

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

Dissertação de Mestrado

Ensaio clínico randomizado da preservação de enxertos hepáticos com solução de perfusão de UW e HTK no transplante ortotópico de fígado

Mestrando
Mário Henrique Mendes de Mattos Meine

Professora Orientadora
Dra. Maria Lúcia Zanotelli

Porto Alegre / 2005

Sumário

| | |
|--|-----|
| 1. Agradecimentos | 3 |
| 2. Dedicatória | 4 |
| 3. Lista de abreviaturas | 5 |
| 4. Resumos | 6 |
| 5. Introdução | 8 |
| 5.1. Histórico do transplante hepático | 8 |
| 5.2. As soluções de preservação do fígado | 10 |
| 5.3. Princípios de preservação de órgãos | 14 |
| 5.4. Isquemia e reperfusão hepática | 16 |
| 5.5. Disfunção do enxerto hepático | 21 |
| 5.6. A solução da Universidade de Wisconsin (UW) | 24 |
| 5.7. A solução de Histidina-Triptofano-Cetoglutarato (HTK) | 25 |
| 5.8. Comparando HTK e UW | 28 |
| 5.8.1. Estudos experimentais | 27 |
| 5.8.1.1. O endotélio | 30 |
| 5.8.1.2. Apoptose | 33 |
| 5.8.1.3. Depósitos de microcristais | 34 |
| 5.8.2. Estudos clínicos | 35 |
| 5.8.2.1. Análise de enzimas no perfusato efluente da veia cava | 36 |
| 5.8.2.2. Complicações de vias biliares | 37 |
| 6. Justificativa fundamentada | 41 |
| 7. Objetivos | 42 |
| 8. Pacientes e método | 43 |
| 8.1. Delineamento | 43 |
| 8.2. Seleção de doadores (enxertos hepáticos) | 44 |
| 8.3. Seleção de receptores | 45 |
| 8.4. Preservação dos órgãos e procedimentos cirúrgicos | 46 |
| 8.4.1. Cirurgia de retirada de fígado para transplante | 48 |
| 8.4.2. As soluções de preservação | 49 |
| 8.4.3. A cirurgia de bancada | 50 |
| 8.4.4. A cirurgia do transplante hepático | 51 |
| 8.4.5. O pós-operatório | 55 |
| 8.2.6. Análise estatística | 56 |
| 9. Resultados | 58 |
| 10. Discussão | 77 |
| 10.1. Tempo de isquemia | 81 |
| 10.2. Alterações bioquímicas pré e pós-operatórias | 83 |
| 10.3. Disfunção primária de enxerto | 85 |
| 10.4. Complicações de vias biliares | 87 |
| 11. Conclusão | 91 |
| 12. Referências Bibliográficas | 93 |
| 13. Anexos | 107 |
| Anexo 1: Descrição da avaliação dos doadores de órgãos | 108 |
| Anexo 2: Termo de consentimento informado | 109 |
| Anexo 3: A cirurgia de retirada de fígado para transplante | 110 |
| Anexo 4: Relatório do doador de fígado | 113 |
| Anexo 5: A cirurgia do transplante hepático | 115 |
| Anexo 6: Exames bioquímicos | 117 |

1. Agradecimentos

Agradeço aos meus colegas de trabalho do Grupo de Transplante Hepático; sem a ajuda dos quais, não seria possível a realização deste estudo.

Aos funcionários do Bloco Cirúrgico, da UTI e das unidades de internação do HDVS, pelo seu esforço diário no atendimento aos pacientes transplantados.

2. Dedicatória

Dedico esta dissertação a minha querida esposa Márcia e aos meus pequenos filhos, Natália e Henrique, pela compreensão e pelo sacrifício dos momentos familiares em prol deste trabalho.

3. Lista de abreviaturas

ALT : Alanino amino transferase (TGP)

AST : Aspartato amino transferase (TGO)

ATP : Adenosina trifosfato

BD : Bilirrubina Direta ou Conjugada

BT : Bilirrubina Total

CMV : Citomegalovírus

CPRE : Colangiografia Retrógrada Endoscópica

CTPH : Colangiografia Trans-parieto Hépática

CVB : Complicações de Vias Biliares

DIE : Disfunção Inicial do Enxerto

DP : Desvio padrão

DPE : Disfunção Primária do Enxerto

EEG : Eletroencefalograma

FA : Fosfatase Alcalina

FV : Fator 5

GGT : Gama Glutamiltranspeptidase

HIV : *Human Immunodeficiency Virus*

HLA : *Human Leucocitary Antigen*

HTK : *Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate*

HTLV : *Human T Lymphocyte Virus*

HBsAg : *Hepatitis B virus superficial Antigen*

IL: Interleucina

K⁺⁺ : Íons potássio

Na⁺ : Íons sódio

NFP : Não Funcionamento Primário

PBE : Peritonite Bacteriana Espontânea

PDS : *Poly Dioxanone Suture*

PFC : Partículas de fluorcarbono

RCA : Rejeição celular Aguda

RNM : Ressonância Nuclear Magnética

TGO : Transaminase glutâmica oxalacética (AST)

