

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Cirurgia**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**OS EFEITOS DA PROSTAGLANDINA E1 E DA
N-ACETILCISTEÍNA NA PRESERVAÇÃO HEPÁTICA DURANTE
A FASE DE ISQUEMIA FRIA USANDO A SOLUÇÃO UW
– ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

ALESSANDRO DELGADO LOUZADA

ORIENTADORA: PROF.^a DR.^a MARIA LÚCIA ZANOTELLI

PORTO ALEGRE,

junho de 2007

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Cirurgia**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**OS EFEITOS DA PROSTAGLANDINA E1 E DA
N-ACETILCISTEÍNA NA PRESERVAÇÃO HEPÁTICA DURANTE
A FASE DE ISQUEMIA FRIA USANDO A SOLUÇÃO UW
– ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

ALESSANDRO DELGADO LOUZADA

ORIENTADORA: PROF.^a DR.^a MARIA LÚCIA ZANOTELLI

*Dissertação de Mestrado apresentada
à Pós-Graduação da Faculdade de
Medicina da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul para obtenção do
título de Mestre em Cirurgia.*

PORTO ALEGRE,

junho de 2007

FICHA CATALOGRÁFICA

I. L895e Louzada, Alessandro Delgado

Os efeitos da prostaglandina E1 e da n-acetilcisteína na preservação hepática durante a fase de isquemia fria usando a solução UW : estudo experimental em ratos / Alessandro Delgado Louzada ; orient. Maria Lúcia Zanotelli. – 2007.
91 f. .

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Cirurgia. Porto Alegre, BR-RS, 2007.

1. Transplante de fígado 2. Isquemia fria 3. Soluções para preservação de órgãos 4. Ratos 5. Modelos animais de doenças 6. Alprostadil 7. Acetilcisteína I. Zanotelli, Maria Lúcia II. Título.

NLM: WI 770

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

BANCA EXAMINADORA

Membros da banca:

1. Prof.^a Dr.^a Themis Reverbel da Silveira, programa de pós-graduação em gastroenterologia, UFRGS.
2. Prof. Dr. Luiz Rohde, programa de pós-graduação em cirurgia, UFRGS.
3. Prof. Dr. Luiz Sérgio Leonardi, programa de pós-graduação em cirurgia, UNICAMP.
4. Prof. Dr. Mário Reis Álvares-da-Silva , programa de pós-graduação em gastroenterologia, UFRGS.

DEDICATÓRIA

A meus pais, Antonio e Eunice, pela sólida formação ética que me proporcionaram, o que me permitiu atingir este objetivo; e a minha esposa, Carla, que esteve a meu lado, incentivando-me com muito amor e tornando esta tarefa menos árdua.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, de modo muito especial,

- à professora Dr.^a Maria Lúcia Zanotelli, pela dedicação e sabedoria dispensadas na orientação deste trabalho;
- à professora Dr.^a Themis Reverbel da Silveira, por ter-me permitido desenvolver a pesquisa junto ao Laboratório de Hepatologia Pediátrica;
- ao professor Dr. Carlos Thadeu Schimidt Cerski, por ter realizado a análise técnica do material anatomopatológico e permitido a utilização do Laboratório de Patologia;
- à professora Dr.^a Roseli de Oliveira Möllerker, responsável técnica pelo Centro de Cirurgia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre;
- ao acadêmico de medicina Leonardo Winkelmann, por ter prestado valioso auxílio na execução deste trabalho;
- aos funcionários do Centro de Pesquisa e Laboratório de Cirurgia Experimental, pela disponibilidade e competência.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	difosfato de adenosina
AMP	monofosfato de adenosina
ANOVA	Análise de variâncias para medidas repetidas
ATP	trifosfato de adenosina
FAD	flavina-adenina dinucleotídeo
FAD+H	flavina-adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
FWW	fator de von Willebrand
GPPG	Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
kg	Quilograma
l	Litro
LPS	Lipopolissacarídeo
mcg	Micrograma
mg	Miligrama
ml	Mililitro
MMP	Matrix Metaloproteinase
NAC	N-acetilcisteína
NAD+	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
PGE	prostaglandina E1
pH	potencial hidrogênico
TGO	tansaminase glutâmico oxalacética
TGP	tansaminase glutâmico pirúvica
UI	unidade internacional
UW	solução da Universidade de Wisconsin

°C grau Celsius

% por cento

LISTA DE TABELAS

		Pág.
Tabela 1	Material da análise anatomopatológica	57
Tabela 2	Resultados da análise anatomopatológica	58
Tabela 3	Resultados da análise laboratorial de TGO e TGP	61

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Material cirúrgico	20
Figura 2	Anestesia	21
Figura 3	Cirurgia	21
Figura 4	Laparotomia mediana	22
Figura 5	Clampeamento da artéria aorta supracelíaca e perfusão através da artéria aorta e da veia porta	23
Figura 6	Secção da veia cava inferior supra-hepática	24
Figura 7	Preservação do enxerto submerso em solução	25

LISTA DE GRÁFICOS

		Pág.
Gráfico 1	Valores de TGO	30
Gráfico 2	Valores de TGP	31
Gráfico 3	TGO e TGP no grupo 1 (Belzer)	32
Gráfico 4	TGO e TGP no grupo 2 (PGE)	32
Gráfico 5	TGO e TGP no grupo 3 (NAC)	33
Gráfico 6	Degeneração Hidrópica (nº de animais “ <i>versus</i> ” tempo)	35
Gráfico 7	Infiltrado Inflamatório Portal (nº de animais “ <i>versus</i> ” tempo)	37
Gráfico 8	Degeneração Hidrópica (regressão logística)	38
Gráfico 9	Infiltrado Inflamatório Portal (regressão logística)	40

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Transplante hepático e preservação de órgãos	1
1.2 Fisiopatologia e bioquímica	7
1.3 N-acetilcisteína	10
1.4 Prostaglandina E	11
2 JUSTIFICATIVA	13
3 OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo geral	14
3.2 Objetivos específicos	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Animais	16
4.2 Cálculo da amostra	17
4.3 Grupos	17
4.4 Experimento	18
4.4.1 Prostaglandina E1 — Alprostadil (Prostin VR TM)	18
4.4.2 N-acetilcisteína – Fluimucil®	19
4.4.3 Solução de Belzer	19

4.4.4 Cirurgia	19
4.4.5 Acompanhamento dos enxertos	25
4.4.6 Laboratório de análises clínicas	26
4.4.7 Laboratório de patologia	26
4.5 Análise estatística	27
4.6 Aspectos éticos	27
5 RESULTADOS	29
5.1 Grupos “versus” Tempo em relação à dosagem enzimática de TGO e TGP	29
5.2 Grupos comparados isoladamente em relação ao tempo de isquemia fria e valores de TGO e TGP	31
5.3 Grupos “versus” biópsias hepáticas “versus” tempo de preservação	33
5.3.1 Edema intersticial	34
5.3.2 Degeneração hidrópica	34
5.3.3 Degeneração gordurosa	35
5.3.4 Lesão endotelial	35
5.3.5 Infiltrado inflamatório lobular	36
5.3.6 Infiltrado inflamatório portal	36
5.3.7 Necrose	37
5.4 Grupos “versus” biópsias hepáticas	37
5.4.1 Edema intersticial	38
5.4.2 Degeneração hidrópica	38
5.4.3 Degeneração gordurosa	39
5.4.4 Lesão endotelial	39
5.4.5 Infiltrado inflamatório lobular	39

5.4.6 Infiltrado inflamatório portal	39
5.4.7 Necrose	40
6 DISCUSSÃO	41
7 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	51
APÊNDICE	56
APÊNDICE A – Tabela 1 – Material da análise anatomopatológica	57
APÊNDICE B – Tabela 2 – Resultados da análise anatomopatológica	58
APÊNDICE C – Tabela 3 – Resultados da análise laboratorial de TGO e TGP	61
APÊNDICE D – Artigo em língua portuguesa	63
APÊNDICE E – Artigo em língua inglesa	70

RESUMO

Introdução: Para realizar-se transplante de órgãos, é necessário que se preserve o enxerto durante a fase de isquemia fria. Entretanto, as soluções de preservação atuais não apresentam capacidade de oxigenar o tecido, o que causa, inevitavelmente, lesão celular. Em vista disso, busca-se associar substâncias antiinflamatórias, vasodilatadoras e antioxidantes à solução de preservação, tentando, assim, melhorar a qualidade da preservação hepática durante a fase de isquemia fria.

Animais e métodos: Realizou-se a hepatectomia do doador em 36 ratos Wistar, divididos em 3 grupos de 12 animais. Os fígados desses ratos foram perfundidos e preservados durante 36 horas. No grupo 1, considerado grupo controle, foi utilizada a Solução da Universidade de Wisconsin (UW); o grupo 2 teve a UW acrescida de prostaglandina E1; o grupo 3 teve a UW acrescida de N-acetilcisteína. Realizaram-se biópsias hepáticas e coletaram-se amostras da solução de preservação nos tempos de 12, 24 e 36 horas.

Resultados: O estudo bioquímico da solução de preservação demonstrou que os níveis de transaminases se elevam com o passar do tempo, mas isso ocorreu em menor nível quando a UW foi acrescida de N-acetilcisteína. A análise histopatológica das lâminas das biópsias revelaram um infiltrado inflamatório portal menor quando a UW foi acrescida de prostaglandina E1.

Conclusão: Assim, entendemos que a prostaglandina E1, considerada um potente antiinflamatório e vasodilatador, e a N-acetilcisteína, tida como um excelente antioxidante, acarretam efeito protetor ao enxerto hepático quando associadas à solução de preservação.

Palavras-chave: Prostaglandina E1, N-acetilcisteína, Transplante Hepático, Solução de Preservação.

ABSTRACT

Introduction: In order to transplant an organ, it is necessary to preserve the graft during the cold ischemia period. The current preservation solutions are not able to oxygenate the tissue, which inevitably causes cell damage. We intend to associate non-inflammatory, vessel dilating and non-oxidative substances to the preservation solution to try to improve the quality of the liver preservation during the cold ischemia.

Animals and methods: We performed the donor's hepatectomy in 36 Wistar mice divided into 3 groups of 12 mice. The animals' livers were perfused and preserved for 36 hours. In group 1, the control group, University of Wisconsin solution (UW) was used. In group 2, the UW was used together with prostaglandin 1 (0.5mcg/ml) and in group 3 UW was used together with N-acetylcysteine (0.3mg/ml). Hepatic biopsies were carried out, and samples of the preservation solution were collected in the preservation periods of 12, 24 and 36 hours.

Results: The biochemical study of the preservation solution showed that the levels of transaminases increase over time, but this occurred less when UW was added to N-acetylcysteine ($p > 0,05$). The histopathological analysis of the biopsies showed a smaller portal inflammatory injury when UW was added to prostaglandin E1 ($p < 0,05$).

Conclusion: We therefore understand that prostaglandin E1, which is considered to be powerful non-inflammatory and vessel dilator, and N-acetylcysteine, which is an excellent non-oxidative substance, have a protective effect on the liver graft when associated with the preservation solution.

Word-keys: Prostaglandin E1, N-acetylcysteine, Liver Transplantation, Preservation Solution.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Transplante hepático e preservação de órgãos

As doenças hepáticas crônicas graves, até um passado recente, tinham como tratamento medidas paliativas frente à impossibilidade de recuperação do parênquima hepático com as medicações disponíveis e, invariavelmente, levavam ao óbito¹.

Com os avanços da medicina obtidos nas últimas décadas em relação às técnicas cirúrgicas, ao intensivismo pós-operatório, à imunossupressão e à preservação de órgãos, o transplante hepático passou a ser método de escolha para o tratamento das doenças crônicas terminais do fígado na atualidade, mudando, de forma radical, a história natural dessas doenças¹.

Os métodos de preservação são um componente necessário para o transplante de órgãos. Para a utilização ideal dos doadores cadáveres, os órgãos têm que ser transportados do local de captação ao centro de transplantes, onde se encontra o receptor. Os procedimentos de preservação fornecem o tempo necessário para que se mantenha a

viabilidade do órgão com um mínimo de lesão tecidual e boa qualidade funcional do enxerto até o transplante^{1,3}.

O sucesso dos métodos de preservação de órgãos deve-se a três princípios.

O primeiro deles é o da hipotermia, chave para a preservação orgânica. Embora se desconheça a temperatura ideal, há um consenso de que a temperatura entre 0° e 4°C lentifica as reações catabólicas (supressão das enzimas hidrolíticas) que causam destruição tecidual e reduz as exigências de nutrientes, oxigênio e energia^{2,3,6}.

O segundo diz respeito ao uso de uma solução que crie um ambiente físico e bioquímico adequado. Os componentes devem ser osmoticamente ativos e precisam combater a tendência das células a ficarem tumefadas no frio; devem proporcionar tampões do hidrogênio que regulam o pH para níveis próximos à neutralidade e oferecer uma concentração apropriada de eletrólitos. É importante, ainda, que o ambiente contenha substâncias que suprimam reações indesejáveis, ou seja, que possua inibidores metabólicos. Esses devem suprimir a degradação de metabólitos e/ou oferecer metabólitos, substratos e similares que potencializem a recuperação do órgão durante a reperfusão. Os tipos e concentrações ideais de fatores bioquímicos necessários para a preservação orgânica de alta qualidade, por longo prazo, ainda não são conhecidos e isso constitui uma importante área de pesquisa^{2,3,6}.

Finalmente, o terceiro princípio é o da lesão por reperfusão, ou seja, a lesão causada ao tecido isquêmico ao ser reperfundido. A reperfusão sanguínea desencadeia uma cascata de acontecimentos que pode resultar na insuficiência do órgão. Alguns dos acontecimentos são a formação de radicais livres de oxigênio, a destruição tecidual, a indução da síntese de agentes vasoativos, a lesão hipóxica ou anóxica das células, o recrutamento e a ativação de

macrófagos e a resposta inflamatória que destrói o tecido ou gera uma depressão metabólica que faz com que as células fiquem tumefatas e a reperfusão do tecido seja precária^{2,3,6}.

Nos anos sessenta, então, juntaram-se o conhecimento técnico cirúrgico experimental, as técnicas ainda precárias de imunossupressão (como a irradiação corpórea total) e pacientes em fase terminal de cirrose sem nenhuma perspectiva de tratamento. Nesse contexto, em 1963, Thomas Starzl, em Denver - Colorado, nos Estados Unidos, realizou os primeiros transplantes hepáticos em seres humanos. Sua primeira série de 11 transplantes (incluindo 4 transplantes auxiliares) teve 100% de mortalidade operatória ou perioperatória. A causa da morte, em todos os casos, foi o sangramento incontrolável associado a outras complicações¹.

Apenas em 1967, ainda na Universidade do Colorado, Thomas Starzl obteve, pela primeira vez, ampla sobrevida (pouco mais de 1 ano) em um receptor de aloenxerto hepático humano. Até esse momento, utilizavam-se, como solução de preservação, as soluções fisiológicas ou soluções a base de lactato resfriadas a 4°C^{1,6}.

Collins, em 1969, utilizou uma solução altamente concentrada em potássio, magnésio, glicose e fosfato para preservação de rins. Logo essa solução de preservação — mais tarde modificada e chamada de Euro-Collins — tornou-se o padrão-ouro para preservação de rins, fígado e pâncreas, permanecendo nesse patamar durante a década de setenta e início dos anos oitenta^{5,6}.

A introdução da ciclosporina como imunossupressor e a combinação desta droga com a prednisona, associado ao aprimoramento da técnica cirúrgica e à preservação do enxerto durante a fase de isquemia fria, melhoraram as perspectivas do transplante hepático a partir de 1980⁶. Em 1983, nos Estados Unidos, os Natinal Institutes of Health

promoveram um simpósio internacional e, frente aos bons resultados dos grupos que realizavam transplantes hepáticos, conferiram caráter terapêutico ao procedimento¹.

Nos anos oitenta, a solução da Universidade de Wisconsin (UW) — Solução de Belzer — foi desenvolvida por Folkert O. Belzer, professor da Universidade de Wisconsin, nos Estados Unidos, e testada em um estudo prospectivo multicêntrico europeu, onde se mostrou superior à Solução Euro-Collins no que diz respeito à taxa de disfunção primária do enxerto⁵. A partir deste estudo, a solução UW passou a ser considerada a solução de preservação padrão-ouro para preservação de fígado, pâncreas, pulmão e coração.

A solução UW é constituída por lactobionato de potássio (100mmol/l), rafinose (30mmol/l), fosfato de potássio (25mmol/l), glutathione (3mmol/l), adenosina (5mmol/l), alopurinol (1mmol/l), sulfato de magnésio (5mmol/l), cloreto de sódio (25mmol/l), cloreto de potássio (125mmol/l), insulina (16mg/l), penicilina cristalina (200.000 UI/l) e dexametasona (16mg/l)³.

Ainda são testadas diferentes soluções de preservação no transplante de fígado, como a Histadina – Triptofano – Ketoglutarase, mas os resultados nunca foram suficientemente bons para substituição da solução de Belzer como padrão-ouro^{5,8,36}.

