA JR. An assessment of fructose -1,6- bisphosphate as an

antimicrobial and anti-inflammatory agent in sepsis. *Pharmacol Res.* 2003a; 47(1): 35-41.

NUNES FB, GASPARETO PB, SANTOS RC, DE ASSIS M, GRAZIOTTIN CM, BIOLCHI V, ALVES FILHO JC, LUNARDELLI A, AVILA LD, PIRES MG, WACHTER PH, OLIVEIRA JR. Intravenous toxicity of fructose-1,6-biphosphate in rats. *Toxicol Lettt* 2003b; 143 (1): 73-81.

ORGANIZACIÓN NACIONAL DE TRASPLANTES. Disponível em <http://www.ont.org.sp>. Último acesso em novembro de 2006.

PESSAYRE D & FROMENTY B. NASH: a mitochondrial disease. *J Hepatol* 2005; 42(6): 1-13.

POST, S, PALMA, P, GONZÁLEZ, AP, RENTSCH, M, MENGER, MD. Microcirculatory events after reperfusion in liver transplantation. In: Messmer, K, Menger, MD & Land, E (eds): *Microcirculation in organ transplantation. Progress in applied microcirculation.* Karger, Basel, 1995; pp 43-50.

POKORNY H, LANGER F, HERKNER H, SCHERNBERGER R, PLÖCHL W, SOLIMAN T, STEININGER R, MUEHLBACHER F. Influence or cumulative number of marginal donor criteria on primary organ dysfunction in liver recipients. *Clin Transplant* 2005; 19: 532-6.

QUINTANA AB, GUIBERT EE, RODRIGUEZ JV. Effect of cold preservation/reperfusion on glycogen content of liver. Concise review. *Ann Hepatol* 2005; 4: 25-31.

RHODEN, EL, MAURI, M, PETTEFFI, L, BELLÓ-KLEIN, A, KALIL, AN, PEREIRA-LIMA, L, RHODEN, CR. Efeito da reperfusão na lesão tecidual causada por radicais livres em ratos submetidos à isquemia hepática. GED 1996; 15:49-52.

ROCHA MB, BOIN IF, ESCANHOELA CA, LEONARDI LS. Can the use of marginal liver donors change recipient survival rate? Transplant Proc 2004; 26: 914-5.

ROSEN, HR, MARTIN, P, GOSS, J, DONOVAN, J, MELINEK, J, RUDICH, S, IMAGAWA, DK, KINKHABWALA, M, SEU, P, BUSUTTIL, RW, SHACKLETON, CR. Significance of aminotransferase elevation early following liver transplantation. Transplantation, 1998; 65 (1): 68-72.

RIEDEL BJ, GAL J, ELLIS G, MARANGOS PJ, FOX AW, ROYSTON D. Myocardial protection using fructose 1,6-diphosphate during coronary artery bypass graft surgery: a randomized, placebo-controlled clinical trial. Anesth Analg 2004; 98: 20-9.

SCHAFFER, D & SORRELL, MF. Prostaglandins in liver transplantation: a promise unfulfilled. Gastroenterology 1996; 819-0.

SETTE H Jr, BACCHELLA T, MACHADO MC. Critical analysis of the allocation policy for liver transplantation in Brazil. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo 2003; 58: 179-84.

SHACKLETON, CR. Upregulation of major histocompatibility complex-expression under ischemic conditions in experimental models. Transplant Proc, 1998, 30: 4264-6.

SINGER P, COHEN J, CYNOBER L. Effect of nutritional state of brain-dead organ donor on transplantation. Nutrition 2001; 17: 948-52.

SINGER P, SHAPIRO H, COHEN J. Brain death and organ damage: the modulating effects of nutrition. *Transplantation*, 2005, 80: 1363-1368.

SOLA A, PANES J, XAUS C, HOTTER G. Fructose 1,6-biphosphate and nucleoside pool modifications prevent neutrophil accumulation in the reperfused intestine. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 74-81.

SOLA A, DE OCA J, ALFARO V, XAUS C, JAURRIETA E, HOTTER G. Protective effects of exogenous fructose-1,6-biphosphate during small bowel transplantation in rats. *Surgery* 2004; 135: 518-26.

SOUTHARD, JH & BELZER, FO. Principles of organ preservation. In: Busuttil, RW & Klintmalm, GB, eds. *Transplantation of the liver*. WB Saunders Company, Philadelphia, 1996, pp. 379-85.

SOUTHORN PA & POWIS G. Free radicals in medicine: chemical nature and biological reactions. *Mayo Clin Proc*. 1988; 63: 381-9.

SOUZA CF, CHOI HK, COSTA LA, XAVIER RM, ALBUQUERQUE GC, BARROS E. Exames laboratoriais mais comuns. In: XAVIER RM, ALBUQUERQUE GC, BARROS E (eds) *Laboratório na Prática Clínica - consulta rápida*. Artmed, Porto Alegre, 2005, pp.565-691.