TGP : Transaminase glutâmica pirúvica (ALT)

TOF : Transplante Ortotópico de Fígado

TNF: *Tumoral Necrosis Factor*

TP : Tempo de Protrombina

UTI : Unidade de Tratamento Intensivo

UW : *University of Wisconsin*

VCI : Veia Cava Inferior

VHB : Vírus da Hepatite B

VHC : Vírus da Hepatite C

VMS : Veia Mesentérica Superior

4. Resumos

Ensaio clínico randomizado da preservação de enxertos hepáticos com solução de perfusão de UW ou HTK no transplante ortotópico de fígado

Meine M H, Zanotelli M L, Neumann J, Kiss G, Grezzana T J, Leipnitz I, Schlindwein E S, Gleisner A M, Fleck Jr. A M, Brandão A M, Marroni C A, Cantisani G C.

Introdução: A solução de UW (University of Wisconsin) tem sido utilizada como padrão para preservação de enxertos hepáticos para transplante ortotópico de fígado (TOF) desde 1990. Seu custo é alto, e não existem, em nosso meio, estudos clínicos que comparem a sua efetividade com a de outras soluções. A solução de HTK (histidina-triptofano-cetoglutarato) foi desenvolvida inicialmente para cardioplegia, porém estudos experimentais e alguns estudos clínicos retrospectivos demonstraram sua eficácia na preservação hepática, mesmo com tempos de isquemia prolongados.

Objetivos: Comparar a efetividade das soluções de preservação de órgãos HTK e UW com relação as variáveis: disfunção primária do enxerto (DPE), tempo de isquemia fria (TIF), complicações de via biliar (CVB), alterações de provas funcionais hepáticas (PFH) e sobrevida do enxerto e dos pacientes.

Método: Foram estudados os fígados de doadores de múltiplos órgãos, implantados nos receptores pela técnica de *piggyback*, segundo ordem cronológica de ingresso em lista de espera no RS no período janeiro de 2003 a agosto de 2004. As soluções de preservação HTK e UW foram utilizadas de forma randomizada em blocos. A perfusão na aorta foi feita com 4 litros de HTK ou 2 litros de UW e a perfusão venosa portal com 1 litro de ambas as soluções, utilizando-se 500 ml para perfusão venosa e arterial adicional *ex-situ* e armazenagem do enxerto. Realizou-se biópsia hepática em cunha do lobo esquerdo quando a esteatose macroscópica estava presente. A análise bioquímica sérica foi diária na primeira semana e, em 15 e 30 dias pós-operatórios.

Resultados: Foram estudados 102 pacientes submetidos ao TOF, sendo 65 no grupo UW (63,7%) e 37 no grupo HTK (36,3%). As frequências de sexo, raça, estado hemodinâmico, o uso de vasopressores e a presença de esteatose nos doadores foram igual nos dois grupos ($p > 0,05$). A idade média dos doadores foi de 38,1 anos (DP $\pm 14,4$) no grupo UW e de 44,6 anos (DP $\pm 14,2$) no HTK ($p = 0,036$). A distribuição de sexo, raça, idade, etiologia da cirrose, re-transplante, hepatite fulminante, trombose portal e escore de Child-Pugh dos receptores foi igual nos dois grupos ($p > 0,05$). O grupo HTK teve 8 casos (25,8%) de CVB (4 estenose, 2 fístulas e 2 lesões do tipo isquêmica) contra 5 casos (8,6%) do grupo UW ($p = 0,033$) em 89 pacientes que completaram 4 meses de seguimento (OR=2,0; IC 95%=1,2 a 3,5). A média do TIF nos dois grupos foi semelhante (UW= 579,2 min.; HTK= 527,9 min. $p > 0,05$) e não houve diferenças nas incidências de CVB, DPE e óbito com relação a TIF estratificados entre os grupos. Não houve variação nas medianas das PFH ($p > 0,05$ para BT, AST, ALT, FA, GGT, LDH, Fator 5 e TP). A incidência de óbito foi similar em ambos os grupos: UW= 6 (9,4%) e HTK= 4 (11,1%). A incidências de DPE foi de 2,8% no grupo HTK (1 caso) e 9,4% no grupo UW (6 casos) ($p = 0,15$), dos quais 5 (71,4%) evoluíram para o óbito por não funcionamento primário do enxerto, com ou sem outras morbidades.