Com a evidência e definição de que o transplante hepático é a única alternativa curativa para a doença hepática terminal, inúmeros estudos surgiram para avaliar, especificamente, as diversas fases do transplante hepático. Lemasters JJ, et al.,1997, estudaram as injúrias hepáticas após a fase de isquemia fria em solução de Belzer e afirmaram que o fígado poderia ser preservado por, no máximo, 24 horas. Segundo esses autores, o tempo prolongado de isquemia leva a uma ativação de células Kupffer (macrófagos hepáticos) e células inflamatórias endoteliais; por conseguinte, causa

distúrbios da microcirculação hepática e adesão plaquetária associados à resposta inflamatória sistêmica após o implante do enxerto¹².

Outros autores buscaram a prostaglandina E1 e a N-acetilcisteína como alternativa para melhores resultados no transplante hepático; alguns deles utilizando modelos experimentais.

Kim YI, et al., 1997, usaram um modelo experimental em porcos e testaram três grupos, no primeiro realizaram a hepatectomia do doador e perfundiram com solução de preservação (técnica clássica), no segundo fizeram a hepatectomia e perfusão após parada cardio-respiratória de 30 minutos, e no terceiro trataram o animal com prostaglandinas E1 e I2 previamente à parada cardio-respiratória de 30 minutos e então fizeram a hepatectomia e perfusão com solução de preservação. Eles encontraram resultados semelhantes entre os grupos 1 e 3 (sem diferença estatística entre eles) e concluíram que o tratamento de doadores instáveis e com risco de parada cardíaca com prostaglandinas pode permitir a utilização deste órgão na ocorrência deste evento¹³.

Manika A, et al., 1999, não encontraram benefício ao utilizar a N-acetilcisteína em doadores com parada cardio-respiratória de seu modelo experimental em porcos¹⁴.

Arai M, et al., 1999, estudaram um modelo experimental em ratos, onde os animais foram expostos antes do transplante hepático à endotoxina liberada a partir da translocação bacteriana (lipopolissacarídeo), e o grupo tratado com prostaglandina E2 teve melhor resultado. Os autores concluem que a prostaglandina E2 utilizada nos doadores pode acarretar benefício ao transplante hepático¹⁵.

Gaber AO, et al., 1988, estudaram 17 pacientes transplantados divididos em 2 grupos. No grupo controle foi utilizada a técnica clássica e o segundo grupo foi tratado imediatamente antes da perfusão do órgão e início da isquemia fria com infusão de

prostaglandina E1 e albumina humana, e teve ainda adição de prostaglandina E1 à solução de preservação. Como o grupo tratado teve melhores resultados, os autores concluem dizendo que doadores hipotensos ou que necessitaram de vasopressor poderiam ser perfundidos com prostaglandina E1 e albumina humana buscando uma melhor função do enxerto pós-transplante¹⁶.

Koeppel TA, et al., 1996, infundiram N-acetilcisteína no doador, antes da perfusão do enxerto pela solução de preservação e, no receptor, após a reperfusão do enxerto. Seus resultados demonstraram o benefício deste tratamento com a menor incidência de falência precoce de enxerto secundária às manifestações microvasculares¹⁷.

A falência hepática primária ocorre em 5% a 10% dos transplantes, tem alta mortalidade e pode estar associada às injúrias hepáticas sofridas durante a isquemia fria¹⁰. Greig PD, et al., 1989, usaram a prostaglandina E1, tentando evitar um novo transplante em pacientes com essa grave complicação. Devlin J, et al., 1997, atribuíram à N-acetilcisteína o resgate de 3 pacientes com disfunção hepática primária do enxerto¹⁸⁻²⁰.

Kawachi S, et al., 1997, Neumann UP, et al., 1998, e Giostra E, et al., 1997, buscaram melhores resultados após o transplante hepático com a utilização de prostaglandina E1, infundida após a reperfusão do enxerto. Taut FJH, et al., 1999, e Steib A, et al., 1998, infundiram N-acetilcisteína, imediatamente, após a reperfusão, e mantiveram a infusão por até 24 horas após o transplante, buscando melhores resultados²¹⁻²⁵.

Morioka D, et al., 2003, associou a infusão de prostaglandina E1 para obter melhores resultados, quando são utilizados enxertos esteatóticos em seu modelo experimental²⁶.

Weigand MA, et al., 2001, teve um incremento nos níveis de glutathion hepático, utilizando N-acetilcisteína no momento da reperfusão do enxerto²⁷.

A utilização combinada de prostaglandina E1 e N-acetilcisteína em pacientes pediátricos, imediatamente após a reperfusão do enxerto hepático, foi proposta por Bucavalas JC, et al., 2001. Seu estudo sugeriu melhores resultados com a associação, mas sem significância estatística²⁸.

1.2 Fisiopatologia e bioquímica

Como já foi visto, estima-se que a temperatura ideal para a preservação dos órgãos seja de 0°C a 4°C, mas essa temperatura, por outro lado, pode causar injúrias de ordem física e bioquímica.

Um dos problemas que ocorre durante a fase de isquemia fria hepática é a indução da adesão plaquetária às células endoteliais dos sinusóides hepáticos e, a agregação e ativação leucocitária com conseqüente liberação de histamina, levando à falência hepática aguda pós-transplante ou falência primária do enxerto no momento da reperfusão. Isso ocorre porque, na reperfusão hepática, as plaquetas do receptor são ativadas ao serem expostas a baixas temperaturas, situação em que se encontra o enxerto enquanto preservado⁹.

O mecanismo que leva a adesão plaquetária aos sinusóides hepáticos é complexo. Ele envolve alterações metabólicas durante a fase de isquemia fria, ainda não esclarecidas totalmente. Sabe-se, entretanto, que o número de plaquetas ativadas depende desse tempo de isquemia fria, sendo diretamente proporcional^{4,7,8}.

Upadhy GA, et. al, 2002, cita fatores que levam ao efeito deletério da reperfusão hepática com ativação da adesão plaquetária. São eles a secreção de Matrix Metaloproteinases (MMPs) pelo endotélio sinusoidal e a ativação dos receptores plaquetários mediada pelo fator de von Willebrand⁴.

A isquemia induz a secreção de MMPs pelas células endoteliais dos sinusóides hepáticos. Essas enzimas são importantes mediadores da injúria hepática durante a isquemia fria e apresentam maior atividade quando à temperatura de 37°C. Essa atividade cai conforme ocorra queda da temperatura e atinge seu ponto mínimo quando se encontra entre 0 e 4°C^{7,44,45}.

Há substâncias com capacidade de inibir a atividade das MMPs produzidas pelo endotélio sinusoidal, entre elas o glutathiona, o lactobionato e a histadina. Tais substâncias estão presentes em algumas das principais soluções e preservação⁸. A glutathiona é encontrada no hepatócito, em sua forma reduzida, o que previne a lesão celular pela ação de radicais livres causadores de fenômenos oxidativos tóxicos. À medida que ela é utilizada para neutralizar a ação dos radicais livres, seus níveis diminuem nos hepatócitos que ficam mais vulneráveis à ação oxidativa³².

A isquemia causa déficit de energia nas células devido à falta de oxigênio, o que leva à ocorrência de mecanismo anaeróbio para geração de energia. A glicólise é a geração de energia a partir da quebra da glicose e pode dar-se pelos mecanismos aeróbio ou anaeróbio. Quando a glicólise ocorre pelo metabolismo aeróbio, há um rendimento maior em relação à produção de energia, chegando-se a 24 adenosina-tri-fosfato (ATP) por molécula de glicose. Assim sendo, o Ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs e a cadeia

respiratória (fosforilação oxidativa) correspondem à seqüência natural do metabolismo da glicose nos seres humanos.

A glicose é transformada em duas moléculas de piruvato no citoplasma da célula. As moléculas de piruvato, em contato com o oxigênio, reagem formando gás carbônico e liberando elétrons. O piruvato entra na mitocôndria e é utilizado para produzir o acetil-CoA (coenzima A) por ação da enzima desidrogenase, iniciando o ciclo de Krebs. Com isso, ocorre a transformação de NADH e FAD (moléculas transportadoras de elétrons) em NADH+H e FAD+H²⁹.

Nesse momento, com a presença de oxigênio, iniciar-se-ia a fosforilação oxidativa e, então, chegar-se-ia ao número de 24 ATPs. Pelo metabolismo anaeróbio, acumulam-se apenas 4 ATPs por molécula de glicose e formação de lactato.

Células do endotélio sinusoidal e epitélio biliar são mais sensíveis à anóxia. O glicogênio armazenado pelo hepatócito parece lhes conferir uma resistência maior à isquemia³. É a partir do glicogênio, em uma seqüência de reações complexas que não são as inversas a da glicogênese (acúmulo de glicogênio a partir da glicose) que se dá a glicogenólise (liberação de glicose a partir quebra do glicogênio). O AMP cíclico ativa as enzimas fosforilase quinase-b e fosforilase quinase-a que, por sua vez, retiram uma molécula de glicose do glicogênio na forma de glicose-1-fosfato, liberando-a para a glicólise aeróbia ou anaeróbia; no caso da fase de isquemia fria, anaeróbia³⁰.

Com o decorrer da isquemia fria, tais alterações físicas e bioquímicas levam aos acontecimentos de injúrias hepáticas que podem ser inúmeras, entre elas, o edema intersticial, a degeneração hidrópica celular, a degeneração gordurosa, a lesão endotelial, o infiltrado inflamatório e a necrose³⁷. Alguns autores demonstram que a degeneração hidrópica é a injúria hepática mais comum com ocorrência, imediatamente, após a fase de

isquemia fria, seguida pelo infiltrado inflamatório, pela degeneração gordurosa e pela necrose focal³¹.

A degeneração hidrópica celular é o acúmulo de água no interior da célula devido à lesão na membrana plasmática e às alterações no funcionamento da bomba de sódio e potássio. Ocorre um acúmulo de sódio no interior da célula e, por osmose, a água entra na célula, levando à tumefação celular por excesso de água. Já o infiltrado inflamatório é a ação dos leucócitos sobre componentes celulares liberados durante a fase de anóxia por exudação celular, em geral, um misto de leucócitos polimorfos e mononucleares; eles são os responsáveis pela fagocitose dos componentes celulares degradados^{29,30}.

A degeneração gordurosa ocorre quando as organelas citoplasmáticas se desestruturam e há um infiltrado de gordura formando um vacúolo lipídico no interior da célula. A necrose celular, por sua vez, pode ser ocasionada por diferentes tipos de agressão tecidual: física, química, bioquímica, irradiação ou, neste caso, a isquemia^{29,30}.

1.3 N-acetilcisteína

A N-acetilcisteína é uma substância utilizada em larga escala na área da pneumologia devido a seu efeito mucolítico, fluidificante das secreções broncopulmonares, e expectorante. Atualmente, ela tem servido como antídoto para a superdosagem de acetaminofeno. O acetaminofeno, quando em superdosagem, causa uma saturação no processo de desintoxicação e uma depleção da glutatona hepática; se não houver recuperação mediante aporte de precursores exógenos de glutatona, o metabólito tóxico do

acetaminofeno em excesso será conduzido a ligar-se, covalentemente, às moléculas teciduais, comprometendo a vitalidade do hepatócito até a necrose.

A N-acetilcisteína é uma substância antioxidante e, como precursora da cisteína, é doadora de grupos sulfídricos que protegem o hepatócito da necrose com a recuperação dos níveis de glutatona hepático, por meio de uma neossíntese intracelular de glutatião reduzido.

Com o aumento da glutatona no fígado, temos maior proteção contra os efeitos nocivos dos radicais livres, além de um incremento na inibição da secreção das MMPs pelo endotélio sinusoidal hepático e, conseqüentemente, uma redução da injúria hepática durante a isquemia fria e a reperfusão.

De acordo com o fabricante do Flui mucil®, a dose para proteção hepática é de 1,5 ml/Kg de solução de N-acetilcisteína 20% quando usada como antídoto hepatoprotetor.

1.4 Prostaglandina E

As prostaglandinas A, B, E, I e F têm um efeito vasodilatador e antiagregante plaquetário notável. A ação vasodilatadora poderá favorecer a permeabilidade sinusoidal hepática e, dessa maneira, minimizar o colapso sinusoidal intra-hepático durante a isquemia fria; já a inibição à adesão plaquetária evitaria a lesão por reperfusão mediada pelas plaquetas do receptor^{13,34}.

A prostaglandina E demonstra grande importância na inibição da indução leucocitária e de macrófagos (Kupffer cells), desencadeando diminuição da liberação de fator citotóxico^{15,35}. Uma ação relevante da prostaglandina E1 é a indução da atividade do

AMP-cíclico, que leva ao processo de glicólise e à conseqüente disponibilização de nucleotídeos de adenosina (ADP e ATP). Em função disso, têm-se a diminuição do nível de lesão da membrana plasmática hepatocitária e menor injúria hepática¹¹.

A Prostaglandina E1 é um dentre uma família de lípidos ácidos de ocorrência natural com vários efeitos farmacológicos. A vasodilatação e a inibição da agregação plaquetária estão entre os mais notáveis dentre esses resultados. O metabolismo da droga é muito rápido: 80% da prostaglandina E1 circulante pode ser metabolizada em uma única passagem pelos pulmões.

De acordo com a orientação do fabricante — Pharmacia & Upjohn N.V./ S.A., Rijksweg 12, 2870 Puurs, Bélgica —, a infusão da prostaglandina E1 deve ser feita, preferencialmente, em veia de grosso calibre, sendo, em geral, iniciada na dose de 0,05 a 0,1 µg/Kg/min. Quando a resposta a 0,1 µg/Kg/min for inadequada, a dosagem poderá ser, cuidadosamente, aumentada até 0,4 µg/Kg/min. Os metabólitos são excretados, principalmente, pelos rins em um período de, no máximo, 24 horas após a administração da droga. A solução estéril Prostin VR™ deve ser diluída, diretamente, à solução de infusão intravenosa, evitando-se o contato com os recipientes de plástico. Além disso, recomenda-se que sejam descartadas soluções com mais de 24 horas de preparação.

2 JUSTIFICATIVA

- Considerando o aumento do número de candidatos ao transplante hepático e a escassez de doadores falecidos;
 - considerando a necessidade de utilização de enxertos hepáticos sub-ótimos na tentativa de otimizar o número de doadores e reduzir a mortalidade dos pacientes em lista de espera;
 - considerando que não existe ainda uma solução de preservação de órgão ideal;
 - considerando que o acréscimo de antioxidante ou antiinflamatório e antiagregante plaquetário à solução de preservação padrão poderia contribuir na redução da injúria do enxerto hepático durante o período de isquemia fria;
- julgou-se adequada a realização deste estudo na tentativa de obter elementos que venham a auxiliar alguns quesitos supracitados.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da Prostaglandina E1 e da N-acetilcisteína quando associadas à solução de Belzer na preservação do enxerto hepático durante a fase de isquemia fria.

3.2 Objetivos específicos

- Examinar a condição de (des)igualdade do enxerto preservado em solução de Belzer acrescida de diferentes substâncias e o tempo de preservação, baseando-se no nível das transaminases seriadas (TGO e TGP).
- Determinar quais são, dentre as estudadas, as manifestações mais precoces capazes de evidenciar a lesão hepática durante a isquemia fria.

- Verificar qual a injúria hepática mais prevalente durante a fase de isquemia fria prolongada, ao estudo anatomopatológico.
- Comparar a solução de Belzer utilizada isoladamente e acrescida de Prostaglandina E1 e N-acetilcisteína com relação às injúrias hepáticas ocorridas durante a isquemia fria, em diferentes tempos, ao estudo anatomopatológico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho – protocolo de pesquisa N° 03/472 – foi aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA (GPPG). Seu desenvolvimento ocorreu no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), junto ao Serviço de Transplante Hepático Pediátrico e Serviço de Gastroenterologia Pediátrica. A execução deu-se no Laboratório de Cirurgia Experimental do HCPA e Centro de Pesquisa em Gastroenterologia Pediátrica do HCPA.

4.1 Animais

Em função da experiência e estrutura do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, associadas ao baixo custo e à facilidade de obtenção e, por se tratar de um modelo experimental consagrado, optou-se por utilizar ratos no desenvolvimento deste estudo. Foram usados, para todos os experimentos, ratos do sexo masculino, da raça Wistar, com peso de 250 a 350 gramas e idade entre 7 e 9 semanas.

Os animais foram provenientes de laboratório de pesquisa da Universidade do Rio Grande do Sul (UFRGS). Trinta e seis deles foram doadores de órgão e sacrificados durante

o procedimento cirúrgico, por exanguinação. Os animais foram mantidos, três a três, em gaiolas, com ração padronizada pela instituição e água *ad libitum*, durante 18 horas antes do experimento.

4.2 Cálculo da amostra

Foi considerado um nível de significância de 5% e um poder estatístico de 80%.

Esperava-se que, ao final de 36 horas de preservação do enxerto, os fígados que fossem preservados com solução de Belzer exclusivamente apresentassem lesões celulares detectadas por anatomia patológica em 100% dos casos. Nos grupos preservados com solução de preservação acrescida de prostaglandina E1 e N-acetilcisteína, esperava-se encontrar um número menor de alterações anatomopatológicas, e o cálculo baseou-se em 50%³⁹.

Considerando esses dados, encontrou-se a necessidade de formar 3 grupos com 12 animais cada um deles.

O programa utilizado para o cálculo das amostras foi o WinPepi (web – versão fev/06).

4.3 Grupos

Criaram-se 3 grupos, sendo necessários 12 ratos em cada um, ou seja, 36 animais.

Os grupos foram numerados de 1 a 3, elegendo-se o grupo 1 como o de controle.

Grupo 1 – os fígados dos animais foram perfundidos e preservados com solução de Belzer.