SOUZA DE OLIVEIRA CP, STEFANO JT, DE LIMA VM, DE AS SV, SIMPLICIOFI, DE MELLO ES, CORREA-GIANELLA ML, FERREIRA ALVES VA, MARTINS LAURINDO FR, DE OLIVEIRA MG, GIANELLA NETO D, CARRILHO FJ. Hepatic

gene expression profile associate with non-alcoholic steatohepatitis protection by S-nitroso-N-acetylcysteine in ob/ob mice. *J Hepatol* 2006; 45 (5): 725-33.

STARZL, TE. Foreword. In: Busuttil, RW & Klintmalm, GB, eds. *Transplantation of the liver*. WB Saunders Company, Philadelphia, 1996a, pp. xvii-xviii.

STARZL, TE. History of liver and other splanchnic organ transplantation. In: Busuttil, RW & Klintmalm, GB, eds. *Transplantation of the liver*. WB Saunders Company, Philadelphia, 1996b, pp. 3-22.

STRASBERG, SM. Donor selection and preservation injury: "it all starts here". *Liver Transplant Surg*, 1997, 3(5) Suppl 1, S1-S7.

STEPHENSON GR, MORETTI EW, EL-MOALEM H. Malnutrition in liver transplant patients: preoperative subjective global assessment is predictive of outcome after liver transplantation. *Transplantation* 2001; 72: 666-70.

SUMIMOTO R, FUKUDA Y, GAMBIEZ L, OSHIRO H, DOHI K, SOUTHARD JH, BELZER FO. Successful 48-h liver preservation by controlling nutritional status of donor and recipient. *Transpl Int* 1994; 7 (Suppl 1): S499-S502.

TAKAHASHI K, HAKAMADA K, TOTSUKA E, UMEHARA Y, SASAKI M. Warm ischemia and reperfusion injury in diet-induced canine fatty livers. *Transplantation* 2000; 69: 2028-34.

TAN HM, GUNDLACH AL, MORRIS MJ. Exaggerated feeding response to central galanin-like peptide administration in diet obese rats. *Neuropeptides* 2005; 39 (3):

TAN KC, YANDZA T, DE HEMPTINNE B, CLAPUYT P, CLAUS D, OTTE JB. Hepatic artery thrombosis in pediatric liver transplantation. J Pediatr Surg 1988; 23 (20): 927-30.

TEOH NC & FARRELL GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. J Gastroenterol Hepatol 2003; 18: 891-902.

UNITED NETWORK FOR ORGAN SHARING. Disponível em <http://www.unos.org>. Último acesso em outubro de 2006.

UPADHYA, GA & STRASBERG, SM. Glutathione, lactobionate, and histidine cryptic inhibitors of matrix metalloproteinases contained in University of Wisconsin and Histidine/Tryptophan/Ketoglutarate liver preservation solutions. Hepatology 2000; 31: 115-22.

VERA SR, RIELY CA, BURRELL MI, KOFF RS. American Gastroenterological Association Clinical Teaching Project: Liver Transplantation, 1993, pp. 1-58.

VEXLER ZS, WONG A, FRANCISCO C, MANABAT C, CHRISTEN S, TAUBER M, FERRIERO DM. Fructose-1,6-bisphosphate preserves intracellular glutathione and protects cortical neurons against oxidative stress. Brain Res 2003; 960: 90-8.

WANG, L, FLORMAN, S, ROAYAIE, S, BASILE, J, ZHANG, Z-Y, Machac, J, Boros, P, Miller, CM. Differential in vivo recovery of sinusoidal endothelial cells, hepatocytes, and Kupffer cells after cold preservation and liver transplantation in rats. Transplantation 1998; 66: 573-8.

WASHBURN, W, JOHNSON, L, LEWIS, W, JENKINS, R. Graft functions and outcome of older (> or = 60 years) donor livers. *Transplantation* 1996; 61: 1062-6.

WAYNFORTH HB, FLECKNELL PA. Experimental and surgical technique in the rat. Second edition. Academic Press Hactount Brace Favanovich. New York. 1992.

WILLIAMS, JW. History of liver transplantation. In: Williams, JW, ed, *Hepatic Transplantation*, WB Saunders Company, Philadelphia, 1990, pp 2-10.

YOKOYAMA, I, TZAKIS, A, IMVENTARZA, O, TODO, S, CASAVILLA, A, LEGGIO, A, STARZL, TE. Pediatric liver transplantation from neonatal donors. *Transpl Int* 1992; 5: 205-8.

YOSHIDA, EM & LAKE, JR. Selection of patients for liver transplantation in 1997 and beyond. *Clin Liver Dis*, 1997, 1(2): 247-61.