Conclusão: As soluções de UW e HTK foram igualmente efetivas na preservação dos enxertos hepáticos de doadores cadavéricos na amostra analisada, considerando-se aspectos clínicos, laboratoriais e sobrevida dos pacientes e dos enxertos. A utilização rotineira da solução de HTK poderá diminuir os custos do TOF. A média de idade maior dos doadores e a utilização de um volume reduzido de solução podem ter contribuído para uma incidência maior de CVB no grupo HTK.

Abstract

Randomized clinical assay for hepatic grafts preservation with UW or HTK solutions in orthotopic liver transplantation.

Meine M H, Zanotelli M L, Neumann J, Kiss G, Grezzana T J, Leipnitz I, Schlindwein E S, Gleisner A L, Fleck Jr. A M, Brandão A M, Marroni C, Cantisani G C.

Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - Brazil

Introduction: The UW solution (University of Wisconsin) has been used as standard for preservation of hepatic grafts for orthotopic liver transplant (OLT) since 1989. Its cost is high, and it does not exist, in our country, clinical studies that compare its effectiveness with other solutions. The HTK solution (histidine-tryptophan-ketoglutarate) was developed initially for cardioplegia, however some experimental studies and retrospective clinical studies had demonstrated its effectiveness in the hepatic preservation, exactly with drawn out times of ischemia.

Objectives: To compare the effectiveness of HTK and UW preservation solutions with regard to graft primary dysfunction (GPD), time of cold ischemia (TCI), complications of biliary tree (CBT), alterations of hepatics functional tests (HFT) and survival.

Method: The livers of multiple organs donors had been implanted in the receivers through the piggyback technique, as chronological order of ingression in waiting list on the period of January 2003 to August 2004. HTK and UW solutions had been used in a block randomized form. The perfusion in aorta was made with 4 liters of HTK or 2 liters of UW and in the portal venous system with 1 liter of both solutions, using additional 500 ml for *ex-situ* venous and arterial perfusion and graft storage. It was performed a hepatic biopsy in wedge of the left side when macroscopic steatosis was present. The biochemist analysis was daily in the first week and, in 15th and 30th postoperative days.

Results: 102 patients submitted to the OLT had been studied; being 65 in group UW (63.7%) and 37 in HTK group (36.3%). The distribution of sex, race, haemodynamic state, use of adrenergic drugs and presence of steatosis in the donors was equal in the two groups ($p > .05$). The average age of the donors was of 38.1 years (SD \pm 14.4) in group UW and of 44.6 years (SD \pm 14.2) in the HTK ($p = .036$). The distributions of sex, race, age, etiology of the cirrhosis, retransplant, grave acute hepatitis, portal thrombosis and Child-Pugh score of the receivers were equal in the two groups ($p > .05$). The HTK group had 8 cases (25.8%) of CBT (4 stenosis, 2 linkages and 2 ischemic type injuries) against 5 cases (8.6%) of group UW ($p = .033$) in 89 patients who had completed 4 months of pursuing (OR=2.0 IC 95%=1.2-3.5). The average of the TCI in the two groups was similar (UW = 579.2 min. and HTK = 527.9 min. $p > .05$) and did not have any impact in the incidences of CBT, GPD or death comparing the groups. There were no differences in HFT variation through the month of data ($p > .05$ for bilirrubins, AST, ALT, AF, δ GT, LDH, Factor 5 and TP) and the occurrence of rejection was similar. The death incidence was similar in both the groups: UW = 6 (9.4%) and HTK = 4 (11.1%). The incidence of GPD was 2.8% in HTK group (1 case) and 9.4% in UW group (6 cases) ($p = .15$), of which 5 (71.4%) had died for primary non function, with or without others morbidities.

Conclusion: The solutions of UW and HTK had been equally effective in the preservation of the hepatics grafts from cadaver donors in the analyzed sample, considering clinical and laboratorial aspects and survival of the patients. The routine use of the HTK solution will be able to diminish the costs of the OLT. The highest age average of the donors and the use of a reduced volume of HTK solution have probably contributed for a higher incidence of CBT in this group.

5. Introdução

5.1. Histórico do transplante hepático

A primeira publicação sobre a realização do transplante hepático data de 1955, quando Welch realizou transplantes de fígado heterotópicos em cães. Embora tivesse êxito em algumas cirurgias, a maioria dos fígados transplantados foi explantada precocemente em virtude de atrofia hepática, decorrente do baixo fluxo de circulação venosa sistêmica proveniente da veia cava inferior (VCI). Como a anastomose da veia porta era feita com a veia cava, esta não proporcionava o aporte sanguíneo fisiológico do sistema portal (1). Em 1958, Moore descreveu a técnica padronizada para realização de transplante hepático ortotópico canino. Um modelo semelhante foi aprimorado por Starzl, que realizara mais de duzentas cirurgias em cães antes de sua primeira tentativa em humanos (2).