Grupo 2 – os fígados dos animais foram perfundidos e preservados com solução de Belzer acrescida de prostaglandina E1.

Grupo 3 – os fígados dos animais foram perfundidos e preservados com solução de Belzer acrescida de N-acetilcisteína.

Os animais dos três grupos foram operados e os fígados perfundidos e preservados durante 36 horas conforme distribuição acima.

Realizou-se biópsia hepática nos tempos 12h, 24h e 36h em cada um dos fígados dos 3 grupos. Os resultados foram avaliados estatisticamente pelo Teste Exato de Fisher.

No mesmo momento das biópsias, efetuou-se, também, coleta da solução de preservação onde os fígados estavam submersos para dosagem enzimática de TGO e TGP. Os resultados foram avaliados, estatisticamente, por meio da Análise de Variâncias para Medidas Repetidas (ANOVA).

4.4 Experimento

4.4.1 Prostaglandina E1 – Alprostadil (Prostin VR TM)

As ampolas utilizadas foram as de solução estéril Prostin VR TM 500 (0,5mg/ml). Diluiu-se uma ampola de 500mcg de Prostin em 1000ml de solução de Belzer, ficando a solução de preservação com uma concentração de 0,5mcg/ml.

4.4.2 N-acetilcisteína – Fluimucil®

Foram usadas ampolas estéreis de 3ml de N-acetilcisteína (Fluimucil®) a 10%. Cada ml de solução injetável a 10 % contém 100mg de N-acetil-L-cisteína. Dissolveu-se uma ampola com 300mg de N-acetil-L-cisteína em 1000ml de solução de Belzer, ficando a solução de preservação com uma concentração de 0,3mg/ml.

4.4.3 Solução de Belzer

Empregaram-se frascos de 1 litro de solução de Belzer estéril da marca Viaspan®.

4.4.4 Cirurgia

Na execução da hepatectomia e perfusão do enxerto, utilizou-se a mesma técnica consagrada pelos serviços de transplantes hepáticos e descrita como hepatectomia do doador.



Figura 1 – Material cirúrgico

Todos os animais foram anestesiados e operados pela mesma equipe, e o cirurgião foi o mesmo nos 36 procedimentos.

Cada animal foi anestesiado com a infusão intraperitoneal de Xilasina 2% (uso veterinário) e Quetamina 0,116g/ml (uso veterinário). A ausência de resposta ao pinçar-se a cauda do animal foi considerada anestesia adequada.



Figura 2 – Anestesia

O animal foi fixado à mesa cirúrgica (prancha de cortiça) por meio de amarras em decúbito dorsal.



Figura 3 – Cirurgia

Posteriormente, realizou-se assepsia com iodoform aquoso® 2%. Executou-se, então, uma incisão cirúrgica abdominal mediana e colocaram-se afastadores criados para o experimento.



Figura 4 – Laparotomia mediana

A seguir, ocorreu a dissecação dos ligamentos hepáticos. Foi dissecada a artéria aorta, cranialmente, ao tronco celiaco. Foram dissecadas a veia porta e a artéria aorta, caudalmente, ao tronco celiaco. Foi clampeada a artéria aorta supracelíaca com uma pinça hemostática. Uma cânula de perfusão do tipo abocath, n°18, foi introduzida na veia porta, e outra, na artéria aorta infracelíaca. Após a canulação, iniciou-se a perfusão hepática com a solução cabível a cada grupo, através da veia porta e da artéria aorta, simultaneamente, em uma quantidade de 80ml de solução para cada animal, sob pressão atmosférica, sem utilização de seringas.

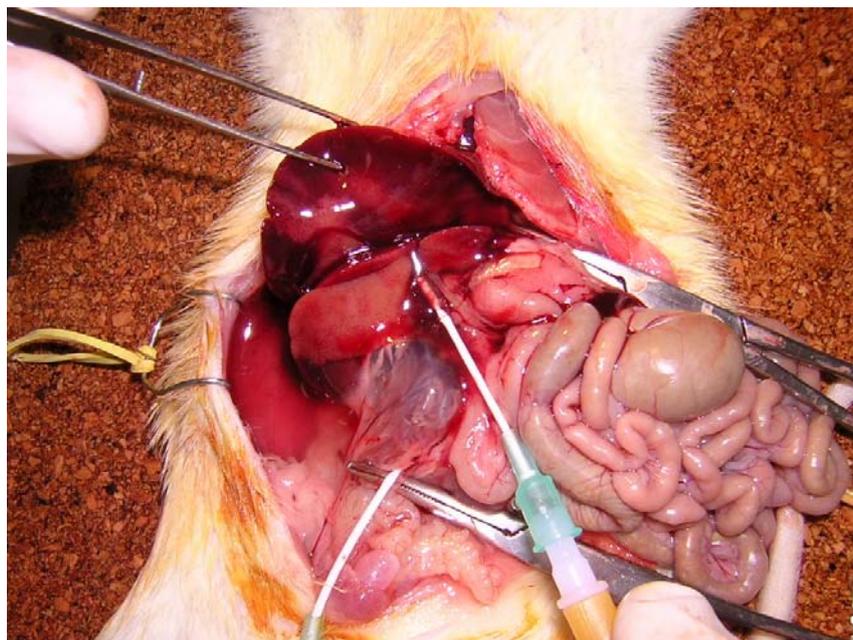


Figura 5 – Clampeamento da artéria aorta supraceliaca e perfusão através da artéria aorta e da veia porta

O grupo 1, considerado controle, foi perfundido através da veia porta e da artéria aorta já canuladas, com o volume de 80ml da solução de Belzer.

O grupo 2 foi perfundido da mesma maneira, com 80 ml de solução de preservação; porém acrescentou-se à solução de Belzer uma solução estéril de Prostaglandina E1 — Alprostadil (Prostin VR TM0,5mg) na dose de 1 ml/l.

No grupo 3 a perfusão ocorreu também desta forma, com 80 ml de solução de preservação, mas, com acréscimo de N-acetilcisteína 10% à solução de Belzer, em uma dose de 3ml/l.

A mesma solução de perfusão foi utilizada para a preservação do enxerto, durante a isquemia fria à 4°C.

Simultaneamente ao início da perfusão, ocorreu a secção completa da veia cava inferior supra-hepática e escoamento do fígado até que se tivesse saída de solução de preservação límpida pela veia seccionada.

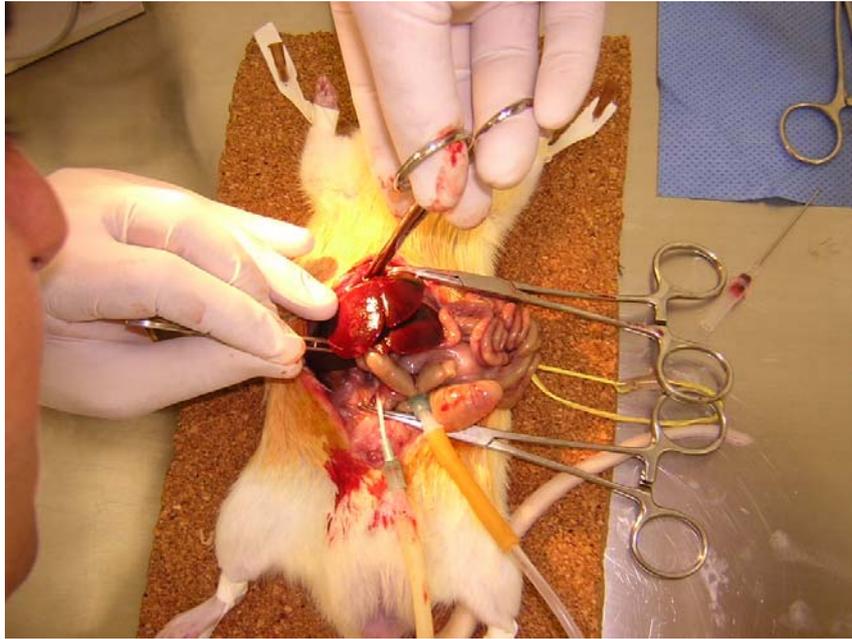


Figura 6 – Secção da veia cava inferior supra-hepática

O fígado, então, foi completamente liberado e retirado da cavidade abdominal. Ele foi armazenado em um saco plástico contendo a mesma solução de preservação com a qual foi perfundido. Ficou submerso em 80ml dessa solução, em uma caixa de isolamento térmico fechada, com gelo, durante 36 horas e mantido na temperatura entre 0°C e 4°C.



Figura 7 – Preservação do enxerto submerso em solução

4.4.5 Acompanhamento dos enxertos

Os enxertos foram acompanhados durante 36 horas.

A preservação dos enxertos hepáticos também se deu da mesma maneira que a utilizada em seres humanos. Os enxertos foram submersos na solução de preservação com a qual foram perfundidos e mantidos em caixas de isolamento térmico com gelo. Essas caixas só eram abertas no momento das biópsias que se deram às 12 horas, 24 horas e 36 horas. O gelo derretido era retirado e colocada nova porção de mesma quantidade às 12h e 24h. Ao final das 36 horas, foi dada por encerrada a parte cirúrgica do experimento.

As biópsias hepáticas foram realizadas ao se completarem 12, 24 e 36 horas de isquemia fria, e o material, imediatamente colocado em formol tamponado 10%, etiquetado e enviado para o laboratório de patologia. Em cada etapa uma amostra de 2ml da solução de preservação era aspirada, colocada em tubo de ensaio etiquetado e encaminhada ao

laboratório de bioquímica. O enxerto era recolocado na caixa com gelo, exceto às 36 horas, final do experimento.

4.4.6 Laboratório de análises clínicas

As amostras de 2ml da solução de preservação foram enviadas ao laboratório de análises clínicas, onde foram dosadas as transaminases (TGO, TGP). Foi realizada, então, a dosagem absoluta das enzimas hepáticas a partir dos aspirados das soluções de preservação coletadas nos tempos de 12, 24 e 36 horas de todas as amostras, conforme tabela 3.

4.4.7 Laboratório de patologia

Foram executadas biópsias hepáticas nos tempos 12 e 24 horas e enviadas ao laboratório de patologia para estudo anatomopatológico. Ao final das 36 horas, o fígado foi encaminhado para tal análise.

Os fragmentos das biópsias e as peças foram preservados em formol tamponado 10%.

Os fragmentos das biópsias e o próprio enxerto foram dispostos em blocos de parafina, cortados e colocados em lâminas.

As lâminas foram coradas pelo método hematoxilina-eosina.

O patologista, de reconhecida experiência em estudo hepático, desconhecia o tipo de solução de preservação que havia sido utilizado na cirurgia (Solução de Belzer, Solução de Belzer + PGE, Solução de Belzer + NAC) e ignorava, ainda, o tempo da biópsia a ser analisada (12h, 24h, 36h) nas lâminas que examinava (cegamento).

4.5 Análise Estatística

As variáveis numéricas – referentes aos valores absolutos de TGO e TGP – foram expressas em média e desvio padrão. As médias calculadas foram avaliadas, estatisticamente, por meio da Análise de Variâncias para Medidas Repetidas (ANOVA)^{39,41}.

As variáveis categóricas – referente às lâminas das biópsias hepáticas – foram analisadas e classificadas por meio categórico semiquantitativo (leve, moderado e severo), em relação à presença de edema intersticial portal, degeneração hidrópica, degeneração gordurosa, lesão endotelial, infiltrado inflamatório lobular, infiltrado inflamatório portal e necrose, conforme apêndices A e B. Realizou-se biópsia hepática nos tempos 12h, 24h e 36h em cada um dos fígados dos 3 grupos. Os resultados foram avaliados estatisticamente pelo Teste Exato de Fisher e Regressão Logística^{39,41}.

O programa utilizado para realizar a análise estatística foi o Statistical Package for the Social Sciences 14.0 for Windows (SPSS 14.0).

4.6 Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA (GPPG). Seu desenvolvimento ocorreu no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) – protocolo de pesquisa N° 03/472. O GPPG baseia-se na legislação vigente no Brasil, Lei 6.638 (Diário Oficial da União – 08/05/79) que estabelece normas para práticas didático-

científicas da vivisseção de animais e regulamenta o registro de Biotérios e Centros de Experimentação⁴⁰.

Respeitando ainda o Decreto Lei 64.704 de 17/06/69 (Capítulo II, Art. 2º, itens “c” e “d”), teve-se a supervisão da médica veterinária dr.^a Roseli de Oliveira Möllerker, responsável técnica pelo Centro de Experimentação Animal do HCPA.

5 RESULTADOS

Tivemos uma perda em cada grupo. O grupo 1, perfundido pela solução de Belzer, teve o rato de número 12 excluído por dificuldades técnicas na canulação da artéria aorta e veia porta, não possibilitando a perfusão. O grupo 2, perfundido pela solução com PGE, teve o rato de número 2 eliminado, pois ocorreu ruptura da artéria aorta e perfusão exclusiva pela veia porta. O grupo 3, perfundido pela solução com NAC, teve o rato de número 12 rejeitado por dificuldade técnica durante a perfusão. Dessa forma, cada um dos três grupos foi analisado com 11 animais.

5.1 Grupos “*versus*” Tempo em relação à dosagem enzimática de TGO e TGP

Na comparação dos três grupos com relação à dosagem enzimática de TGO e o tempo de isquemia fria, foram obtidos resultados que a seguir se descrevem.

A média das dosagens de TGO em 12 horas foi de 137mg/dl para o Grupo 1; de 140mg/dl para o grupo 2 e de 154mg/dl para o grupo 3.

A média das dosagens de TGO em 24 horas foi de 378mg/dl para o Grupo 1; de 366mg/dl para o grupo 2 e de 326mg/dl para o grupo 3.

A média das dosagens de TGO em 36 horas foi de 651mg/dl para o Grupo 1; de 635mg/dl para o grupo 2 e de 506mg/dl para o grupo 3.

O gráfico a seguir ilustra esses resultados.

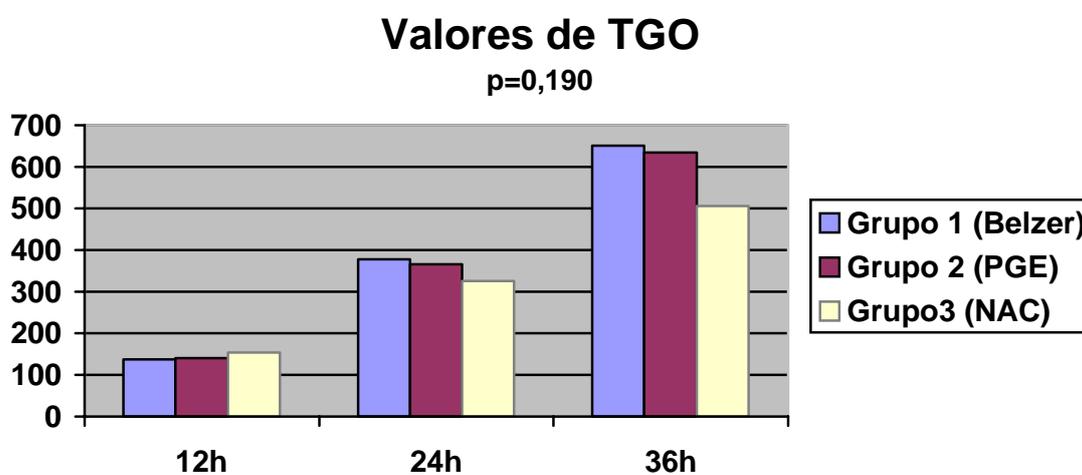


Gráfico 1 – Valores de TGO

Os resultados obtidos na comparação dos três grupos com relação à dosagem enzimática de TGP e o tempo de isquemia fria são descritos a seguir.

A média das dosagens de TGP em 12 horas foi, para o Grupo um, 138mg/dl; para o grupo dois, 134mg/dl e, para o grupo três, 172g/dl.

A média das dosagens de TGP em 24 horas foi, para o Grupo um, 413mg/dl; para o grupo dois, 375mg/dl e, para o grupo três, 374mg/dl.

A média das dosagens de TGP em 36 horas foi, para o Grupo um, 712mg/dl; para o grupo dois, 663mg/dl e, para o grupo três, 572mg/dl.

O gráfico a seguir elucidada essa análise.

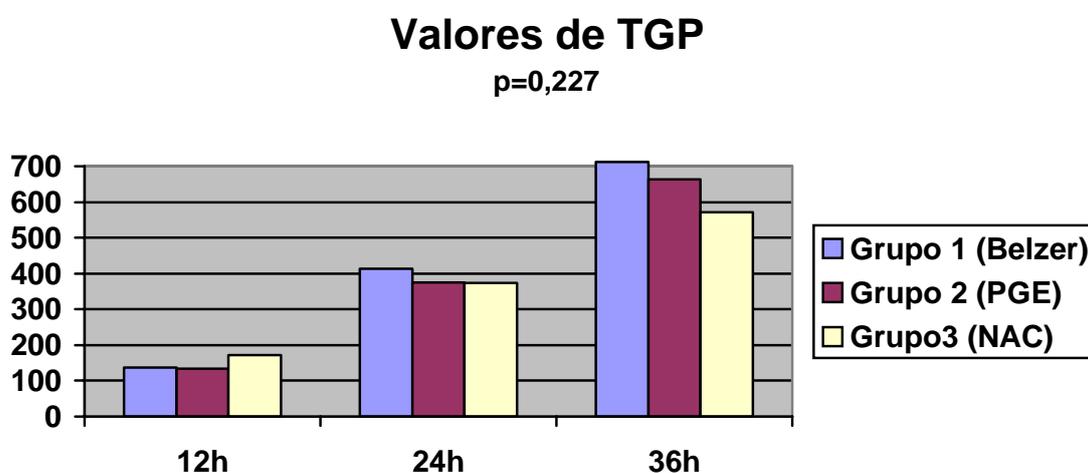


Gráfico 2 – Valores de TGP

Os resultados foram analisados, estatisticamente, por meio da Análise de Variâncias para Medidas Repetidas (ANOVA).