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### AGEING AND ITS THE IMPACT ON THE QUALITY OF GRAFTS:

##### AN EXPERIMENTAL STUDY IN RAT LIVERS

Mota SM, Fraga RS, Gasperin G, Harlacher L,

Cerski CT, Oliveira JR, Álvares-da-Silva MR

#### *Introduction*

Liver transplantation (LT) is currently the treatment of choice for end-stage both chronic and acute hepatic diseases. As better are the results, more patients are considered to be listed, and besides donor shortage, this is the cause of the increases of waiting rolls and, consequently, increasing of mortality on the roll.

Donor shortage has made transplant groups to expand their limits for acceptation of organs. Age of donors has been usually considered a limiting factor. Some of the groups reject grafts from donors which are older than 60 or 65 years. However, these data are matter of controversy. Regarding liver function, bilirubins and aminotransferases are kept under the normal degree even in individuals with extremes of age, but serum albumin levels use to decline as years go by, suggesting damage on the protein synthesis.

The most common disease that leads to LT is cirrhosis due to hepatitis C virus (HCV). There are consistent clues of worse results with grafts from older donors in these recipients, with earlier recurrence of HCV, and lower survival both of the graft and the patient. The use of those organs has been often unadvised in

HCV receptors. The best results with these donors occur in selected cases: well-preserved liver function, less cold ischemia time, absent or mild graft steatosis or hepatocellular carcinoma Child-Pugh A recipients. Also, patients presenting with acute liver failure or chronic cholestatic diseases, use to get better results, focusing the importance of host factors.

As expected, preservation solution seems to play a role on the ischemia-reperfusion injury. LT is now being performed in the most of the centers through preservation with University of Wisconsin (UW) solution. Its costs, and evidences of non-universal protection, as seen by primary non-function rates, make attempts to research of others solutions. In this way, fructose-1,6-bisphosphate (FBP) may have some utility. It is an energetic mediator of glucolytic pathway, which has been studied in the field of cell protection in many pathological situations, as sepsis, and ischemia/reperfusion in organs other than the liver.

The aim of this study is to determinate the impact of the ageing of the donor in the cold ischemia injury in rat livers, as well to compare two distinct solutions of preservation: UW and FBP.

### *Materials and Methods*

All the procedures were carried out according to the current legislation in Brazil, and the study was approved by Ethics and Research Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Were studied twenty adult male Wistar rats, settled down separately in living-boxes of transparent polycarbonate, submitted to clear-and-dark cycles of 12 hours, under controlled temperature (22°C). The animals were fed with regular diet and received water *ad libitum*.

Animals were divided into two groups: control group: 10 rats, ageing 20 weeks, randomly assigned 5 to preservation with UW (C-UW) and 5, FBP (C-FBP); and older group: 10 rats, ageing 50 weeks, randomly assigned to same way: 5 to UW (I-UW) and 5 to FBP (I-FBP).

Rats were anesthetized through isoflurane 1,5% (Isoflurano®, Abbott), using calibrated vaporizator. Later, they were submitted to laparotomy, and portal vein was cannulated by an intravenous catheter of 20G (Abbocath®, n. 20 Johnson & Johnson), and connected to 125 mL of 4°C preservation solution, according to the group: UW (Viaspan®) or FBP saline solution at 10 mmol/L, under a pressure of 60cmH<sub>2</sub>O. Finally, hepatectomy was performed, and the liver preserved at 50mL of the respective solution, kept under 2-4°C for 8 hours, during which were taken out samples at 2, 4, 6, and 8 hours.

Animals were weighed on digital scale (Marte, model AS5500c) very before the surgical procedure, as well were the livers at the end of the period of preservation. Serum glucose and albumin were carried out through the kinetic method UV (Hitachi 917-Roche). From the samples taken were determined aspartato-aminotransferase (AST) and lactic dehidrogenase (LDH) - (kinetic method UV, Hitachi 917-Roche).

At the end of the preservation period, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), activity of catalase and the products of nitric oxide (NO) were determined. TBARS was done through the technique described by Halliwell & Guteridge, 1989), catalase by the reaction among phosphate buffer 50mH and hydrogen peroxide 0,3M, in the homogenized of hepatic tissue, with reading

effected at the spectrophotometer of 240nm, and NO was done through the Griess' method (Hevel & Marletta, 1994).

The specimens were stained with hematoxiline and eosine, observed by a single and blinded pathologist, who examined coded samples of tissue. Presences of portal inflammatory infiltrate, pericentral ischemic necrosis and periductal fibrosis, as well as steatosis were analyzed.

The test of normality of Kolmogorov-Smirnov was applied to all variables. In comparing the variables of unique measure ANOVA *one-way* was employed, followed by the test of multiple comparisons of Duncan. The comparisons of serial measures were done by ANOVA for repeated measures, followed by the test of minimal differences. The  $\alpha$  assumed as significant was of 0.05.