O primeiro transplante de fígado em humanos foi realizado por Starzl em 10 de março de 1963. O doador foi um paciente submetido à massagem cardíaca prolongada e o receptor, uma criança de três anos, portadora de atresia de vias biliares e trombose da veia porta. A paciente veio a falecer devido a coagulopatia e ao sangramento que se seguiu antes do término da cirurgia. A perfusão dos órgãos do doador foi feita inicialmente com uma solução de glicose e heparina, seguida de infusão de Ringer lactato. O tempo de isquemia total, até a reperusão do órgão, foi de quase 8 horas (1).

A análise histopatológica do enxerto revelou áreas dispersas de hepatócitos preservados, porém a maioria apresentava autólise. O citoplasma possuía um aspecto borrado e havia ausência nuclear. Os sinusóides e veias centrolobulares mostravam dilatação importante. Por essa análise, Starzl concluiu que um enxerto viável era o fator mais importante para o sucesso do transplante e que algum método de preservação deveria ser instituído logo após a retirada do órgão para evitar a lesão celular irreversível (2).

O segundo transplante em humanos também foi realizado por Starzl, em cinco de maio de 1963. O tempo de isquemia total foi de duas horas e trinta minutos. O paciente sobreviveu vinte e dois dias, mostrando inicialmente sinais de boa função do enxerto. A causa do óbito foi embolia pulmonar associada a sepse. A análise do enxerto obtido na autópsia revelou uma arquitetura hepática preservada, com colestase e esteatose leve, pequenos infiltrados mononucleares em áreas peri-portais e ausência de rejeição (1).

Nos anos seguintes, algumas equipes de transplante de fígado se formaram, porém os resultados iniciais não foram animadores. Pacientes com fígados cirróticos apresentavam tendências a coagulopatia e sangramento, infecções e insuficiência renal no período pós-operatório. Na década de oitenta ocorreu um aprimoramento nas técnicas cirúrgicas, na anestesia, na seleção dos pacientes e nos cuidados pós-operatórios, o que possibilitou uma maior sobrevida dos pacientes transplantados.

Em 1978, Sir Roy Calne iniciou a utilização da ciclosporina no transplante experimental, identificando-a como um potente agente imunossupressor. Thomaz Starzl e sua equipe também demonstraram o efeito benéfico da droga na

sobrevida pós-operatória quando utilizada em associação com esteróide no contexto clínico (3). Um dos marcos na história dos transplantes foi o da popularização da ciclosporina A por Jean Borel em 1980. Esta nova droga, associada a corticoterapia, permitiu uma redução na incidência de rejeição aguda em todos os órgãos transplantados. Até então, os regimes de imunossupressão eram baseados no uso de esteróides e azatioprina, desenvolvidos para o transplante renal (4). O novo impulso despertou o interesse sobre o procedimento em diversas equipes, que retomaram suas atividades. Contudo, apenas em 1983 foi realizada a primeira reunião de consenso promovida pelo National Institutes of Health, onde se estabeleceu que o transplante hepático deixava de ser um procedimento experimental, passando a ter caráter terapêutico (5).

No Brasil, o primeiro transplante hepático foi realizado em 1964, em São Paulo, pela equipe do professor Marcelo Cerqueira, e no Rio Grande do Sul, em 15 de junho de 1991, sob a responsabilidade do professor Guido Pio Craco Cantisani.

5.2. As soluções de preservação de fígado

As soluções de preservação são usadas para manter o órgão em condições adequadas durante o período de sua remoção do doador até o seu implante no receptor. A perfusão do órgão com uma solução fria e armazenamento subsequente, a uma baixa temperatura (4° C), é um método efetivo e simples.

A história de preservação de fígados para transplante começa em 1950, quando o princípio da hipotermia para preservação de órgãos foi descoberto. No final da década de 60, Schalm e cols. fizeram experiências com uma solução de armazenamento fria baseada em protoplasma e alcançaram tempos de preservação hepática aceitáveis em torno de 4 horas (6).

Em 1969, Collins desenvolveu uma solução contendo glicose, fosfato e potássio, que mimetizava o líquido intracelular. A atividade da solução de Collins era baseada na presença de impermeantes, que mantem a integridade das membranas celulares. Este princípio permitiu o aprimoramento de novas soluções de preservação (7).