Estatisticamente, não há diferença significativa entre os 3 grupos (Belzer, PGE e NAC). O comportamento é semelhante entre os grupos com $p=0,190$ para a dosagem de TGO e $p=0,227$ para dosagem de TGP.

5.2 Grupos comparados isoladamente em relação ao tempo de isquemia fria e valores de TGO e TGP

Quando os 3 grupos foram analisados isoladamente, houve diferença estatisticamente significativa em todos eles, com relação às dosagens enzimáticas e ao tempo de preservação com um $p < 0,0001$ para dosagens de TGO e TGP entre os tempos 12h, 24h e 36h, conforme está apresentado nos gráficos a seguir.

TGO e TGP no grupo 1 (Belzer)
 $p < 0,0001$

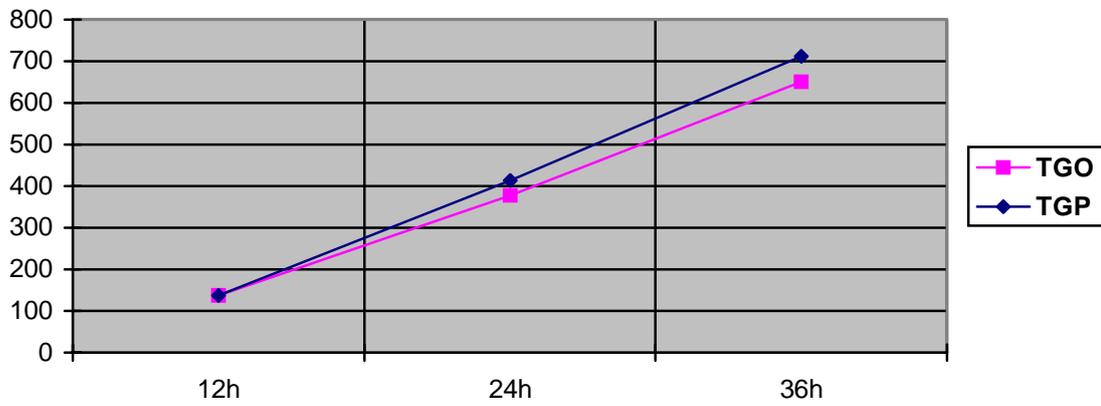


Gráfico 3 – TGO e TGP no grupo 1 (Belzer)

TGO e TGP no grupo 2 (PGE)
 $p < 0,0001$

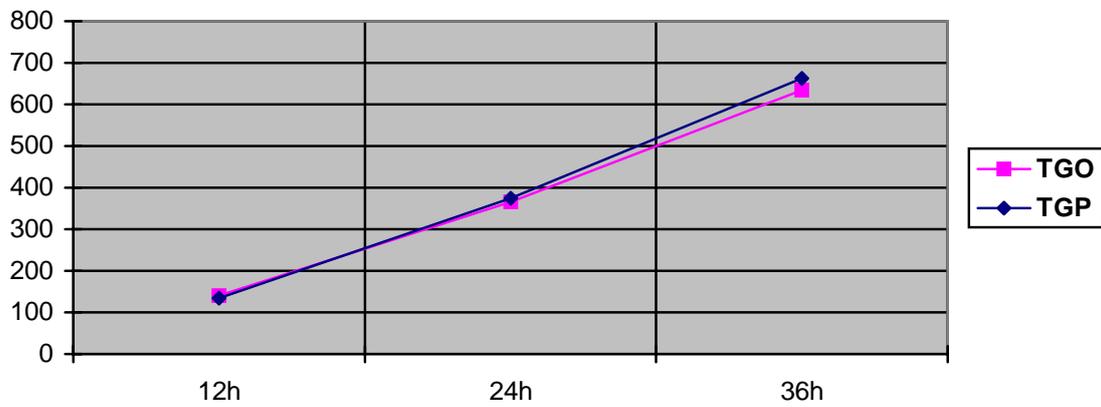


Gráfico 4 – TGO e TGP no grupo 2 (PGE)

TGO e TGP no grupo 3 (NAC)
 $p < 0,0001$

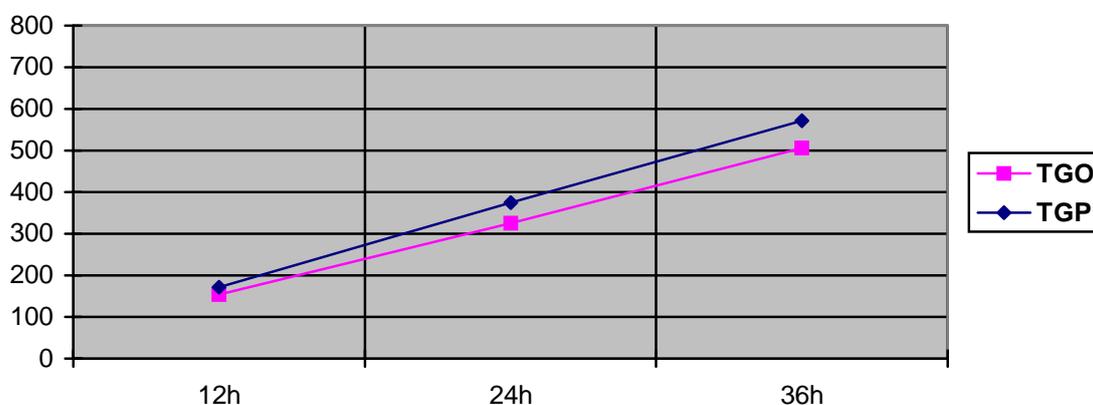


Gráfico 5 – TGO e TGP no grupo 3 (NAC)

5.3 Grupos “versus” biópsias hepáticas “versus” tempo de preservação

Foram analisadas as lâminas referentes a cada biópsia realizada nos grupos 1, 2 e 3, nos tempos 12, 24 e 36 horas.

Os aspectos examinados foram o edema intersticial, a degeneração hidrópica celular, a degeneração gordurosa, a lesão endotelial, o infiltrado inflamatório lobular, o infiltrado inflamatório portal e a necrose. Eles foram classificados em quatro níveis: ausente, leve, moderado e severo.

Todos as alterações celulares, quando ocorreram, foram classificadas como leves. Portanto, todos os resultados descritos tratam de comparação entre alterações leves ou ausentes. Não ocorreram casos de alterações moderadas ou severas durante as 36h de preservação sob isquemia fria.

Para analisar os resultados das biópsias hepáticas, foi utilizado o Teste Exato de Fisher.

5.3.1 Edema intersticial

Não ocorreram casos de edema intersticial em qualquer dos grupos, na análise das lâminas das biópsias hepáticas, nos tempos de 12, 24 e 36 horas de preservação do enxerto.

5.3.2 Degeneração hidrópica

Após 12 horas de preservação dos enxertos, ocorreram 2 casos de degeneração hidrópica celular no grupo 2 e 1 caso no grupo 3 ($p=0,756$).

No tempo de 24 horas de preservação, ocorreu 1 caso de degeneração hidrópica celular no grupo 2 e houve a incidência de 2 casos no grupo 3 ($p=0,756$).

Ao final de 36 horas, verificou-se a ocorrência de 1 caso de degeneração hidrópica celular no grupo 1, de 6 casos no grupo 2 e de 2 casos no grupo 3 ($p=0,085$), o que se pode observar no gráfico a seguir.

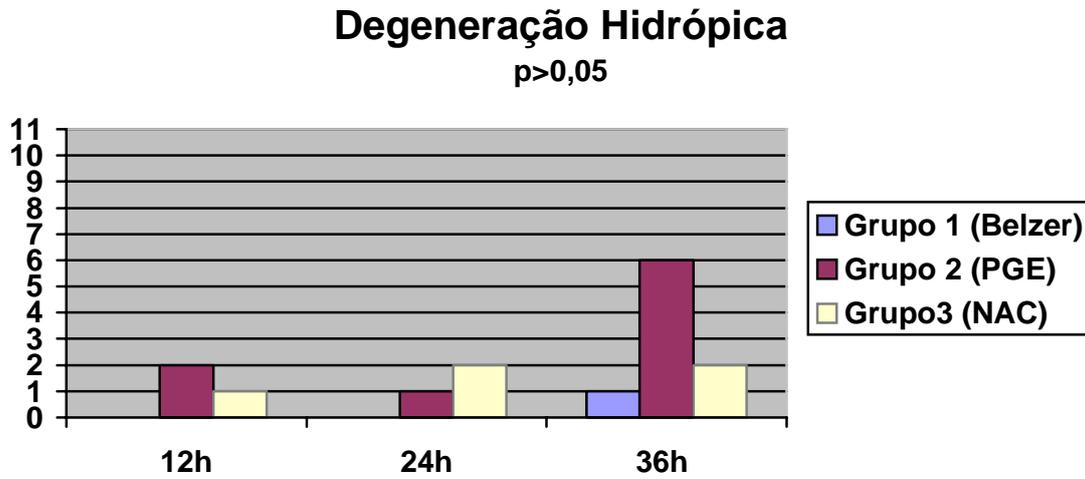


Gráfico 6 – Degeneração Hidrópica (nº de animais “versus” tempo)

5.3.3 Degeneração gordurosa

Não ocorreram casos de degeneração gordurosa após 12 horas de preservação dos enxertos hepáticos.

Com 24 horas de preservação, apareceu 1 caso de degeneração gordurosa no grupo 3 ($p=1,0$).

Ao final das 36 horas, havia acontecido 1 caso de degeneração gordurosa no grupo 3 ($p=1,0$).

5.3.4 Lesão endotelial

Não ocorreram casos de lesão endotelial nos grupos estudados, durante a preservação dos enxertos hepáticos.

5.3.5 Infiltrado inflamatório lobular

Com 12 horas de preservação, ocorreu 1 caso de infiltrado inflamatório lobular no grupo 1 e houve a incidência de 2 casos no grupo 3 ($p=0,756$).

Após 24 horas de preservação, verificaram-se 2 casos de infiltrado inflamatório lobular no grupo 1 ($p=0,313$).

Ao se chegar às 36 horas de preservação dos enxertos, constatou-se a ocorrência de 1 caso de infiltrado inflamatório lobular no grupo 2 ($p=1,0$).

5.3.6 Infiltrado inflamatório portal

Após 12 horas de preservação dos enxertos, ocorreram 6 casos de infiltrado inflamatório portal no grupo um, 2 casos no grupo 2 e 6 casos no grupo 3 ($p=0,168$).

Com 24 horas de preservação, constatou-se a ocorrência de 7 casos de infiltrado inflamatório portal no grupo 1, de 5 casos no grupo 2 e de 5 casos no grupo 3 ($p=0,746$).

Após 36 horas, verificaram-se 7 casos de infiltrado inflamatório portal no grupo 1, 2 casos no grupo 2 e 8 casos no grupo 3 ($p=0,029$). Obteve-se, nesta avaliação, diferença estatisticamente significativa favorável ao grupo 2 em relação aos grupos 1 e 3.

Demonstra-se isso no próximo gráfico.

Infiltrado Inflamatório Portal

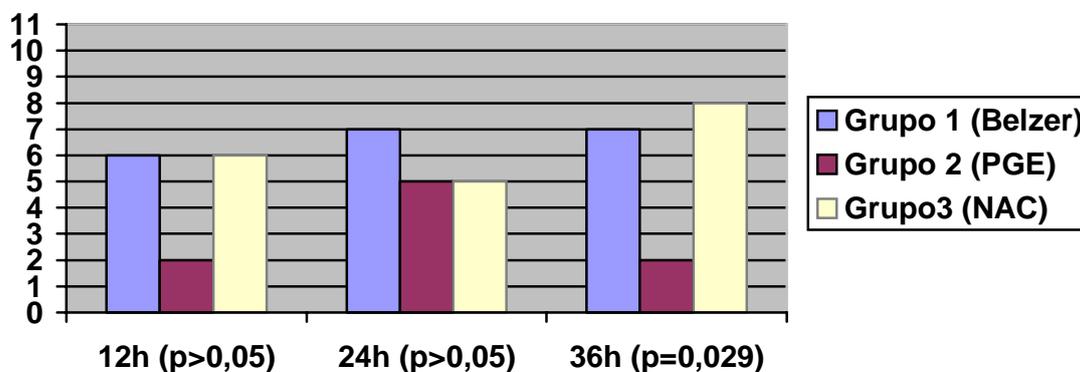


Gráfico 7 – Infiltrado Inflamatório Portal (nº de animais “versus” tempo)

5.3.7 Necrose

Com 12 horas de preservação dos enxertos hepáticos, não ocorreram casos de necrose.

Após 24 horas de preservação, constatou-se 1 caso de necrose no grupo 1 (p=1,0).

Não se verificaram casos de necrose após 36 horas de preservação.

5.4 Grupos “versus” biópsias hepáticas

Com base nos resultados anteriores e objetivando a comparação entre os grupos, sem levar em conta o critério tempo (apenas comparando números de alterações celulares totais em cada grupo, durante as 36h de preservação), realizou-se uma nova análise

estatística, agora do tipo regressão logística. A seguir, expõem-se esses resultados obtidos a partir da regressão logística.

5.4.1 Edema intersticial

O edema intersticial não ocorreu em qualquer dos grupos.

5.4.2 Degeneração hidrópica

A degeneração hidrópica celular ocorreu nas seguintes proporções: no grupo perfundido por solução de Belzer, 1; no grupo perfundido por PGE, 7 e, no grupo perfundido por NAC, 4 ($p=0,036$). Obtém-se resultado estatisticamente significativo quando se comparam os grupos 1 e 3 ao grupo 2. Este último foi o de pior resultado conforme demonstração abaixo.

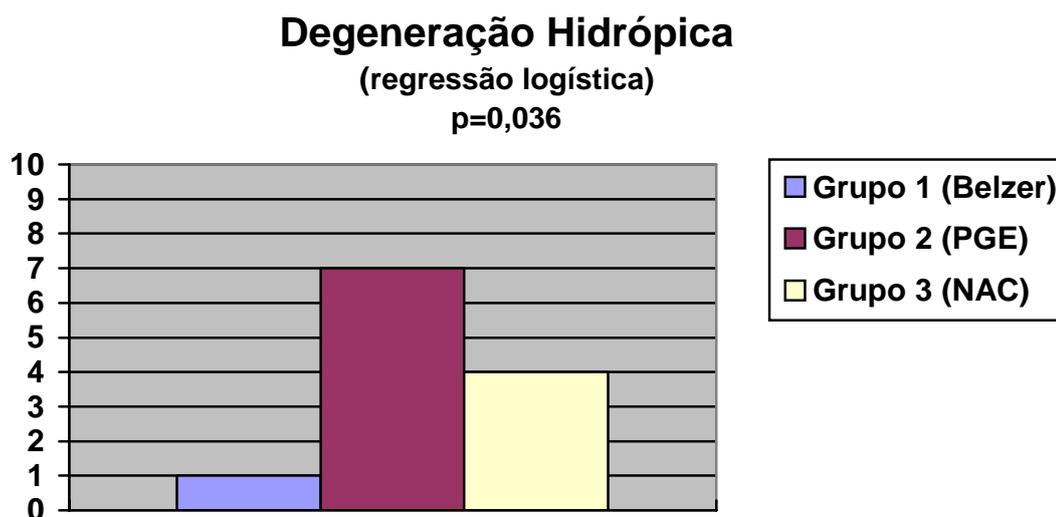


Gráfico 8 – Degeneração Hidrópica (regressão logística)

5.4.3 Degeneração gordurosa

A degeneração gordurosa ocorreu na proporção de zero, nos grupos 1 (Belzer) e 2 (PGE), para 2, no grupo 3 (NAC) - ($p=0,313$).

5.4.4 Lesão endotelial

A lesão endotelial não ocorreu em qualquer dos grupos.

5.4.5 Infiltrado inflamatório lobular

O infiltrado inflamatório lobular ocorreu nas seguintes proporções: no grupo 1 (Belzer), 2; no grupo 2 (PGE), 1 e, no grupo 3 (NAC), 2 ($p=1,0$).

5.4.6 Infiltrado inflamatório portal

O infiltrado inflamatório portal deu-se nas proporções que seguem: no grupo perfundido com solução de Belzer, 10; no grupo perfundido por PGE, 6 e, no grupo perfundido por NAC, 11 ($p=0,029$). Estatisticamente, este aspecto mostrou-se significativo, obtendo o grupo perfundido por PGE melhor resultado, o que é ilustrado no próximo gráfico.