## *Results*

The average weight of the animals from the control group was respectively  $354.7 \text{ g} \pm 22.23$  and  $425.2 \text{ g} \pm 23.42$  - $p < 0.001$ . There was no difference between the average liver weight between both groups ( $12.51 \text{ g} \pm 1.8$  and  $13.45 \text{ g} \pm 2.0$ , respectively). Regarding blood glucose levels, there was no difference between the groups ( $226.9 \text{ g/dL} \pm 47.22$  and  $179.3 \pm 76.25$ ). Albumin was higher in the older group ( $2.59 \text{ mg/dL} \pm 0.48$  and  $3.04 \text{ mg/dL} \pm 0.53$ ), but there were no significant difference ( $p = 0.063$ ).

When compared to the biochemical parameters of preservation, there was significant difference between AST and LDH median levels. Both the parameters were superior in samples taken from the control group preserved with UW in relation to the other subgroups ( $p < 0.05$ ). Regarding the older group, there was a difference between UW and FBP preserved livers related to LDH, but not to AST. The results are shown in Table 1.

TBARS were superior in control group than in the older one ( $4.14 \text{ nmol/g tissue} \pm 0.79$  vs  $2.72 \pm 0.85$ ) -  $p = 0.001$ , but there was no difference between the preservation solutions (UW:  $3.45 \pm 1.45$  vs FBP  $3.48 \pm 0.48$  -  $p = 0.94$ ). Catalase activity was similar between the both groups -control and older ( $92.1 \text{ mmol/min/mg protein} \pm 47.1$  vs  $65.4 \pm 19.4$ ) -  $p = 0.11$ , but it was superior in UW preserved animals ( $98.7 \pm 43.2$  vs  $58.8 \pm 15.6$ ) -  $p = 0.02$ .

Mild centrilobular ischemic injury was found in 4 livers of the control group and in 2 of the older ones. In this group, 2 animals have had mild portal inflammatory changes. No animal had steatosis.

Table 1: AST and LDH levels collected from the preservation solution at 2, 4, 6 and 8 hours, in the different studied groups

	<b>Group C-UW (n=5)</b>	<b>Group C- FBP (n=5)</b>	<b>Group E-UW (n=5)</b>	<b>Group E- FBP (n=5)</b>
<b>AST</b>	121	24	45	24
<b>2h</b>	(86.5-146.5)	(17.5-37.0)	(36.5-78.0)	(5.5-45.0)
<b>AST</b>	153	35	64	30
<b>4h</b>	(115.5-173.5)	(27.5-71.5)	(54.5-109.0)	(14.0-55.5)
<b>AST</b>	181	53	77	42
<b>6h</b>	(133.5-193.0)	(32.0-104.0)	(68.0-157.0)	(23.0-106.0)
<b>AST</b>	205	94	103	52
<b>8h</b>	(155.0-220.0)	(40.0-133.0)	(86.5-162.0)	(28.5-152.0)
<b>LDH</b>	664	178	291	157
<b>2h</b>	(490.5-805.5)	(55.5-254.5)	(259.0-364.5)	(37.5-159.5)
<b>LDH</b>	817	258	409	187
<b>4h</b>	(639.5-1010.5)	(74.5-372.5)	(280.0-527.0)	(50.5-196.0)
<b>LDH</b>	968	380	457	272
<b>6h</b>	(708.0-1188.0)	(91.5-458.5)	(403.0-718.0)	(62.5-338.5)
<b>LDH</b>	1062	488	658	290
<b>8h</b>	(809.0-1566.0)	(114.0-652,5)	(478.5-799.0)	(81.0-395.0)

AST= aspartate-aminotransferase (UI/L). LDH= lactate desidrogenase (UI/L). C-UW= control animals, preserved with UW, C-FBP= control animals, preserved with FBP, E-UW= elderly animals, preserved with UW, E-FBP= elderly animals, preserved with FBP.