Em meados dos anos 70, Wall e cols. introduziram o *Cambridge Plasma Protein Fraction* (PPF). Benichou e cols. compararam as soluções de Collins, o PPF e o Ringer lactato; e acharam que as soluções de Collins e de PPF eram superiores ao Ringer lactato na preservação de fígados em estudos experimentais (8).

Uma solução mais simples do que as demais, a Euro-Collins (EC), devido ao baixo custo e simplicidade, tornou-se bastante popular; embora seja menos efetiva do que soluções mais novas. Em 1977, uma solução tampão de fosfato, o *buffered Euro-Collins* (EC), foi introduzida como a solução padrão para preservação de enxerto de rim na Europa. Sua utilização foi amplamente difundida até 1993, quando Eurotransplant Group reavaliou a sua efetividade em um grande estudo multicêntrico, comparando-a com UW e HTK (9).

Na Universidade de Wisconsin, em 1987, Wahlberg, Southard e Belzer desenvolveram uma solução de armazenamento a frio, inicialmente dirigida para o

transplante de pâncreas, mas também utilizada para preservação hepática. Jamieson e cols (10) publicaram, em 1988, dados sobre a preservação de fígados caninos, durante 24 a 48 horas, usando armazenamento frio com solução da Universidade de Wisconsin (UW). Imediatamente depois desta publicação, a solução entrou em uso clínico, e Kalayoglu, de Wisconsin, e Todo, de Pittsburgh, publicaram quase que simultaneamente os seus resultados com tempo de preservação estendido. Nos anos seguintes, sugeriram vários relatórios clínicos de que um tempo de isquemia fria (TIF) de até 24 horas poderia ser usado habitualmente, sem efeitos danosos à função do enxerto (6).

A partir de 1988, a solução de preservação da Universidade de Wisconsin (UW) passou a substituir o EC gradualmente como o fluido de preservação de escolha para órgãos abdominais, obtidos de doadores de múltiplos órgãos.

Enquanto isso, alguns centros europeus passaram a usar também a solução de Bretschneider - HTK para a preservação de rins. Esta foi projetada originalmente para cirurgia cardíaca, mas também provou, através de estudos experimentais, ser uma solução potencialmente utilizável para a preservação de outros órgãos, como fígado e pâncreas (11-14).

O desenvolvimento histórico de solução de histidina–triptofano–cetoglutarato (HTK) data de aproximadamente 30 anos atrás, quando o cirurgião cardíaco F. J. Bretschneider estava procurando uma composição de eletrólitos como base para uma solução de cardioplegia. No início dos anos 70, foi desenvolvido um sistema tampão, biologicamente compatível, com uma alta capacidade tamponante, que usou o aminoácido histidina (15). Em 1978, um

trabalho experimental era dirigido para proteção renal, resultando nos primeiros transplantes de rins humanos perfundidos com a solução de HTK (16).

No início da década de 80, quando ciclosporina ficou disponível para uso comercial em transplantes, um grande número de programas de transplantes de órgãos começou. Na maioria dos centros a solução de EuroCollins (EC) era usada para preservação hepática, sendo possível tolerar no máximo 10 horas de isquemia total. A cirurgia era considerada um procedimento de emergência, e normalmente realizado durante noite. Com a introdução da solução da Universidade de Wisconsin (UW), em 1988, ocorreram mudanças profundas nos procedimentos do transplante hepático. Assim, um procedimento de urgência pôde transformar-se em um procedimento semi-eletivo, possibilitando um maior cuidado no preparo dos receptores, uma dissecação hepática mais tranqüila, anastomoses mais elaboradas e uma hemostasia mais apurada; e conseqüentemente, uma redução nos danos hepato-celulares e uma menor chance de trombose da artéria hepática (17;18).

Entretanto, independente do tipo de solução utilizada, tem sido demonstrado que períodos superiores há dezesseis horas aumentam o risco de disfunção precoce do enxerto. Diversos relatos clínicos têm observado correlação do tempo de isquemia fria prolongados com o surgimento de estenoses biliares tardias (19-23).

5.3. Princípios da preservação de órgãos

O objetivo da preservação de órgãos através de sua perfusão com soluções denominadas equilibradas, usando princípios biológicos gerais de preservação, é proteger órgãos diferentes mantendo em todos a sua heterogeneidade morfológica e bioquímica. Qualquer técnica de preservação deverá promover proteção funcional satisfatória ao órgão, durante o período de interrupção do seu fluxo sanguíneo; desde a sua retirada do doador, até o seu implante e a reperfusão no receptor. Vários fatores, em diferentes momentos, podem afetar a função de um órgão transplantado. Inicialmente, pode haver um dano prévio à retirada, devido a períodos de hipotensão e hipoperfusão no doador. Secundariamente, eventos celulares podem ocorrer durante o período de preservação em isquemia fria e, por fim, a restauração do fluxo sanguíneo no receptor pode ser seguida por dano de reperfusão, devido a uma série de mecanismos microcirculatórios, bioquímicos e imunológicos (24).