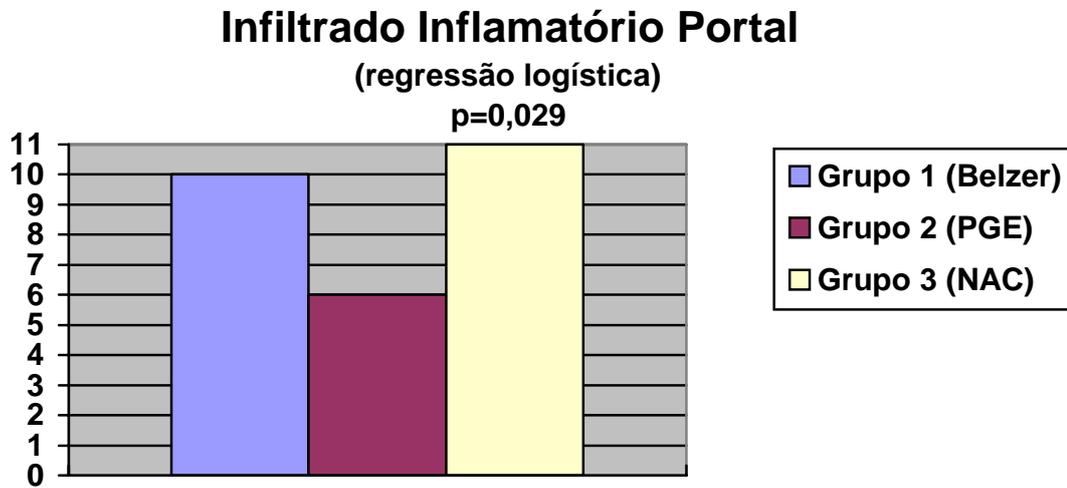


Gráfico 9 – Infiltrado Inflamatório Portal (regressão logística)

5.4.7 Necrose

Houve a ocorrência de 1 caso de necrose no grupo 1 ($p=1,0$).

6 DISCUSSÃO

As soluções de preservação ainda não têm a capacidade de oxigenar o tecido, resultando em sofrimento celular inevitável durante a fase de isquemia fria. O tempo de isquemia é diretamente proporcional ao grau de injúria hepática e é medido pela elevação das aminotransferases, alfa-glutamina-transferase ou análise anatomopatológica do enxerto.

No estudo realizado, ficou demonstrado que o tempo de isquemia eleva os níveis das enzimas hepáticas independentemente da solução de preservação e substâncias utilizadas. Isso mostra que a isquemia fria sempre leva a injúrias celulares, e as soluções de preservação tentam minimizar essas injúrias, mantendo a viabilidade do órgão. À medida que o tempo passa, a lesão celular aumenta, e os grupos de transplante de órgãos buscam a resposta de quanto tempo os órgãos podem ser preservados com sua viabilidade mantida.

Lemasters JJ, et al., 1997, responderam a essa questão, dizendo que 24 horas seria o tempo máximo em que o enxerto hepático poderia ser preservado em solução de Belzer¹². O período de 24 horas de isquemia fria foi estudado também por Silveira HJV, et al., 2003, que obteve resultados satisfatórios quando adicionou prostaglandina E1 à solução de preservação³⁷.

Este estudo buscou a análise dos enxertos por 36 horas, acreditando-se que, quando há a associação de certas substâncias à solução de Belzer – como a prostaglandina E1 ou a N-acetilcisteína –, o tempo de isquemia fria pode se prolongar, mantendo-se a viabilidade do enxerto.

Analisando-se o resultado das amostras de solução de preservação coletadas às 12 horas, 24 horas e 36 horas, foi possível observar que ocorreu diferença entre os 3 grupos com relação às dosagens enzimáticas de TGO e TGP. O grupo perfundido com solução acrescida de N-acetilcisteína, teve melhores resultados durante as 36 horas de preservação, embora sem significância estatística. Este resultado demonstra o possível benefício que pode ser alcançado com o uso de N-acetilcisteína, na preservação hepática, durante a isquemia fria associada à solução de preservação.

Grezzana TJM, et al., 2004, em 34 transplantes hepáticos, realizaram biópsias imediatamente e 2 horas após a reperfusão do enxerto. Em seguida, mediram a quantidade de glutatona e glutatona-peroxidase por grama de tecido hepático nessas biópsias. Desse modo tais autores demonstram que o nível de glutatona diminui e o nível de glutatona-peroxidase aumenta nas duas horas seguintes à reperfusão. Em conclusão, eles referem que a reoxigenação tecidual gera um estresse oxidativo com consumo de glutatona; além disso, sugerem que a utilização de antioxidantes preveniria o dano hepatocelular causado pela reperfusão³².

Weigand MA, et al., 2001, realizaram a análise de 20 enxertos prospectivamente, sendo 10 infundidos com N-acetilcisteína e 10 infundidos com placebo 15 minutos antes e imediatamente após a reperfusão hepática, sendo mantida essa infusão por 4 horas. Seus resultados demonstraram que o grupo infundido com N-acetilcisteína teve dosagens menores de aminotransferases, também, sem significância estatística, porém teve uma

dosagem mais baixa de alfa-glutationa-trasferase com significância estatística, levando à conclusão de que a N-acetilcisteína inibe a elevação da alfa-glutationa-trasferase, que se tem mostrado o mais sensível indicador da injúria hepática após a isquemia²⁷.

Bucavalas JC, et al., 2001, também demonstram benefício com N-acetilcisteína e prostaglandina E1 no transplante pediátrico, porém utilizaram uma combinação da N-acetilcisteína aplicada intravenosa, durante a reperfusão e após 12 horas, mantendo a infusão a cada 12 horas, durante 6 dias. Já a prostaglandina E1 teve sua infusão iniciada após a primeira dose de N-acetilcisteína, sendo mantida sob infusão contínua, durante 6 dias, em um grupo de 12 crianças versus 13 crianças em um grupo controle não tratado. Tiveram melhores resultados no grupo tratado, com relação às dosagens de aminotransferases, trombose da artéria hepática, trombose da veia porta e fistula biliar, contudo sem significância estatística. Em sua conclusão, esses autores sugerem benefício com a utilização das substâncias, mas destacam que seria necessário um número maior de pacientes em outros estudos²⁸.

Koeppel TA, et al., 1996, observaram a microcirculação hepática após a reperfusão mediante injeção de contraste fluorescente e microscopia eletrônica “in vivo” em ratos. Foram avaliados dois grupos, um controle e um tratado com N-acetilcisteína. O grupo tratado teve infusão da substância no animal doador, 30 minutos antes da hepatectomia do doador e, no animal receptor, imediatamente após a reperfusão. A microcirculação hepática foi melhor no território portal, no território centro-lobular e no espaço intermediário, com significância estatística. Esses autores concluíram que a N-acetilcisteína reduz a injúria causada por isquemia e reperfusão hepática, diminuindo a incidência de disfunção primária do enxerto¹⁷.

Regueira FM, et al., 1997, fizeram um estudo retrospectivo comparativo entre 25 transplantes nos quais utilizaram a N-acetilcisteína no doador, uma hora antes da hepatectomia do doador e 37 transplantes em que não foi utilizado qualquer tratamento específico. Esses autores declaram que tiveram menor elevação dos níveis de TGO e TGP no grupo que utilizou a N-acetilcisteína e comentam que o tempo de protrombina foi superior, nos 5 primeiros dias, no grupo tratado. Eles referem ainda não terem ocorrido casos de falência hepática primária nos grupos estudados, mas destacam que 5 pacientes não tratados tiveram disfunção hepática inicial, o que não ocorreu com os pacientes tratados com N-acetilcisteína. Baseados nesses dados, os autores concluem que a N-acetilcisteína pode melhorar a função primária do enxerto hepático³³.

Castro AF, et al., 2002, ao estudarem 48 pacientes transplantados que tiveram o fígado biopsiado imediatamente após a reperusão do transplante hepático, demonstraram que as alterações anatomopatológicas são, em sua grande maioria, leves ou moderadas e localizadas na zona 3 do ácino hepático. Seu estudo evidenciou ainda que, após a isquemia fria, as alterações anatomopatológicas mais encontradas foram degeneração hidrópica celular, infiltrado inflamatório e necrose focal³¹.

Neste trabalho, as biópsias hepáticas buscam a análise da ocorrência de injúrias hepáticas no decorrer do tempo de isquemia fria. Demonstrou-se que todas as alterações anatomopatológicas encontradas nos três grupos, durante as 36 horas de isquemia fria, foram consideradas leves, e as mais comuns foram o infiltrado inflamatório e a degeneração hidrópica celular, o que se assemelha aos resultados apresentados por Castro AF³¹.

Os resultados evidenciaram, ainda, que as alterações enzimáticas são mais precoces do que as alterações anatomopatológicas. Ao serem analisados, comparativamente, os resultados das dosagens enzimáticas após 12 horas de isquemia, observou-se elevação

enzimática em 100% das amostras de solução de preservação; porém a análise das biópsias, após 12 horas de isquemia fria, encontrou alterações em menos de 50% das lâminas. Este dado é esclarecedor do fato de que, mesmo sem haver lesão celular estabelecida, já há sofrimento celular decorrente da anóxia.

O edema intersticial, a degeneração gordurosa, a lesão endotelial, o infiltrado inflamatório lobular e a necrose tiveram ocorrência esporádica e sem nenhuma significância estatística.

Os achados relevantes, neste estudo, referentes às análises anatomopatológicas após a isquemia fria, foram a degeneração hidrópica celular e o infiltrado inflamatório portal, como os resultados de Castro AF³¹.

Os resultados dos grupos 2 (PGE) e 3 (NAC), com relação à degeneração hidrópica celular, nesta pesquisa, não foram melhores que os resultados do grupo controle (Belzer).

Relativamente ao infiltrado inflamatório portal, o estudo demonstrou melhores resultados no grupo perfundido com solução de preservação acrescida de prostaglandina E1, quando comparado aos grupos 1 (Belzer) e 3 (NAC). Os resultados do grupo 2 foram melhores após 36 horas de isquemia fria e evidenciaram, com significância estatística, o benefício da utilização da prostaglandina E1 associada à solução de preservação em tempos de isquemia prolongados.

Avaliando o grau de infiltrado inflamatório hepático encontrado no grupo perfundido e preservado em solução de Belzer contendo prostaglandina E1, pode-se sugerir que, após 36 horas de isquemia fria, o enxerto mantenha a viabilidade.

Outros autores, como mostraremos a seguir, também demonstram resultados satisfatórios ao utilizarem a prostaglandina E1 durante a fase de isquemia fria.

Kawachi S, et al., 1997, realizaram um estudo experimental em porcos no qual, em um grupo, infundiram 100ng/Kg/min de prostaglandina E1 durante 2 horas, através da veia porta, imediatamente após a reperfusão do enxerto, e noutro abstiveram-se de realizar qualquer tratamento. Eles relatam a ocorrência de melhor fluxo arterial hepático e melhor fluxo venoso portal, além de níveis mais baixos de transaminases no grupo tratado com prostaglandina E1²¹.

Na Turquia, Yegen C, et al., 1995, em um estudo experimental, em porcos, infundiram prostaglandina E2 na dose de 5 microgramas/mL, em um grupo, no momento da perfusão hepática, durante a hepatectomia do doador e não utilizaram o referido análogo da prostaciclina no segundo grupo. Biopsiaram os fígados logo após a reperfusão e 60 minutos depois. Em suas biópsias, analisaram a quantidade de glicogênio por grama de tecido presente no enxerto hepático. Os resultados demonstraram maior quantidade de glicogênio no grupo tratado com prostaglandina E2. Eles encerram o relato dizendo que as prostaglandinas E1 e E2 têm efeitos similares e, quando utilizadas na fase anepática do transplante hepático, elevam os níveis de glicogênio e aumentam a viabilidade do enxerto em fases de isquemia fria prolongadas³⁴.

Mizoguchi Y, et al., 1987, desenvolveu um estudo experimental em ratos, para analisar a ativação da aderência celular hepática e a elevação do fator citotóxico, a partir dos macrófagos hepatocitários (Kupffer cells). Foi infundida a endotoxina gram-negativa (lipopolisacarídeo — LPS) juntamente com diferentes concentrações de prostaglandina E1 em ratos e avaliada sua sobrevida. O grupo que não recebeu prostaglandina E1 teve 14% de sobrevida em 24h; por outro lado, os grupos que receberam 10 e 30 microgramas de prostaglandina E1 tiveram 89% e 90% de sobrevida em 24h, respectivamente. Os grupos tratados com prostaglandina E1 tiveram menor elevação das transaminases e menos necrose

hepatocitária. Foi ainda feita uma cultura de células, preparada a partir do fígado dos animais, centrifugada e analisada. O resultado mostra que ocorreu menor quantidade de aderência celular e, quando foi infundido mais do que 0,1 micrograma por mililitro de prostaglandina E1, não foi observado o fator citotóxico induzido pelo LPS. Esses autores concluem que a prostaglandina E1 não só inibe a ativação de aderências celulares, mas também protege o hepatócito do fator citotóxico dos macrófagos ativado³⁵.

No Canadá, Greig PD, et al., 1989, em 87 transplantes hepáticos pediátricos, tiveram 10 casos de disfunção primária do enxerto (elevação de transaminases, coagulopatia e mínima produção biliar). Nesses pacientes foram infundidas 10 microgramas por hora de prostaglandina E1 até uma dose máxima de 40 microgramas por hora. Os autores contam o resgate de 8 dos 10 pacientes com a infusão da prostaglandina E1. Eles concluem apontando o benefício da utilização da prostaglandina E1 em casos de disfunção hepática primária após o transplante^{18,19}.

Helling TS, et al., 1995, em seu estudo experimental em porcos, provocaram isquemia e reperfusão hepática normotérmica em dois grupos, um tratado com prostaglandina E1 e outro sem qualquer tipo de tratamento. Foi dosado o aporte de nucleotídeos de adenosina (AMP, ADP e ATP) e visto que o grupo tratado com prostaglandina E1 teve uma restauração mais rápida da energia após a isquemia normotérmica, devido ao maior aporte de nucleotídeos de adenosina. Os autores concluem dizendo que esta restauração mais rápida da energia previne a injúria hepatocitária irreversível¹¹.

Kim M. Olthoff, da Universidade da Pensilvânia – Estados Unidos em um editorial de sua autoria pergunta se a injúria da reperfusão hepática pode ser prevenida. Faz considerações dizendo que a solução de Belzer revolucionou a preservação de órgãos desde

que foi introduzida, mas um número ainda elevado de enxertos sofre falência primária ou apresenta insuficiência primária com um período prolongado de recuperação, acarretando alto custo para o tratamento. Neste contexto ele conclui respondendo que a N-acetilcisteína, antioxidante e precursora do glutathione, e a prostaglandina E1, vasodilatador, antiinflamatório e antiagregante plaquetário, devem ser consideradas na prevenção da injúria causada pela reperfusão visto que suas causas são multifatoriais³⁸.

7 CONCLUSÃO

O tempo de isquemia foi fator determinante para a injúria hepática, independentemente do acréscimo de substâncias hepatoprotetoras à solução de preservação padrão utilizada, ocorrendo elevação dos níveis das enzimas hepáticas à medida que o tempo de isquemia aumenta.

No grupo em que se utilizou N-acetilcisteína acrescida à solução de Belzer, houve um menor aumento das aminotransferases no decorrer de 36 horas de preservação hepática, sugerindo algum benefício, embora sem significância estatística.

A injúria hepática foi detectada mais precocemente pela elevação dos níveis das aminotransferases, sempre seguida pela alteração anatomopatológica mais tardiamente.

Os achados anatomopatológicos mais prevalentes durante a fase de isquemia fria foram a degeneração hidrópica e o infiltrado inflamatório portal.

Com relação à degeneração hidrópica, tanto a adição de N-acetilcisteína como a de prostaglandina E1 à solução de Belzer não modificaram os resultados quando comparados à solução de Belzer isoladamente.

Já o infiltrado inflamatório portal foi significativamente menor no grupo 2, o qual foi perfundido com solução de Belzer acrescida de Prostaglandina E1, sendo demonstrada

uma melhora histológica do enxerto hepático durante a fase de isquemia fria nesta amostra. Atribui-se esse melhor resultado à adição de prostaglandina E1 à solução de preservação hepática por seu potente efeito antiinflamatório.

REFERÊNCIAS

1. Gayotto LCC, Alves VAF. Doenças do fígado e vias biliares. 1º ed. São Paulo (SP): Editora Atheneu; 2001.
2. Clavien P, Harvey PRC, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts: An overview and synthesis of current studies. *Transplantation*, 53: 957, 1992.
3. D'Alessandro AM, Southard JH, Love RB, Belzer FO. Organ Preservation. *Surg. Clin. North Am.*, 74: 1083, 1994.
4. Upadhyga GA, Strasberg SM. Platelets adherence to isolated rat hepatic sinusoidal endothelial cells after cold preservation. *Transplantation*, 73(11): 1764-1770, 2002.
5. De Boer J, De Meester J, Smits JMA, Groenwoud AF, Bok A, Van der Valde O, Doxiadis IIS, Persijn GG. Eurotransplant randomized multicenter kidney graft preservation study comparing HTK with UW and Euro-collins. *Transpl. Int.*, 12: 447-453, 1999.
6. Sabiston DC, Lyerly HK. *Textbook of Surgery: The biological basis of modern surgical practice*. 15th ed. Philadelphia (PA): Saunders Company; 1997.
7. Upadhyga GA, Strasberg SM. Evidence that actin disassembly is a requirement for matrix metalloproteinase secretion by sinusoidal endothelial cells during cold preservation in the rat. *Hepatology*, 30(1): 169-176, 1999.
8. Upadhyga 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*, 31(5): 1115-1122, 2000.