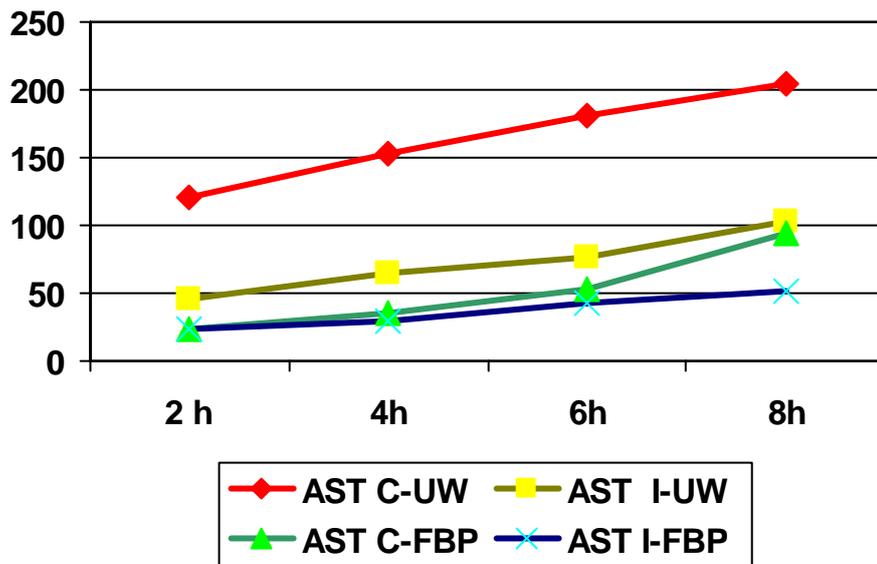


Figure 1. Here are presented the results obtained with AST and their comparison between the different groups. AST= aspartate-aminotransferase (UI/L). LDH= lactate desidrogenase (UI/L). C-UW= control animals, preserved with UW, C-FBP= control animals, preserved with FBP, E-UW= elderly animals, preserved with UW, E-FBP= elderly animals, preserved with FBP.

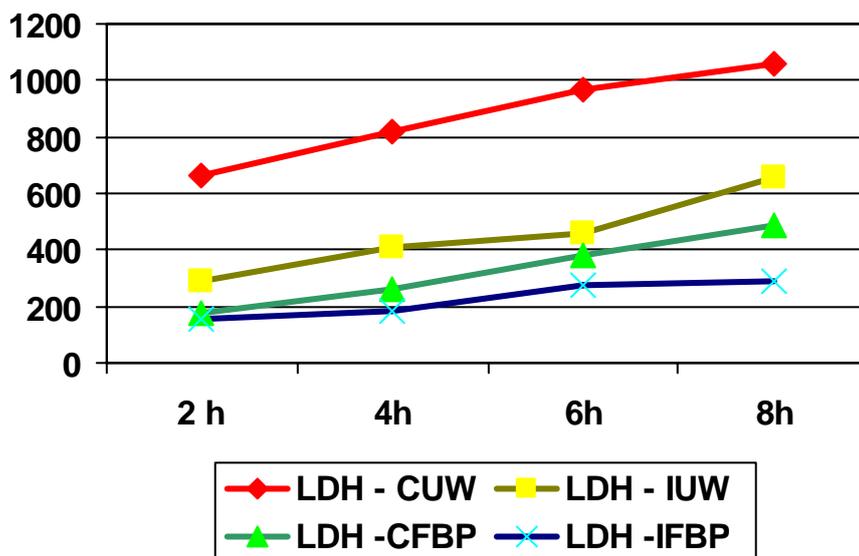


Figure 1. Here are presented the results obtained with LDH and their comparison between the different groups. AST= aspartate-aminotransferase (UI/L). LDH= lactate desidrogenase (UI/L). C-

UW= control animals, preserved with UW, C-FBP= control animals, preserved with FBP, E-UW= elderly animals, preserved with UW, E-FBP= elderly animals, preserved with FBP.

## *Discussion*

Nowadays the use of donors with expanded criteria is the only condition in the most groups of transplant, because of the lacking of organs. It considered that this would be the last technical frontier to be transposed in the TxH. Efforts to improve the quality of implant and its preservation represent an important field to researching. In this study, it was opted for evaluation an injury originated from the cold ischemia, since the interest focus was the donor. If it would have been done the reperfusion, certainly it would be added other independent variables of the initial state of the implant. The preservation at cold was done during 8 hours. That time would be questioned, since the UW solution would guarantee the viability of the implant just for 24 hours. However, that time is not used indeed, since more than 12 hours there is much more risk of cell injury, especially of the biliary epithelium. In the previous study, 12 hours of cold preservation were sufficient to demonstrate any injury. Because of inner logistical questions, preserving the organ for 12 hours would cause some problems. The preservation was done with the UW solution, which is the pattern in the most centers, but also with FBP. That solution could preserve, for saving the intracellular ATP and allowing more tolerance to the ischemia in non-ideal donors, as the old ones. Studying old donors is relevant because of its frequency in the clinical practice. Many donors exist because of the accidents and traumas, but a very significant quantity is of individuals with cerebral vascular complications, but many of them are old and have com-morbidity. Moreover, the reincidence of HVC post-HxT has attracted the attention to these special groups of donors. In this context, defining old rats seems essential. The rats used in this study were more than 50 weeks. This period of time is considered

sufficient to classify a rat as old. In this phase, the animals have already achieved their growing top and are not any more in their reproductive period and they already tend to lose their weight. There are signs that the growing old process determines structural changes of the livers in animals with the increase on the largeness of the hepatocytes and their nuclei, as well as the number of multinucleated cells. Furthermore, those changes continue after the transplant, even when the receptor is young and its question, which affects the liver receptor in the clinical practice, it would be interesting to study forms of reverting that situation in human beings. The option for the experimental study was done, because the application of FBP is still not restricted to it.