Uma logística que permita a retirada segura do fígado, o seu armazenamento adequado e técnicas de preservação, são necessários para manter o órgão em condições ideais. É essencial que a função orgânica, capaz de sustentar a vida, seja restabelecida imediatamente após o órgão ter sido revascularizado (25).

Os princípios gerais de proteção de órgãos em isquemia total podem ser resumidos como: inibição de acidose inevitável (intra e extra-celular) e prevenção de valores de pH críticos; manutenção do volume de todas as células,

especialmente de células endoteliais; regulação do uso de recursos de energia anaeróbios; inibição reversível de processos não vitais; e manutenção de estrutura morfológica, os quais manterão a função dos órgãos prontamente após a sua reperfusão nos receptores (16).

O efeito da hipotermia tem que ser diferenciado do efeito protetor específico de soluções de preservação. A hipotermia é o principal método utilizado para a preservação de órgãos. O resfriamento a uma temperatura entre 0° e 4°C reduz as necessidades metabólicas, evitando os efeitos deletérios do armazenamento a temperaturas abaixo de zero, onde a formação de cristais intracelulares pode produzir dano irreversível. Estudos têm demonstrado que ocorre uma diminuição de cerca de doze vezes na atividade enzimática como resultado da redução na temperatura do fígado de 37° para 0° C. Essa visão, contudo, subestima a complexidade físico-química das interações metabólicas no órgão hipotérmico e os efeitos próprios do resfriamento sobre esses processos interativos. Deve-se levar em consideração os movimentos passivos de íons através das membranas celulares que irão operar sob princípios químicos e termodinâmicos e que mostram uma relação linear com a temperatura. A hipotermia pode provocar falha na homeostase, responsável pela manutenção do volume celular, em comparação ao estado de normotermia, onde bombas iônicas, como a ATPase Na^+/K^+ , exercem um papel fundamental na manutenção dos gradientes intra e extra-celulares (24).

5.4. Isquemia e reperfusão hepática

O uso do termo isquemia significa insuficiência de suprimento sangüíneo. No contexto da preservação de órgãos, isquemia significa a ausência completa da circulação sanguínea. O período de ausência de fluxo sangüíneo (*No-Flow*) leva ao consumo rápido dos fosfatos intra-celulares e diminuição do metabolismo energético por falta de ATP, com conseqüente paralização da bomba de sódio e potássio. Quando a atividade da bomba ATPase Na^+/K^+ está diminuída durante a preservação hipotérmica, os íons sódio irão entrar no citoplasma das células, seguido pelos íons de hidrogênio e por água, resultando em edema e acidose intra-celular. O edema, tanto endotelial como parenquimatoso, leva ao aumento da osmolalidade celular e a sua disfunção. O problema não está somente na baixa disponibilidade de fosfatos ricos em energia em diminuição progressiva, quando comparado ao metabolismo aeróbico, mas também no acúmulo de produtos terminais do metabolismo anaeróbico, com conseqüente declínio do pH tecidual (25;26). A acidose respiratória, por sua vez, pode estar associada a um aumento das lesões hepáticas da isquemia e da reperfusão, sob condições de oxigenação normal ou hiperventilação de modelos experimentais. Em contra partida, a acidose respiratória, sob condições de hipóxia, pode vir até mesmo a prevenir maiores lesões de preservação (27).

Muitas pesquisas experimentais têm observado duas fases distintas de dano hepático após isquemia e reperfusão. Uma fase precoce se desenvolve no curso das primeiras seis horas, enquanto uma fase tardia, se inicia entre quatro e seis

horas e permanece por mais de vinte e quatro horas após a reperfusão. Os danos hepatocelulares que ocorrem na primeira fase manifestam-se por uma elevação dos níveis das amino-transferases. Vários investigadores têm demonstrado que essa fase precoce é mediada através de mecanismos que liberam radicais livres de oxigênio (RLO), através da ativação das células de Küpffer (25;28-31). A fase tardia, no entanto, é mediada pelas interações dos leucócitos com o endotélio, e é caracterizada pelo grande acúmulo de neutrófilos marginados nos capilares, com a invasão intersticial por polimorfonucleares intensificando-se em vinte e quatro horas (32-35).

Após um período prolongado de isquemia, seguido por reperfusão, são caracterizados dois eventos microvasculares distintos, conhecidos como ausência de reperfusão (*No-Reflow*) e reperfusão paradoxal (*Reflow-Paradox*). O primeiro mecanismo, de ausência de reperfusão capilar adequada, é caracterizado por edema endotelial, hemoconcentração, vasoconstrição, aprisionamento de leucócitos e agregação plaquetária. O segundo evento, no qual a reperfusão pode ser ainda mais deletéria, caracteriza-se por aderência de leucócitos, liberação de mediadores tóxicos e perda da integridade endotelial (36;37).