9. Cywes R, Harvey PR, Packham MA, Cameron R. The influence of prostaglandin E on platelets adherence and injury in preserved rat liver allografts. *Liver Transpl Surg*, 2(1): 23, 1996.
10. Regueira FM, Cienfuegos JA, Pardo F, Hernandez JL, Diez-Caballero A, Sierra A, Nwose E, Espí A, Baixaulí J, Rotellar F. Improvement in early of the hepatic graft after treatment of the donor with N-acetylcysteine: Clinical study. *Transplantation Proceedings*, 29: 3350-3352, 1997.
11. Helling TS, Wogahn BM, Olson SA, Evans LS, Reddy BR, VanWay C. The effect of prostaglandin E1 on liver adenine nucleotides and cytoplasmic enzymes in a porcine model of normothermic hepatic ischemia. *Hepatology*, 11: 1554-1559, 1995.
12. Lemasters JJ, Turman RG. Reperfusion injury after liver preservation for transplantation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 37: 327-338, 1997.
13. Kim YI, Yoo YO, Park SH, Lee HI, Joo DH, Park HK, Tanamachi H. Successful transplantation of liver grafts from non-heart-beating donors by synergistic use of prostaglandins (E1 and I2 analogue) and steroids. *Transplantation Proceedings*, 29: 1369-1370, 1997.
14. Manika A, Trinh T, Lagacé G, Dugas M, Proulx F, Lepage G, Champagne J, Lavoie JC, Cousineau J, Russo P, Chartrand C, Yandza T. N-acetylcysteine in pig liver transplantation from non-heart-beating donors. *Transplantation*, 68: 327-330, 1999.
15. Arai M, Peng X, Currin RT, Thurman RG, Lemasters JJ. Protection of sinusoidal endothelial cells against storage/reperfusion injury by prostaglandin E2 derived from kupffer cells. *Transplantation*, 68: 440-445, 1999.
16. Gaber AO, Thistlethwaite JR, Busse-Henry JS, Aboushloe M, Emond J, Rouch D, Broelsch CE. Improved results of preservation of hepatic grafts preflushed with albumin and prostaglandins. *Transplantation Proceedings*, 10(5): 992-993, 1988.
17. Koepfel TA, Lehmann TG, Thies JC, Gehrcke R, Gebhard M, Herfarth C, Otto G, Post S. Impact of N-acetylcysteine on the hepatic microcirculation after orthotopic liver transplantation. *Transplantation*, 61: 1397-1402, 1996.
18. Greig PD, Wolf GM, Abecassis M, Strasberg SM, Taylor B, Superina RA, Langer B, Glynn MFX, Ettles M, Blendis M, Levy GA. Treatment of primary liver graft non-function with prostaglandin E1 results in increased graft and patient survival. *Transplantation Proceedings*, 21(1): 2385-2388, 1989.
19. Greig PD, Wolf GM, Abecassis M, Strasberg SM, Taylor B, Superina RA, Langer B, Glynn MFX, Ettles M, Blendis M, Levy GA. Prostaglandin E1 for primary non-function following liver transplantation. *Transplantation Proceedings*, 21(2): 3360-3361, 1989.

20. Devlin J, Ellis AE, McPeake J, Heaton N, Wendon JA, Williams R. N-acetylcysteine improves indocyanine green extraction and oxygen transport during hepatic dysfunction. *Crit. Care Med.*, 25(2): 236-242, 1997.
21. Kavachi S, Shimazu M, Wakabayashi G, Tanabe M, Shirasugi N, Kitajima M. Intraportal infusion of prostaglandin E1 improves graft viability after orthotopic liver transplantation in pigs. *Transplantation Proceedings*, 29: 374-375, 1997.
22. Neumann UP, Kaisers U, Langrehr JM, Lang M, Glanemann M, Raakow R, Steinmüller T, Settmacher U, Müller AR, Bechstein WO, Neuhaus P. Treatment with PGE1 in patients after liver transplantation. *Transplantation Proceedings*, 30: 1869-1870, 1998.
23. Giostra E, Chen H, Deng H, Buhler L, Romand JA, Hadengue A, Huber O, Morel P, Mentha G. Prophylactic administration of prostaglandin E1 in liver transplantation: Results of a pilot trial. *Transplantation Proceedings*, 29: 2381-2384, 1997.
24. Taut FJH, Zampetal CM, Klar E, Motsch J, Thies JC, Babylon A, Martin E, Dröge W, Breitzkreutz R. Sulfur-containing metabolites of N-acetylcysteine in patients undergoing orthotopic liver transplantation. *Transplantation Proceedings*, 31: 411-413, 1999.
25. Steib A, Freys G, Collin F, Launoy A, Mark G, Boudjema K. Does N-acetylcysteine improve hemodynamics and graft function in liver transplantation? *Liver Transplantation and Surgery*, 4(2): 152-157, 1998.
26. Morioka D, Kubota T, Sekido H, Matsuo K, Saito S, Ichikawa Y, Endo I, Togo S, Shimada H. Prostaglandin E1 improved the function of transplanted fatty liver in a rat reduced-size-liver transplantation model under conditions of permissible cold preservation. *Liver Transplantation*, 9(1): 79-86, 2003.
27. Weigand MA, Plachky J, Theis JC, Spies-Martin D, Otto G, Martin E, Bardenheuer HJ. N-acetylcysteine attenuates the increase in α -glutathione s-transferase and circulation ICAM-1 and VCAM-1 after reperfusion in humans undergoing liver transplantation. *Transplantation*, 72(4): 694-698, 2001.
28. Bucuvalas JC, Ryckman FC, Krug S, Alonso MH, Balistreri WF, Kotagal U. Effect of treatment with prostaglandin E1 and N-acetylcysteine on pediatric liver transplant recipients: A single-center study. *Pediatric Transplantation*, 5: 274-278, 2001.
29. Silva P. A lógica da química do ciclo de Krebs, da gluconeogênese, da síntese e degradação do glicogênio, da fermentação e respiração e da glicólise, 2002. Disponível em: <<http://www2.ufp.pt/~pedros/bq/krebs.htm>>. Acesso: 05.11.2006.
30. Vieira R. Fundamentos de bioquímica. Glicólise e glicogenólise, 2002. Disponível em: <<http://www.fundamentosdebioquimica.hpg.ig.com.br>>. Acesso: 05.11.2006.

31. Castro AF, Castro LPF, Leite VHR, Paulino Jr E, Lima AS, Gazzola L, Toppa NH. Achados histológicos em 48 pacientes transplantados do fígado: biópsias do enxerto pós-reperfusão (tempo zero) e de três a 15 dias pós-transplante. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 38(4): 301-306, 2002.
32. Grezzana TJM, Corso CO, Zanotelli ML, Marroni CA, Brandão ABM, Schilindwein E, Leipnitz I, Meine MHN, Fleck Jr A, Cassal A, Hope L, Hoppen R, Kiss G, Gleisner ALM, Cerski T, Bellò-Klein A, Severo V, Innocenti C, Cantisani GPC. Oxidative stress, hepatocellular integrity, and hepatic function after initial reperfusion in human hepatic transplantation. *Transplantation Proceedings*, 36: 843-845, 2004.
33. Regueira FM, Hernández JL, Sola I, Cienfuegos JA, Pardo F, Díez-Caballero A, Sierra A, Nwose E, Espí A, Baixaúli J, Rotellar F. Ischemic damage prevention by N-acetylcysteine treatment of the donor before orthotopic liver transplantation. *Transplantation Proceedings*, 29: 3347-3349, 1997.
34. Yegen C, Aktan AO, Yalcin S, Yalin R. Letters to de Editor. *Ann. Surg.*, 222(6): 767-768, 1995.
35. Mizoguchi Y, Tsutsui H, Miyajima K, Sakagami Y, Seki S, Kobayashi K, Yamamoto S, Morisawa S. The protective effects of prostaglandin E1 in an experimental massive hepatic cell necrosis model. *Hepatology*, 7(6): 1184-1188, 1987.
36. Meine MH, Zanotelli ML, Neumann J, Kiss G, Grezzana TJ, Leipnitz I, Schilindwein ES, Fleck Jr A, Gleisner AL, Brandão AM, Marroni CA, Cantisani GPC. Randomized clinical assay for hepatic grafts preservation with University of Wisconsin or Histadine-triptophan-ketoglutarase solutions in liver transplantation. *Transplantation Proceedings*, 10: 1-4, 2006.
37. Silveira HJV, Leonardi LS, Boin IFSF, Leonardi MI, Jorge GL. Avaliação das lesões teciduais hepáticas durante isquemia fria após perfusão com análogo de prostaglandina E1 – estudo experimental em ratos. *J. Bras. Transpl.*, 6: 197-203, 2003.
38. Olthoff KM. Can reperfusion injury of the liver be prevented? Trying to improve on a good thing. *Pediatric Transplantation*, 5: 390-393, 2001.
39. Callegari-Jacques SM. Bioestatística – Princípios e aplicações. 3.^a ed. Porto Alegre (RS): Artmed; 2006.
40. Goldim JR, Raymundo MM. Pesquisa em saúde e direito dos animais. 2.^a ed. Porto Alegre (RS): Editora do Hospital de Clínicas de Porto Alegre; 1997.
41. Fletcher RH, Fletcher SW. Epidemiologia clínica – Elementos essenciais. 4.^a ed. Porto Alegre (RS): Artmed; 2006.

42. Pharmacia South África (Pty) Ltd. Prostin VR™ 0,5mg (Sterile solution), 1993. Disponível em: <<http://www.asa.org.za/pharm/pharmaca/prostnvr.html>>. Acesso: 14.11.2006.
43. Zambon – Produtos farmacêuticos Ltd. Fluimucil ampolas 300mg, 2000. Disponível em: <<http://www.zambon.pt/fluimu.htm>>. Acesso: 14.11.2006.
44. Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, Jeffries GA, Anderson TJ, Verma S. Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelium activation. Part 2. *Circulation*. 108: 2041-8, 2003.
45. Mendonça JS. A hepatite C crônica e a fibrose hepática. *Revista Panamericana de Infectologia*, (ene-mar) 8 (1): 3, 2006.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Tabela 1 – Material da análise anatomopatológica

Lâmina nº _____

- a) Edema intersticial portal
 - 0. Ausente
 - 1. Edema intersticial portal leve
 - 2. Edema intersticial portal moderado
 - 3. Edema intersticial portal severo
- b) Degeneração hidrópica celular
 - 0. Ausente
 - 1. Degeneração hidrópica leve
 - 2. Degeneração hidrópica moderada
 - 3. Degeneração hidrópica severa
- c) Degeneração gordurosa
 - 0. Ausente
 - 1. Degeneração gordurosa leve
 - 2. Degeneração gordurosa moderada
 - 3. Degeneração gordurosa severa
- d) Lesão endotelial
 - 0. Ausente
 - 1. Lesão endotelial leve
 - 2. Lesão endotelial moderada
 - 3. Lesão endotelial severa
- e) Infiltrado inflamatório lobular
 - 0. Ausente
 - 1. Infiltrado inflamatório lobular leve
 - 2. Infiltrado inflamatório lobular moderado
 - 3. Infiltrado inflamatório lobular severo
- f) Infiltrado inflamatório portal
 - 0. Ausente
 - 1. Infiltrado inflamatório portal leve
 - 2. Infiltrado inflamatório portal moderado
 - 3. Infiltrado inflamatório portal severo
- g) Necrose
 - 0. Ausente
 - 1. Necrose leve
 - 2. Necrose moderada
 - 3. Necrose severa

APÊNDICE B

Tabela 2 – Resultados da análise anatomopatológica – valor absoluto

GERAL					
Anatomopatológico		Ausente	Leve	Moderada	Severa
A	Edema Intersticial Portal	99	0	0	0
B	Degeneração Hidrópica Celular	84	15	0	0
C	Degeneração Gordurosa	97	2	0	0
D	Lesão Endotelial	99	0	0	0
E	Infiltrado Inflamatório Lobular	93	6	0	0
F	Infiltrado Inflamatório Portal	51	48	0	0
G	Necrose	98	1	0	0

BELZER - 12h					
Anatomopatológico		Ausente	Leve	Moderada	Severa
A	Edema Intersticial Portal	11	0	0	0
B	Degeneração Hidrópica Celular	11	0	0	0
C	Degeneração Gordurosa	11	0	0	0
D	Lesão Endotelial	11	0	0	0
E	Infiltrado Inflamatório Lobular	10	1	0	0
F	Infiltrado Inflamatório Portal	5	6	0	0
G	Necrose	11	0	0	0

BELZER - 24h					
Anatomopatológico		Ausente	Leve	Moderada	Severa
A	Edema Intersticial Portal	11	0	0	0
B	Degeneração Hidrópica Celular	11	0	0	0
C	Degeneração Gordurosa	11	0	0	0
D	Lesão Endotelial	11	0	0	0
E	Infiltrado Inflamatório Lobular	9	2	0	0
F	Infiltrado Inflamatório Portal	4	7	0	0
G	Necrose	10	1	0	0

BELZER – 36h				
Anatomopatológico	Ausente	Leve	Moderada	Severa
A Edema Intersticial Portal	11	0	0	0
B Degeneração Hidrópica Celular	10	1	0	0
C Degeneração Gordurosa	11	0	0	0
D Lesão Endotelial	11	0	0	0
E Infiltrado Inflamatório Lobular	11	0	0	0
F Infiltrado Inflamatório Portal	4	7	0	0
G Necrose	11	0	0	0

PGE – 12h				
Anatomopatológico	Ausente	Leve	Moderada	Severa
A Edema Intersticial Portal	11	0	0	0
B Degeneração Hidrópica Celular	9	2	0	0
C Degeneração Gordurosa	11	0	0	0
D Lesão Endotelial	11	0	0	0
E Infiltrado Inflamatório Lobular	11	0	0	0
F Infiltrado Inflamatório Portal	9	2	0	0
G Necrose	11	0	0	0

PGE - 24				
Anatomopatológico	Ausente	Leve	Moderada	Severa
A Edema Intersticial Portal	11	0	0	0
B Degeneração Hidrópica Celular	10	1	0	0
C Degeneração Gordurosa	11	0	0	0
D Lesão Endotelial	11	0	0	0
E Infiltrado Inflamatório Lobular	11	0	0	0
F Infiltrado Inflamatório Portal	6	5	0	0
G Necrose	11	0	0	0

PGE - 36				
Anatomopatológico	Ausente	Leve	Moderada	Severa
A Edema Intersticial Portal	11	0	0	0
B Degeneração Hidrópica Celular	5	6	0	0
C Degeneração Gordurosa	11	0	0	0
D Lesão Endotelial	11	0	0	0
E Infiltrado Inflamatório Lobular	10	1	0	0
F Infiltrado Inflamatório Portal	9	2	0	0
G Necrose	11	0	0	0

NAC – 12h				
Anatomopatológico	Ausente	Leve	Moderada	Severa
A Edema Intersticial Portal	11	0	0	0
B Degeneração Hidrópica Celular	10	1	0	0
C Degeneração Gordurosa	11	0	0	0
D Lesão Endotelial	11	0	0	0
E Infiltrado Inflamatório Lobular	9	2	0	0
F Infiltrado Inflamatório Portal	5	6	0	0
G Necrose	11	0	0	0

NAC – 24h				
Anatomopatológico	Ausente	Leve	Moderada	Severa
A Edema Intersticial Portal	11	0	0	0
B Degeneração Hidrópica Celular	9	2	0	0
C Degeneração Gordurosa	10	1	0	0
D Lesão Endotelial	11	0	0	0
E Infiltrado Inflamatório Lobular	11	0	0	0
F Infiltrado Inflamatório Portal	6	5	0	0
G Necrose	11	0	0	0

NAC – 36h				
Anatomopatológico	Ausente	Leve	Moderada	Severa
A Edema Intersticial Portal	11	0	0	0
B Degeneração Hidrópica Celular	9	2	0	0
C Degeneração Gordurosa	10	1	0	0
D Lesão Endotelial	11	0	0	0
E Infiltrado Inflamatório Lobular	11	0	0	0
F Infiltrado Inflamatório Portal	3	8	0	0
G Necrose	11	0	0	0

APÊNDICE C

Tabela 3 – Resultados da análise laboratorial de TGO e TGP – valor absoluto

Belzer	12h				24h				36h			
	Bioq (1)				Bioq (2)				Bioq (3)			
	TGO	TGP			TGO	TGP			TGO	TGP		
R1B	159	116			603	591			1138	1122		
R2B	297	283			720	718			1066	1060		
R3B	95	70			264	224			323	289		
R4B	126	141			488	594			920	1068		
R5B	182	199			482	522			821	939		
R6B	43	29			147	156			308	342		
R7B	204	228			409	487			507	595		
R8B	83	84			258	283			549	631		
R9B	71	68			237	284			558	648		
R10B	213	267			435	564			740	900		
R11B	30	31			113	124			235	240		
R12B	exclusão	exclusão			exclusão	exclusão			exclusão	exclusão		
MÉDIA	137	138			378	413			651	712		
MEDIANA	126	116			409	487			558	648		

PGE	12h				24h				36h			
	Bioq (1)				Bioq (2)				Bioq (3)			
	TGO	TGP			TGO	TGP			TGO	TGP		
R1P	170	172			438	461			898	975		
R2P	exclusão	exclusão			exclusão	exclusão			exclusão	exclusão		
R3P	81	79			249	259			535	581		
R4P	111	122			274	318			516	613		
R5P	386	356			713	693			918	902		
R6P	128	126			332	383			625	754		
R7P	76	63			349	324			627	579		
R8P	115	99			326	302			681	631		
R9P	103	89			301	289			583	582		
R10P	60	63			218	239			457	497		
R11P	99	92			381	404			513	535		
R12P	209	210			445	449			630	641		
MÉDIA	139,8	133,7			366	374,6			635	663		
MEDIANA	111	99			332	324			625	613		

NAC	12h		24h		36h	
	Bioq (1)		Bioq (2)		Bioq (3)	
	TGO	TGP	TGO	TGP	TGO	TGP
R1N	101	97	250	248	405	420
R2N	70	82	184	230	350	462
R3N	85	62	82	57	188	147
R4N	122	156	220	292	97	129
R5N	51	58	120	168	234	339
R6N	161	143	415	438	945	1033
R7N	272	317	551	662	750	873
R8N	302	362	518	624	677	814
R9N	59	67	131	165	201	266
R10N	31	32	283	263	540	493
R11N	443	519	834	965	1179	1318
R12N	exclusão	exclusão	exclusão	exclusão	exclusão	exclusão
MÉDIA	154	172,3	326	374	506	572
MEDIANA	101	97	250	263	405	462

APÊNDICE D

Artigo em língua portuguesa

Os efeitos da prostaglandina E1 e da N-acetilcisteína na preservação hepática durante a fase de isquemia fria usando a solução UW – Estudo experimental em ratos

Resumo

Introdução: Para realizar-se transplante de órgãos, é necessário que se preserve o enxerto durante a fase de isquemia fria. Entretanto, as soluções de preservação atuais não apresentam capacidade de oxigenar o tecido, o que causa, inevitavelmente, lesão celular. Em vista disso, busca-se associar substâncias antiinflamatórias, vasodilatadoras e antioxidantes à solução de preservação, tentando, assim, melhorar a qualidade da preservação hepática durante a fase de isquemia fria.