The weight of the livers of the animals did not differ among the old group and the group-control, as it was expected. However, the weight of the old animals was bigger than the control ones. Koh and his co-workers have demonstrated that rats grow up until the 52 weeks, when they they begin to lose weight. The rats included in this study achieved 54 weeks of ages at the end of observation period, in which they were submitted to the controlled diet. Perhaps this has contributed to they not to lose weight significantly. In the same way, the glycemia was not different among both groups. Considering that rats were sacrificed after a period of 12 hours fasting, and taking into account that glycemia, during the intervals between the meals, does not depend on the mobilization of hepatic glycogen stocks, it is possible to infer that there was no difference the nutritional situation of the animals, which was determined by the age. The averages of serum albumin were, however, superior in the old animals. This fact surprises and

contradicts the expectations, since it was demonstrated that the age reduces the albuminemia in animals.

It could be discussed whether this discovery puts in stake the adequacy of the time chosen for considering the animal as adult. However, as there is no more doubts in relation to the criteria which was chosen, it can be admitted that this testifies a good nutritional state in these animals. Thus, it is eliminated the point of view of the influence of innutrition in the unimportant of the implant from an old animal.

In relation to the damage of the implant of the cold ischemia, verified by biochemical criteria, it was demonstrated that the AST, and also the LDH, were superior in the aliquots of the preservation solution in rats-control of the UW groups, when compared to the others. That result surprises, since the expectation was the contrary: major injury in the older ones. The reason why this occurs still remains interrogated. It is interesting to notice that the FBP seems to have had livers of rats-control. In relation both to the AST levels and to the LDH levels, the group preserved with FBP has had better performance. That was statistically significant on the control ones, confirming the discoveries by Moresco and his co-workers. In the old ones, though the minor values of AST and LDH have been obtained in the livers preserved with FBP, there was no statistical difference.

When oxide stress is evaluated, TBARS levels were superior in animals-control, suggesting that a bigger stimulus to the tissue injury has occurred in this group, independently of the preservation solution employed. The catalysis activity was similar among both old and control, yet it was bigger in the livers

preserved with UW. Since the catalysis is liberated in order to counterpoint the harmful effects of the oxidative stress, it could be inferred that more tissue damage have occurred with UW than with FBP.

Thus, differences were found between rats-control submitted to the preservation with UW and old animals on the cold ischemia, verified by the exposed criteria. It has been suggested that the evaluation of the post transplant in human beings and in rats seems to be inferior when old donors are used. The present study data go towards to that statement. It is possible to conclude that livers from old donors are not inferior to the younger ones, ore, it could be inferred that damages which occur and influence the post transplant evolution depend especially than that would occur in the reperfusion. The role of FBP in this context, it is still to be demonstrated.

## REFERÊNCIAS

1. EVERSON GT & TROTTER J. Role of adult living donor liver transplantation in patients with hepatitis C. *Liver Transplantation* 2003; 9(2): 64-8.
2. WIESNER R H, PORAYKO M K, HAY J E, LARUSSO N F, STEERS J L, KROM R A, DICKSON E R. Liver transplantation for primary sclerosing cholangitis: impact of risk factors on outcome. *Liver Transplant Surgery* 1996; 2: (1) 99-108.
3. UNITED NETWORK FOR ORGAN SHARING. Disponível em <http://www.unos.org>. Último acesso em julho de 2006.
4. CHANG AJ, DIXIT V, SAAB S. Fulminant Hepatic Failure. *Current Treatment Options Gastroenterology* 2003; 6(6):473-79.
5. POKORNY H, LANGER F, HERKNER H, SCHERNBERGER R, PLÖCHL W, SOLIMAN T, STEININGER R, MUEHLBACHER F. Influence or cumulative number of marginal donor criteria on primary organ dysfunction in liver recipients. *Clinical Transplantation* 2005; 19: 532-6.
6. EMRE S, SCHWARTZ ME, MYRON E, ALTACA G, SETHI P, FIEL MI, GUY SR, KELLY DM, SEBASTIAN A, FISHER A, EICKMEYER D, SHEINER P, MILLER CM. Safe use of hepatic allografts from donors older than 70 years. *Transplantation* 1996; 62 (1): 62-65.
7. WALL WJ, MIMEAULT R, GRANT DR, BOCH M. The use of older donor livers for hepatic transplantation. *Transplantation* 1990; 49 (2): 377-81
8. MARINO IR, DOYLE HR, ALDRIGHETTI L, DORIA C, MCMICHAEL J, GAYOWSKI T, FUNG JJ, TZAKIS AG, STARZL TE. Effect of donor age and sex on the outcome of liver transplantation. *Hepatology* 1995; 22(6): 1754-62