A ausência de reperfusão capilar efetiva, decorrente de períodos prolongados de hipoxemia, pode ser explicada por uma seqüência lógica de eventos. Tanto o interstício, como o próprio endotélio edemaciado, podem provocar oclusão capilar e aumento das pressões de perfusão ao nível da micro-circulação. A diminuição progressiva do pH intra-celular leva à deformidade da parede endotelial e a uma maior rigidez do endotélio. Os leucócitos, e principalmente as hemácias circulantes, também passam a apresentar alterações

estruturais neste meio ácido, favorecendo a diminuição da fluidez sangüínea e ao empilhamento de hemácias (38).

O mecanismo inflamatório do dano de reperfusão no transplante hepático envolve principalmente macrófagos, as células apresentadoras de antígeno localizadas no sinusóides e que têm um nome particular: as células de Küpffer. Existe substancial evidência de que na reperfusão após isquemia fria, essas células entram em atividade minutos após a reoxigenação e que essa atividade está associada com depressão da função hepatocelular (32;33).

Ao nível dos sinusóides hepáticos, as células de Küpffer, que representam cerca de 80% dos macrófagos corporais, também sofrem esses efeitos, respondendo a este processo com a sua ativação e a liberação de citocinas. O aumento da pressão microvascular decorrente da hemoconcentração e do edema endotelial e intersticial leva a subseqüente falha de enchimento da micro-circulação nas fases iniciais da reperfusão (34;39). Assim, o estreitamento da luz sinusoidal dificulta e, até mesmo, pode impedir a passagem dos leucócitos. Os leucócitos estagnados, embora incapazes de ocluir o lúmen sinusoidal, contribuem para a redução do fluxo sinusoidal na microcirculação hepática (35;40). Esse efeito possivelmente prolonga o período de hipóxia, com áreas do fígado permanecendo isquêmicas após o início da reperfusão.

Existe, entretanto, uma possível contribuição de RLO produzidos pelos neutrófilos na falha da micro-circulação, além dos efeitos mecânicos. Dados derivados de experimentos com fígados de cães ilustram a extensão dessas alterações sob condições de hipotermia, quando o conteúdo de ATP sofre uma depleção até chegar a 10% dos valores fisiológicos e o pH reduz-se para 6,8. Os

sistemas de síntese e detoxificação do fígado estão entre os principais consumidores de energia, juntamente com as células miocárdicas e os túbulos renais (26). À medida que os níveis de ATP e o pH se reduzem, ocorre disfunção nas bombas iônicas de sódio e cálcio, dependentes de energia derivada de ATP, com conseqüente influxo desses dois cátions para interior das células. O sódio em excesso exige uma regulação do volume celular, enquanto o cálcio irá atuar no metabolismo das xantinas, com conseqüente formação de RLO intracelulares por ocasião da reperfusão (41). A depleção de fosfatos é acompanhada por um acúmulo de seus produtos de degradação, principalmente hipoxantinas. Essas agem como substrato para a reação da xantina-oxidase, mecanismo formador de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio por ocasião da reperfusão (42).

Muitos RLO são gerados dentro dos hepatócitos pelo acúmulo dos subprodutos de degradação do ATP, com conseqüente acúmulo de hipoxantina e sua posterior conversão a RLO. Porém, o estresse oxidativo, medido em menor grau dentro dos hepatócitos durante a reperfusão, provavelmente reflete a existência de um eficiente sistema de defesa antioxidante dentro dessas células. A formação de RLO parece ocorrer com maior intensidade no compartimento extracelular, onde as células endoteliais e de Küpffer têm mostrado uma participação significativa nos danos hepáticos pós-reperfusão (30;31). O estresse oxidativo é uma condição que reflete um desequilíbrio entre a disponibilidade de oxidantes e antioxidantes. Tem sido demonstrado que a isquemia prolongada, seguida de reperfusão, produz estresse oxidativo devido à excessiva formação de RLO, e que este evento pode iniciar uma seqüência de respostas celulares levando à inflamação. A conseqüência final destes eventos seria a morte celular e

a insuficiência orgânica (35).