Animais e métodos: Realizou-se a hepatectomia do doador em 36 ratos Wistar, divididos em 3 grupos de 12 animais. Os fígados desses ratos foram perfundidos e preservados durante 36 horas. No grupo 1, considerado grupo controle, foi utilizada a Solução da Universidade de Wisconsin (UW); o grupo 2 teve a UW acrescida de prostaglandina E1; o grupo 3 teve a UW acrescida de N-acetilcisteína. Realizaram-se biópsias hepáticas e coletaram-se amostras da solução de preservação nos tempos de 12, 24 e 36 horas.

Resultados: O estudo bioquímico da solução de preservação demonstrou que os níveis de transaminases se elevam com o passar do tempo, mas isso ocorreu em menor nível quando a UW foi acrescida de N-acetilcisteína. A análise histopatológica das lâminas das biópsias revelaram um infiltrado inflamatório portal menor quando a UW foi acrescida de prostaglandina E1.

Conclusão: Assim, entendemos que a prostaglandina E1, considerada um potente antiinflamatório e vasodilatador, e a N-acetilcisteína, tida como um excelente antioxidante, acarretam efeito protetor ao enxerto hepático quando associadas à solução de preservação.

Abstract

Introduction: In order to transplant an organ, it is necessary to preserve the graft during the cold ischemia period. The current preservation solutions are not able to oxygenate the tissue, which inevitably causes cell damage. We intend to associate non-inflammatory, vessel dilating and non-oxidative substances to the preservation solution to try to improve the quality of the liver preservation during the cold ischemia.

Animals and methods: We performed the donor's hepatectomy in 36 Wistar mice divided into 3 groups of 12 mice. The animals' livers were perfused and preserved for 36 hours. In group 1, the control group, University of Wisconsin solution (UW) was used. In group 2, the UW was used together with prostaglandin 1 (0.5mcg/ml) and in group 3 UW was used together with N-acetylcysteine (0.3mg/ml). Hepatic biopsies were carried out, and samples of the preservation solution were collected in the preservation periods of 12, 24 and 36 hours.

Results: The biochemical study of the preservation solution showed that the levels of transaminases increase over time, but this occurred less when UW was added to N-acetylcysteine ($p>0,05$). The histopathological analysis of the biopsies showed a smaller portal inflammatory injury when UW was added to prostaglandin E1 ($p<0,05$).

Conclusion: We therefore understand that prostaglandin E1, which is considered to be powerful non-inflammatory and vessel dilator, and N-acetylcysteine, which is an excellent non-oxidative substance, have a protective effect on the liver graft when associated with the preservation solution.

Introdução

Os métodos de preservação são um componente necessário para o transplante de órgãos. Para a utilização ideal dos doadores cadáveres, os órgãos têm que ser transportados do local de captação ao centro de transplantes, onde se encontra o receptor. Os procedimentos de preservação fornecem o tempo necessário para que se mantenha a viabilidade do órgão com um mínimo de lesão tecidual e boa qualidade funcional do enxerto, até o transplante¹⁻³.

Um dos problemas que ocorre durante a fase de isquemia fria hepática é a indução da adesão plaquetária às células endoteliais dos sinusóides hepáticos e a atividade leucocitária com conseqüente liberação de histamina, levando à falência hepática aguda pós-transplante ou à falência primária do enxerto no momento da reperfusão⁴. A isquemia induz ainda secreção de matrix metaloproteinases (MMPs) pelas células endoteliais dos sinusóides hepáticos. Essas enzimas são importantes mediadores da injúria hepática durante a isquemia fria e apresentam maior atividade quando à temperatura de 37°C. Conforme

ocorre queda da temperatura, essa atividade cai e atinge seu ponto mínimo quando se encontra entre 0 e 4°C^{5,6}.

Considerando: - o aumento do número de candidatos ao transplante hepático e a escassez de doadores falecidos; - a necessidade de utilização de enxertos hepáticos sub-ótimos

na tentativa de aumentar o "pool" de doadores e reduzir a mortalidade dos pacientes em lista de espera; - e que não existe ainda uma solução de preservação de órgão ideal. Entendeu-se que o acréscimo de substâncias à solução de preservação padrão com capacidade de inibir a atividade plaquetária (como a prostaglandina E1), ou que eleve a glutatona hepatócitária levando à diminuição da atividade das MMPs produzidas pelo endotélio sinusoidal (como a N-acetilcisteína), poderia contribuir na redução da injúria do enxerto hepático durante o período de isquemia fria⁹.

Materiais e métodos

Utilizaram-se ratos Wistar com peso de 250 a 350 gramas e idade entre 7 e 9 semanas.

Foi considerado um nível de significância de 5% e poder estatístico de 80%.

Criaram-se 3 grupos com 12 ratos em cada um deles, o que exigiu, portanto, a participação de 36 animais.

Os grupos foram numerados de 1 a 3, sendo o grupo 1 o controle e os grupos 2 e 3 submetidos ao estudo em comparação ao grupo controle. No grupo 1, os fígados dos animais foram perfundidos e preservados com solução de Belzer; no grupo 2, os fígados dos animais foram perfundidos e preservados com solução de Belzer acrescida de prostaglandina E 1 na dose de 0,5mcg/ml; no grupo 3, os fígados dos animais foram perfundidos e preservados com solução de Belzer acrescida de N-acetilcisteína na dose de 0,3mg/ml.

Os animais dos três grupos foram hepatectomizados, e os fígados perfundidos e preservados durante 36 horas conforme distribuição acima.

Realizou-se biópsia hepática nos tempos 12h, 24h e 36h, em cada um dos fígados dos 3 grupos. O material foi enviado para análise anatomopatológica. Os aspectos examinados foram o edema intersticial, a degeneração hidrópica celular, a degeneração gordurosa, a lesão endotelial, o infiltrado inflamatório lobular, o infiltrado inflamatório portal e a necrose. Eles foram classificados em quatro níveis: ausente, leve, moderado e severo.

No mesmo momento das biópsias, realizou-se também coleta da solução de preservação onde os fígados estavam submersos a uma temperatura entre 0 e 4°C. Nas amostras da solução de preservação, foi feita dosagem enzimática de TGO e TGP.

Análise estatística

As variáveis numéricas – referentes aos valores absolutos de TGO e TGP – foram expressas em média e desvio padrão. As médias calculadas foram avaliadas, estatisticamente, por meio da Análise de Variâncias para Medidas Repetidas (ANOVA).

As variáveis categóricas – referente às lâminas das biópsias hepáticas – foram analisadas e classificadas por meio categórico semiquantitativo (ausente, leve, moderado e severo). Os resultados foram avaliados estatisticamente pelo Teste Exato de Fisher.

O programa utilizado para realizar a análise estatística foi o Statistical Package for the Social Sciences 14.0 for Windows (SPSS 14.0).

Resultados

Houve uma perda em cada grupo, de modo que, efetivamente, foram estudados 3 grupos compostos de 11 animais cada um.

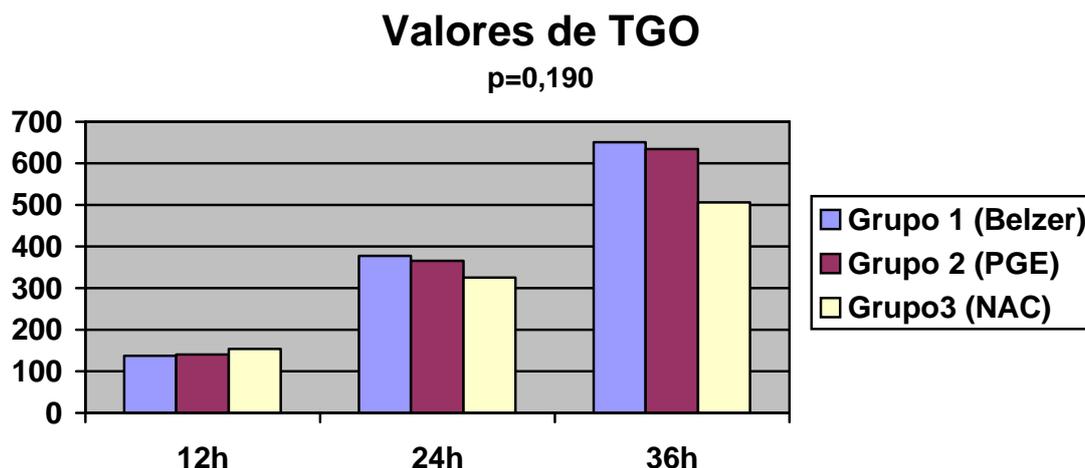


Gráfico 1 – Média dos valores de TGO coletados das soluções onde os enxertos eram preservados

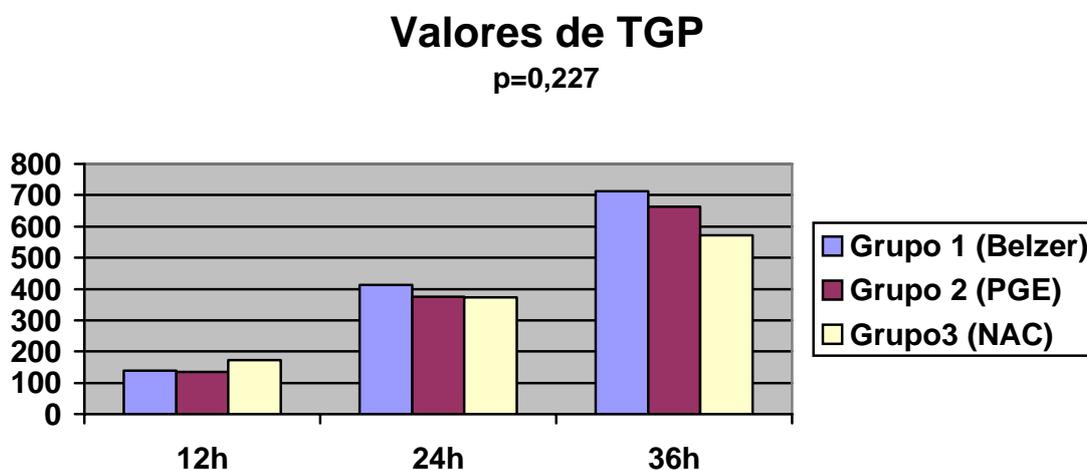


Gráfico 2 – Média dos valores de TGP coletados das soluções onde os enxertos eram preservados

Com referência aos resultados demonstrados acima, não ocorreu diferença estatisticamente significativa nas dosagens de TGO e TGP, entre os grupos, utilizando-se Análise de Variâncias para Medidas Repetidas (ANOVA); embora observaram-se melhores resultados após 36 horas de preservação no grupo 3.

Quando os 3 grupos foram analisados isoladamente, houve diferença estatisticamente significativa, em todos eles, com relação às dosagens enzimáticas e ao

tempo de preservação com um $p < 0,0001$ para dosagens de TGO e TGP entre os tempos 12h, 24h e 36h. Esse resultado comprova que o tempo de isquemia é diretamente proporcional à extensão da lesão hepatocelular.

Dentre os aspectos analisados no laboratório de patologia, os achados quando positivos foram leves. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa com relação ao infiltrado inflamatório portal favorável ao grupo 2 ($p = 0,029$). Utilizou-se o teste exato de Fisher para análise conforme é demonstrado no gráfico abaixo.

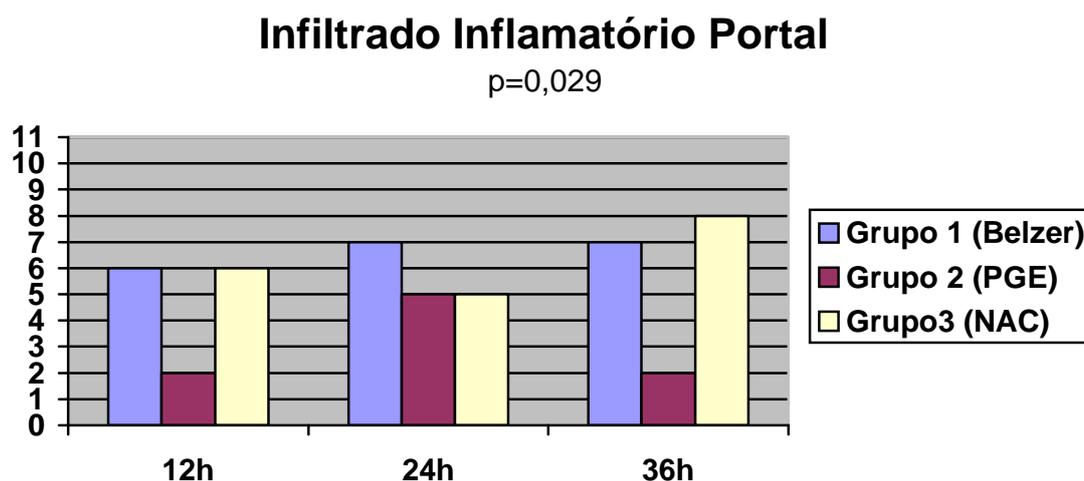


Gráfico 3 – Número absoluto de achados positivos nas biópsias hepáticas

Discussão

Nenhuma solução de preservação tem, ainda, a capacidade de oxigenar o tecido preservado, resultando em sofrimento celular inevitável durante a fase de isquemia fria. O tempo de isquemia é diretamente proporcional ao grau de injúria hepática e é medido pela elevação dos níveis das aminotransferases que ocorre primeiro, ou alterações anatomopatológicas do enxerto que são mais tardias^{2,10}.

No estudo realizado, ficou demonstrado que o tempo de isquemia eleva os níveis das enzimas hepáticas independentemente da solução de preservação e substâncias utilizadas. Isso mostra que a isquemia fria sempre leva a injúrias celulares e que as soluções de preservação tentam minimizar essas injúrias, mantendo a viabilidade do órgão. À medida que o tempo passa, a lesão celular aumenta, e os grupos de transplante de órgãos buscam a resposta de quanto tempo os órgãos podem ser preservados com sua viabilidade mantida.

A glutatona é encontrada no hepatócito em sua forma reduzida, o que previne a lesão celular pela ação de radicais livres causadores de fenômenos oxidativos tóxicos. À medida que a glutatona é utilizada para neutralizar a ação dos radicais livres, seus níveis diminuem nos hepatócitos que ficam mais vulneráveis à ação oxidativa⁷.

A oferta de N-acetilcisteína ao enxerto hepático por meio da solução de preservação eleva os níveis de glutatona hepatocitária protegendo assim o fígado na fase avascular.

Demonstrou-se neste estudo que a N-acetilcisteína, quando utilizada juntamente com a solução de Belzer, pode diminuir a elevação das enzimas hepáticas durante períodos

mais prolongados de isquemia fria, embora sem significância estatística. Seria possível pensar em um grau menor de lesão hepatocelular do enxerto neste caso ($p > 0,05$).

A inibição da agregação plaquetária e da atividade leucocitária associada à vasodilatação são importantes fatores para a proteção do enxerto hepático e diminuição dos índices de disfunção ou falência primária. A adição de prostaglandina E1 à solução de preservação oferece esta proteção devido as suas propriedades bioquímicas⁸.

O estudo apontou melhores resultados no grupo 2, perfundido com solução de preservação acrescida de prostaglandina E1, quando comparado aos grupos 1 (Belzer) e 3 (NAC) com relação ao número de casos de infiltrado inflamatório portal. Os resultados do grupo 2 foram melhores após 36 horas de isquemia fria e evidenciaram, com significância estatística ($p < 0,05$), o benefício da utilização da prostaglandina E1 associada à solução de preservação em tempos de isquemia prolongados.