9. ROMERO CJ, GONZÁLEZ EM, RUÍZ FC, CARAZO FM, SEGUROLA CL, GONZÁLEZ FR, PINTO IG, GARCÍA IG, ROMANO DR, SANZ CM. Use of octogenarian livers safely expands the donor pool. *Transplantation* 1999; 68 (4): 572-75.
10. BUSQUETS J, XIOL X, FIGUERAS J, JAURRIETA E, TORRAS J, RAMOS E, RAFECAS A, FABREGAT J, LAMA C, IBAÑES L, LLADO L, RAMON JM. The impact of donor age on liver transplantation: influence of donor age on early liver function and subsequent patient and graft survival. *Transplantation* 2001; 71 (12): 1765-71.
11. CESCO M, MAZZIOTTI A, GRAZI GL, RAVAIOLI M, PIERANGELI F, ERCOLANI G, CAVALLARI A. Evaluation of the use of graft livers procured from old donors (70 to 80 years) for hepatic transplantation. *Transplantation proceedings* 2001; 33: 934-35.
12. GRAZI GL, CESCO M, RAVAIOLI M, ERCOLANI G, PIERANGELI F, D'ERRICO A, RIDOLFI L, CAVALLARI A, MAZZIOTTI A. A revised consideration on the use of very aged donors of liver transplantation. *American Journal of Transplantation* 2001; 1: 61-68.
13. GONZÁLEZ FR, ROMERO CJ, ROMANO DR, SEGUROLA CL, MEDINA ME, SABORIDO BP, GARCÍA IG, CAÑETE AR, GONZÁLEZ EM. Orthotopic liver transplantation with 100 hepatic allografts from donors over 60 years old. *Transplantation proceedings* 2002; 34: 233-34.
14. CESCO M, GRAZI GL, ERCOLANI G, NARDO B, RAVAIOLI M, GARDINI A, CAVALLARI A. Long-term survival of recipients of liver grafts from donors older than 80 years: is it achievable? *Liver Transplantation* 2003; 9 (11): 1174-80.

15. VIVARELLI M, CUCCHETTI A, LA BARBA G, BELLUSCI R, DE VIVO A, NARDO B, CAVALLARI A, PINNA AD. Ischemic arterial complications after liver transplantation in the adult: multivariate analysis of risk factors. *Archives Surgery* 2004; 139 (10): 1069-74.
16. MONTALTI R, NARDO B, BERTELLI R, BELTEMPO P, VIVARELLI M, CAVALLARI A. Donor pool expansion in liver transplantation. *Transplantation proceedings* 2004; 36: 520-22.
17. ZHAO Y, LO CM, LIU CL, FAN ST. Use of elderly donors (> 60 years) for liver transplantation. *Asian Journal Surgery* 2004; 27 (2): 114-19.
18. ZAPLETAL CH, FAUST D, WULLSTEIN C, WOESTE G, CASPARY WF, GOLLING M, BECHSTEIN WO. Does the liver ever age? Results of liver transplantation with donors above 80 years of age. *Transplantation proceedings* 2005; 37: 1182-85.
19. PIRENNE J, MONBALIU D, VAN GELDER F, VAN HEES D, AERTS R, VERSLYPE C, VAN STEENBERGEN, W, FERDINANDE P, FEVERY J, NEVENS F, COOSEMANS W, STOCKMAN W, LORMANS P. Liver transplantation using livers from septuagenarian and octogenarian donors: an underused strategy to reduce mortality on the waiting list. *Transplantation proceedings* 2005; 37: 1180-81.
20. GASTACA M, VALDIVIESO A, PIJOAN J, ERRAZTI G, HERNANDE M, GONZALES J, FERNANDEZ J, MATARRANZ A, MONTEJO M, VENTOSO A, MARTINEZ G, FERNANDEZ M, URBINA O. Donor older than 70 years in liver transplantation. *Transplantation proceedings* 2005; 37: 3851-54.

21. KOH M, OKAMOTO E, YAMANAKA J, FUJIMOTO J. Impacto of donor age on the growth of young recipient rats after liver transplantation. *Surgery Today* 2006; 36: 457-66.
22. BACCARANI U, ADANI GL, TONIUTTO P, SAINZ M, LORENZIN D, VIALE PL, RAMACCIATO G, RISALITI A, BRESADOLA F. Liver transplantation from old donors into HCV and non-HCV recipients. *Transplantation proceedings* 2004; 36: 527-28.
23. RUSSO M W, GALANKO J A, ZACKS S L, BEAVERS K L, FRIED M W, SHRESTHA R. Impacto of donor age and year of transplant recipients with chronic hepatitis C. *American Journal of Transplantation* 2004; 4: 1133-38.
24. PIRENNE J, MONBALIU D, VAN GELDER F, VAN HEES D, AERTS R, VERSLYPE C, VAN STEENBERGEN W, FERDINANDE P, FEVERY J, NEVENS F, COOSEMANS W, STOCKMAN W, LORMANS P. Liver transplantation using livers from septuagenarian and octogenarian donors: an underused strategy to reduce mortality on the waiting list. *Transplantation proceedings* 2005; 37 (2): 1180-81.
25. NARDO B, MONTALTI R, BELTEMPO P, BERTELLI R, PUVIANI L, PACILÈ V, VIVARELLI M, CAVALLARI A. Octogenarian livers successfully transplanted in patients with fulminant hepatic failure. *Transplantation proceedings* 2005; 37: 389-91.
26. GARCIA C E, GARCIA R F L, GUNSON B, CHRISTENSEN E, NEUBERGER J, MCMASTER P, MIRZA D F. Analysis of marginal donors parameters in liver transplantation for primary biliary cirrhosis. *Experimental and Clinical Transplantation* 2004; 2 (1).

27. NARDO B, BELTEMPO P, BERTELLI R, MONTALTI R, VIVARELI M, URBANI L, MASETTI M, DI NARO A, FILIPPONI F, MOSCA F, PINNA A, CAVALLARI A. Comparison of Celsior and University of Wisconsin in cold preservation of liver from octagenarian donors. *Transplantation proceedings* 2004; 36: 523-24.
28. MORESCO R N, SANTOS R C V, ALVES FILHO J C F, CUNHA A A, REIS, C, REICHEL C L, OLIVEIRA J R. Protective effect of fructose-1,6-bisphosphate in the cold storage solution for liver preservation in rat hepatic transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2004; 36: 1261-64.
29. HIROKAWA F, NAKAI T, YAMAUE H. Storage solution containing fructose-1,6- bisphosphate inhibits the excess activation of Kupffer cells in cold liver preservation. *Transplantation* 2002; 74: 779-83.
30. ALMADA LA, SCANDIZZI AL, GUIBERT EE, FURNO G, RODRÍGUEZ JV. Biliary inorganic phosphate as a tool for assessing cold preservation-reperfusion injury: a study in the isolated perfused rat liver model. *Liver Transplantation* 2003; 9: 160-9.
31. SCO L, SANCHEZ-BUENO F, SOLA J, RUIZ JM, RAMIREZ P, ROBLES R, RODRIGUEZ JM, PARRILLA P. Effects of cold ischemia time on the graft after orthotopic liver transplantation. A bile cytological study. *Transplantation*, 1996, 61(3): 393-96.
32. CARRA STUPINA AS, BEREHZTKOV NV. Morphological manifestations of compensatory-adaptive processes in the liver during aging. *Biull Eksp Biol Med* 1988; 105: 380-82.

33. SCHMUCKER DL. Aging and the liver. *J Gerontol Biol Sci Med Sci* 1998; 53: 315-20.
34. ROIG T, DE OLIVEIRA J R, BARTRONS R, BERMUDEZ J. Fructose 1,6-bisphosphate protects against D-galactosamine toxicity in isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1994; 266 (6Pt 1): 1722-28.
35. DE OLIVEIRA J R, ROSA J L, ABROSIO S, BARTRONS R. Effect of galactosamine on hepatic carbohydrate metabolism: protective role of fructose 1,6-bisphosphate. *Hepatology* 1992; 15 (6): 1147-53
36. CUESTA E, BOADA J, CALAFELL R, PERALES J C, ROIG T, BERMUDEZ J. Fructose 1,6-bisphosphate prevented endotoxemia, macrophage activation, and liver injury induced by D-galactosamine in rats. *Critical Care Medicine* 2006;34 (3):927-29
37. BAKER H, LINDSEY J, WEIBROTH S. The laboratory rat. *New York Academic Press* 1979.

## ANEXO 2

Resultados do estudo inicial para cálculo da dieta padrão oferecida para o Grupo I - controles com dieta normal. Foram ofertadas diariamente 30 gramas da ração Nuvilab CR1® (Nuvital Nutrientes Ltda, Colombo, Paraná) para cada animal, sendo descontadas as sobras em gramas, chegando-se ao valor ingerido no dia. A média final obtida foi de 21,56 g/dia, sendo adotado valor de 22 g como dieta padrão - ver tabela abaixo.

Tabela 1. Quantidade diária (em gramas) ingerida pelos animais durante o período de observação por 7 dias para cálculo da dieta normal a ser ofertada no estudo.

Dia	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5	Rato 6	Rato 7	Rato 8	Rato 9	Rato 10
1	20,7	22,6	21,2	4,1	26,9	11,1	20,8	12	29,3	23,6
2	19,7	16,3	15,8	19,5	21,6	12,4	11,4	22,3	23,2	11,4
3	21,0	19,4	21,5	25	22,5	25,5	20,9	24,4	23,4	25,3
4	21,1	19,8	22,6	24,7	29,3	21,4	19,2	25,2	29,6	24,4
5	24,1	19	15	26	22,8	19	20,8	23,3	22,4	23,8
6	25,3	23,8	21,2	23,5	26,8	20	22,2	24,3	26	25,2
7	23,5	22,7	22	22,6	26	18,8	19,35	22,2	20,76	24,7
Média gramas	22,2	20,51	19,9	20,77	25,13	18,32	19,24	21,96	24,95	22,63