Referências

1. Gayotto LCC, Alves VAF. Doenças do fígado e vias biliares. 1º ed. São Paulo (SP): Editora Atheneu; 2001.
2. Clavien P, Harvey PRC, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts: An overview and synthesis of current studies. *Transplantation*, 53: 957, 1992.
3. D'Alessandro AM, Southard JH, Love RB, Belzer FO. Organ Preservation. *Surg. Clin. North Am.*, 74: 1083, 1994.
4. Upadhyga GA, Strasberg SM. Platelets adherence to isolated rat hepatic sinusoidal endothelial cells after cold preservation. *Transplantation*, 73(11): 1764-1770, 2002.
5. Upadhyga GA, Strasberg SM. Evidence that actin disassembly is a requirement for matrix metalloproteinase secretion by sinusoidal endothelial cells during cold preservation in the rat. *Hepatology*, 30(1): 169-176, 1999.
6. Upadhyga GA, Strasberg SM. Glutathione, lactobionate and histadine: Cryptic inhibitors of matrix metalloproteinases contained in University of Wisconsin and Histidine/Tryptophan/Ketoglutarate liver preservation solutions. *Hepatology*, 31(5): 1115-1122, 2000.
7. Grezzana TJM, Corso CO, Zanotelli ML, Marroni CA, Brandão ABM, Schilindwein E, Leipnitz I, Meine MHN, Fleck Jr A, Cassal A, Hope L, Hoppen R, Kiss G, Gleisner ALM, Cerski T, Bellò-Klein A, Severo V, Innocenti C, Cantisani GPC. Oxidative stress, hepatocellular integrity, and hepatic function after initial reperfusion in human hepatic transplantation. *Transplantation Proceedings*, 36: 843-845, 2004.
8. Silveira HJV, Leonardi LS, Boin IFSF, Leonardi MI, Jorge GL. Avaliação das lesões teciduais hepáticas durante isquemia fria após perfusão com análogo de prostaglandina E1 – estudo experimental em ratos. *J. Bras. Transpl.*, 6: 197-203, 2003.
9. Morioka D, Kubota T, Sekido H, Matsuo K, Saito S, Ichikawa Y, et al. Prostaglandin E1 improved the function of transplanted fatty liver in a rat reduced-size-liver transplantation model under conditions of permissible cold preservation. *Liver Transplantation* 2003;9(1):79-86.

10. Meine MH, Zanotelli ML, Neumann J, Kiss G, Grezzana TJ, Leipnitz I, et al. Randomized clinical assay for hepatic grafts preservation with University of Wisconsin or Histadine-triptophan-ketoglutarase solutions in liver transplantation. *Transplantation Proceedings* 2006;10:1-4.

APÊNDICE E

Artigo em língua inglesa

Prostaglandin E1 and N-acetylcysteine effects on liver preservation during cold ischemia using UW solution – An experimental study in mice

Abstract

Introduction: In order to transplant an organ, it is necessary to preserve the graft during the cold ischemia period. The current preservation solutions are not able to oxygenate the tissue, which inevitably causes cell damage. We intend to associate non-inflammatory, vessel dilating and non-oxidative substances to the preservation solution to try to improve the quality of the liver preservation during the cold ischemia.

Animals and methods: We performed the donor's hepatectomy in 36 Wistar mice divided into 3 groups of 12 mice. The animals' livers were perfused and preserved for 36 hours. In group 1, the control group, University of Wisconsin solution (UW) was used. In group 2, the UW was used together with prostaglandin 1 (0.5mcg/ml) and in group 3 UW was used together with N-acetylcysteine (0.3mg/ml). Hepatic biopsies were carried out and samples of the preservation solution were collected in the preservation periods of 12, 24 and 36 hours.

Results: The biochemical study of the preservation solution showed that the levels of transaminases increase over time, but this occurred less when UW was added to N-acetylcysteine ($p>0,05$). The histopathological analysis of the biopsies showed a smaller portal inflammatory injury when UW was added to prostaglandin E1 ($p<0,05$).

Conclusion: We therefore understand that prostaglandin E1, which is considered to be a powerful non-inflammatory and vessel dilator, and N-acetylcysteine, which is an excellent non-oxidative substance, have a protective effect on the liver graft when associated with the preservation solution.

Introduction

The preservation methods constitute a required component in the organ transplantation process. For the ideal utilization of heart-dead donor organs, these should be

transported from the collection site to the transplantation center where the receptor is awaiting. The preservation procedures provide the necessary time to maintain the viability of the organ, with minimum tissue lesion and good functional quality of the graft until the moment of transplantation¹⁻³.

One of the problems which occurs during the liver cold ischemia phase is the induction of platelet adhesion to endothelial cells of liver sinusoids and the leukocyte activity with consequent histamine release, leading to acute liver failure post-transplantation or primary failure of the graft at the moment of reperfusion⁴. The ischemia induces the secretion of matrix metalloproteinases (MMPs) by endothelial cells of liver sinusoids. These enzymes are important mediators of the liver injury during the cold ischemia and exhibit higher activity when the temperature is 37°C. As the temperature decreases, this activity is slowed down and reaches its minimum level when the temperature is between 0 and 4°C^{5,6}.

Considering the increasing number of candidates for liver transplantation and the scarcity of dead donor organs, there is a need to utilize sub-optimal liver grafts in an attempt to expand the availability of donor organs and reduce mortality in patients on the waiting list, especially when we take into account that there is still no perfect organ preservation solution. It was assumed that, by adding substances which can inhibit the platelet activity (such as prostaglandin E1), or which can increase the level of hepatocyte glutathione, leading to a reduction in the activity of MMPs produced by the sinusoidal endothelial (such as N-acetylcysteine), to the standard preservation solution, we can contribute towards a reduced liver graft injury during the cold ischemia period⁹.

Animals and methods

Wistar mice were used in the study, whose weight ranged from 250 to 350 grams and whose age was between 7 and 9 weeks.

This study considered a significance level of 5% and a statistical power of 80%.

Three groups of 12 mice were created, required the participation of 36 mice in all.

The groups were numbered from 1 to 3, with group 1 as the control group, and groups 2 and 3 submitted to the study and compared to the control group. In group 1, the livers of the animals were perfused and preserved in Belzer solution; in group 2, the livers of the animals were perfused and preserved in Belzer solution with the addition of prostaglandin E 1 (0.5mcg/ml); in group 3, the livers of the animals were perfused and preserved in Belzer solution with the addition of N-acetylcysteine (0.3mg/ml).

Hepatectomy was performed on all animals from the three groups, and their livers were perfused and preserved for 36 hours, following the distribution mentioned above.

Biopsy was performed three times: at 12-hour, 24-hour and 36-hour preservation periods, on the liver of each animal from the 3 groups. The material was sent for anatomopathological analysis. Examined aspects were: interstitial edema, cell hydropic degeneration, fatty degeneration, endothelial lesion, lobular inflammatory infiltrate, portal inflammatory infiltrate and necrosis. The analysis categorized these aspects according to four different classifications: absent, mild, moderate and severe.

Immediately after the biopsies were performed, the preservation solutions in which the livers were submersed at the temperature range of 0 to 4°C were sampled. Enzymatic dosage of TGO and TGP was performed on these samples of the preservation solutions.

Statistical Analysis

The numerical variables – referring to the absolute values of AST and ALT – were expressed as averages and standard deviations. The calculated averages were evaluated statistically through the Analysis of Variation (ANOVA) for Repeated Measurements.

The category variables – referring to slide blades with liver biopsies – were analysed and classified into four categories (absent, mild, moderate and severe) as explained above. The results were evaluated statistically using Fisher’s Exact Test.

The software used to carry out the statistical analysis was the Statistical Package for the Social Sciences 14.0 for Windows (SPSS 14.0).

Results

There was one animal loss in each group, so 3 groups composed of 11 animals were effectively studied.

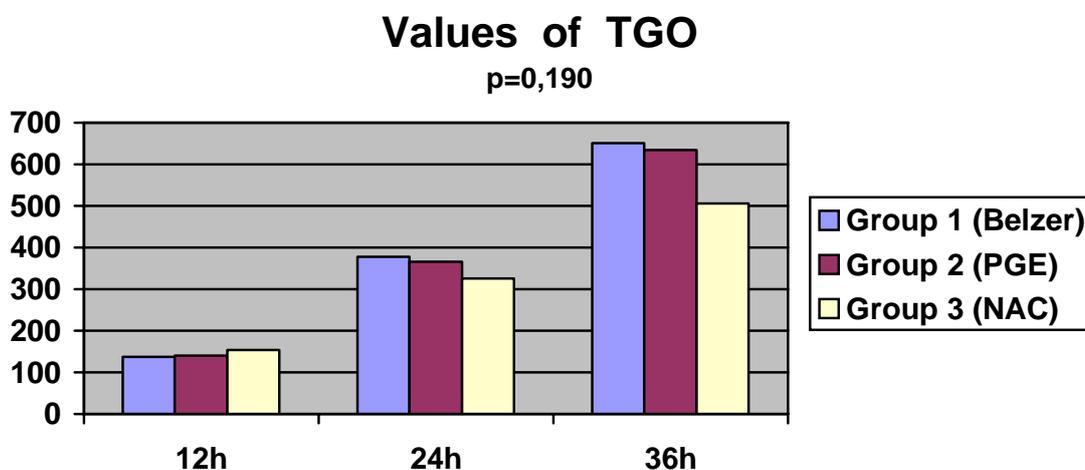


Table 1 – Average TGO values collected from the solutions where the grafts were preserved

Values de TGP

p=0,227

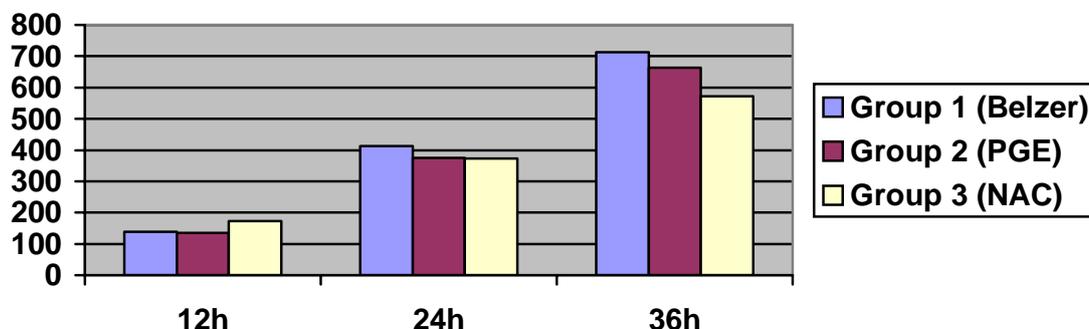


Table 2 – Average TGP values collected from the solutions where the grafts were preserved

There was no statistically significant difference in the dosages of TGO and TGP, when comparing the groups using the Analysis of Variances (ANOVA) for Repeated Measurements, but better results were observed in the analysis of 36-hour preservation in group 3 (p>0,05).

When analyzing the 3 groups separately, all of them presented a statistically significant difference regarding the enzymatic dosages and the preservation period (p< 0.0001) for TGO and TGP dosages when comparing 12-hour, 24-hour and 36-hour preservation periods. These results confirm the thesis that ischemia duration is closely related to the hepatocellular lesion extension.

Among the aspects analyzed in the pathology laboratory, there was a statistically significant difference which is favorable in group 2 (if compared to groups 1 and 3), regarding the portal inflammatory infiltrate, using Fisher’s exact test.

Portal Inflammatory Infiltrate

p=0,029

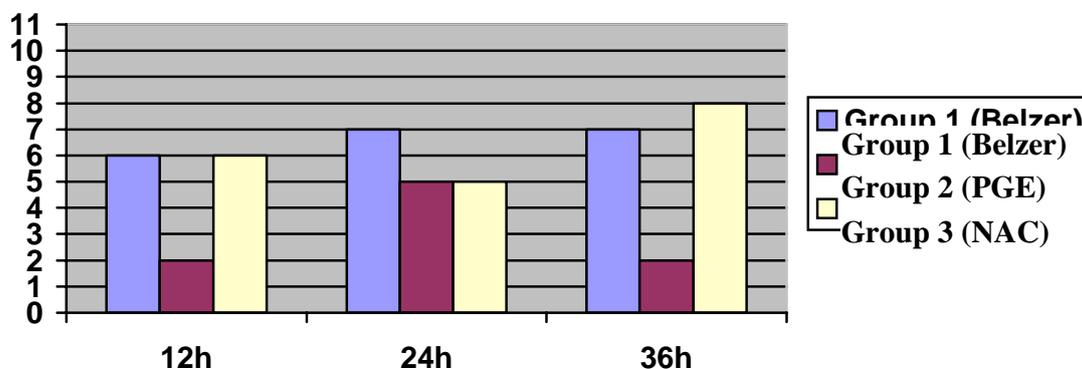


Table 3 – Absolute number of positive findings in liver biopsies

Discussion

No preservation solution has so far demonstrated capability to oxygenate the preserved tissue, which results in inevitable cell injury. The ischemia period is closely related to the degree of liver injury, being measured through increased aminotransferases, which occurred first, or anatomopathological changes in the graft, which occurred later^{2,10}.

This study demonstrated that the ischemia duration increases the levels of liver enzymes, regardless of the preservation solution and substances employed, which shows the cold ischemia always leads to cell injuries. The preservation solutions attempt to minimize such injuries, retaining organ viability. Over time, cell lesion increases, and the transplantation centers are still searching for an answer to how long the organs can be preserved while retaining their viability.

Glutathione is found in the hepatocyte in its reduced form, preventing cell lesion through the action of free radicals which cause toxic oxidative phenomena. As glutathione is used to neutralize the action of free radicals, their levels are reduced in the hepatocytes, which are then more vulnerable to oxidative actions⁷.

The addition of N-acetylcysteine to the liver graft through the preservation solution increases the hepatocyte glutathione levels, thus protecting the liver in the avascular phase.

This study demonstrated that N-acetylcysteine, when added to Belzer solution, may reduce the elevation of liver enzymes for longer periods of cold ischemia. It would be possible to consider a smaller degree of hepatocellular lesion in this case ($p > 0,05$).

The inhibition of platelet adhesion and the leucocyte activity associated with the vessel dilatation are important factors for the liver graft protection and the reduced rates of primary failure or dysfunction. The addition of prostaglandin E1 to the preservation solution affords this protection due to its biochemical properties⁸.

Regarding the portal inflammatory infiltrate, this study indicated that group 2, perfused with a preservation solution with the addition of prostaglandin E1, produced better results when compared to groups 1 (Belzer) and 3 (NAC). The results of group 2 were better at the end of the 36-hour cold ischemia period and showed, with statistical significance, the benefit of using prostaglandin E1 associated with the preservation solution in longer periods of ischemia ($p < 0,05$).

References

1. Gayotto LCC, Alves VAF. Doenças do fígado e vias biliares. 1º ed. São Paulo (SP): Editora Atheneu; 2001.
2. Clavien P, Harvey PRC, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts: An overview and synthesis of current studies. *Transplantation*, 53: 957, 1992.
3. D'Alessandro AM, Southard JH, Love RB, Belzer FO. Organ Preservation. *Surg. Clin. North Am.*, 74: 1083, 1994.

4. Upadhyga GA, Strasberg SM. Platelets adherence to isolated rat hepatic sinusoidal endothelial cells after cold preservation. *Transplantation*, 73(11): 1764-1770, 2002.
5. Upadhyga GA, Strasberg SM. Evidence that actin disassembly is a requirement for matrix metalloproteinase secretion by sinusoidal endothelial cells during cold preservation in the rat. *Hepatology*, 30(1): 169-176, 1999.
6. Upadhyga GA, Strasberg SM. Glutathione, lactobionate and histadine: Cryptic inhibitors of matrix metalloproteinases contained in University of Wisconsin and Histidine/Tryptophan/Ketoglutarate liver preservation solutions. *Hepatology*, 31(5): 1115-1122, 2000.
7. Grezzana TJM, Corso CO, Zanotelli ML, Marroni CA, Brandão ABM, Schilindwein E, Leipnitz I, Meine MHN, Fleck Jr A, Cassal A, Hope L, Hoppen R, Kiss G, Gleisner ALM, Cerski T, Bellò-Klein A, Severo V, Innocenti C, Cantisani GPC. Oxidative stress, hepatocellular integrity, and hepatic function after initial reperfusion in human hepatic transplantation. *Transplantation Proceedings*, 36: 843-845, 2004.
8. Silveira HJV, Leonardi LS, Boin IFSF, Leonardi MI, Jorge GL. Avaliação das lesões teciduais hepáticas durante isquemia fria após perfusão com análogo de prostaglandina E1 – estudo experimental em ratos. *J. Bras. Transpl.*, 6: 197-203, 2003.
9. Morioka D, Kubota T, Sekido H, Matsuo K, Saito S, Ichikawa Y, et al. Prostaglandin E1 improved the function of transplanted fatty liver in a rat reduced-size-liver transplantation model under conditions of permissible cold preservation. *Liver Transplantation* 2003; 9(1):79-86.
10. Meine MH, Zanotelli ML, Neumann J, Kiss G, Grezzana TJ, Leipnitz I, et al. Randomized clinical assay for hepatic grafts preservation with University of Wisconsin or Histidine-triptophan-ketoglutarase solutions in liver transplantation. *Transplantation Proceedings* 2006; 10:1-4.