O aumento do cálcio intracelular e a formação de RLO levam a um aumento transitório de permeabilidade da membrana interna das mitocôndrias. A passagem de solutos pela membrana provoca a despolarização mitocondrial e a redução das reações de fosforilação, levando a hidrolisação de grandes quantidades de ATP. A depleção de ATP provoca alterações na função e estrutura da membrana plasmática, que culminam com a morte da célula por necrose. As células formam bolhas, aumentam de volume em até cinquenta por cento. As cisternas do retículo endoplasmático se dilatam e ocorre edema moderado das mitocôndrias. Até esse ponto o dano é reversível. Porém, quando as bolhas se rompem, ocorrem falhas de barreira na membrana plasmática, liberação de enzimas intracelulares e metabólitos e, conseqüentemente, colapso de todos os gradientes elétricos e aniônicos (43).

A reperfusão paradoxal apresenta mecanismos complexos, caracterizados por uma sobreposição de eventos que incluem a participação de diversas citocinas, como as interleucinas (IL-8, IL-6 e IL-1), endotelinas, prostaglandinas, leucotrienos, óxido nítrico e TNF-alfa. O aumento das interações entre neutrófilos e endotélio é a sua característica principal.

Inicialmente, ocorre a ativação dos neutrófilos e do endotélio, com diminuição da velocidade dos neutrófilos na circulação e contatos ocasionais com o endotélio. Estes fenômenos são conhecidos como marginação leucocitária e rolamento leucocitário, respectivamente. Este último evento é mediado pelas selectinas, moléculas de adesão celular. A L-selectina é um receptor expresso continuamente sobre os leucócitos, e pode ter sua expressão rapidamente aumentada. A P-

selectina e a E-selectina são encontradas na superfície de plaquetas e do endotélio, respectivamente; e somente se expressam quando o endotélio está ativado, como na isquemia e na reperfusão. A segunda fase é caracterizada pela adesão firme do leucócito ao endotélio, através da interação de β -integrinas do leucócito (CD11 e CD18) com imunoglobulinas do endotélio, principalmente a sICAM-1 e sVCAM-1 (44). A migração para o interstício através da membrana basal endotelial é o passo seguinte. Esse mecanismo seqüencial: de marginação leucocitária, rolamento frouxo, adesão firme e migração intersticial, ocorre tanto nos sinusóides hepáticos como nas vênulas pós-sinusoidais. O aumento da expressão dessas moléculas de adesão pode ser induzido por citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF-alfa e a IL-1, e também por RLO (34;45).

Embora a interação leucócito-endotélio tenha seu início ainda na fase de isquemia, uma contribuição significativa somente é encontrada depois de transcorridas algumas horas de reperfusão. Esse tempo é necessário para que ocorra a aderência de neutrófilos ao endotélio das veias pós-sinusoidais, migração, liberação de mediadores pró-inflamatórios no tecido e lesão às células do parênquima hepático (30;31). A consequência final da reperfusão paradoxal é a desintegração do revestimento endotelial, com formação ainda maior de edema intersticial devido à ação citotóxica de RLO e mediadores liberados pelos leucócitos aderentes ativados, como peroxidases e proteases (37). A peroxidação lipídica das membranas basal e citoplasmática produz a desintegração da membrana basal endotelial e a perda da integridade celular endotelial, com consequente aumento da permeabilidade vascular e do edema intersticial. O desarranjo do endotélio sinusoidal, observado após preservação fria, deixa os

hepatócitos acessíveis aos neutrófilos; enquanto uma camada endotelial intacta necessita de migração através de suas fenestrações, mediada por receptores expressos em suas membranas (46). Os neutrófilos que passam ao interstício irão ampliar a reação inflamatória, através de liberação de mais TNF, citocinas e fatores quimiotáticos.

5.5. Disfunção primária do enxerto hepático (DPE)

Muitos esforços têm sido feitos para aumentar o número de doadores e diminuir os óbitos em lista de espera para transplante hepático. Tentativas com enxertos parciais de doadores vivos e o transplante para dois receptores com o fígado bipartido (*Split liver*) têm sido realizadas. Com este objetivo, passaram a ser utilizados enxertos considerados insatisfatórios, devido a características desfavoráveis, tais como a idade avançada dos doadores, presença de esteatose, uso de doses altas de drogas vasoativas, paradas cardíacas revertidas, sepse controlada ou internação prolongada em Unidade de Tratamento Intensivo (UTI). Esses órgãos, considerados marginais, apresentam uma frequência elevada de disfunção primária (DPE) em relação aos órgãos considerados como ideais (47). A DPE pode ser definida como a situação de risco de vida em detrimento de função hepática debilitada que requer transfusão de componentes de sangue, tratamento prolongado em UTI devido à deterioração clínica, elevação persistente de ALT, AST, LDH, GGT, BT em duas ou mais ocasiões durante a primeira semana depois de transplante (48). Esta definição de DPE incluiu fígados que se recuperam

depois de tratados, que tiveram uma disfunção inicial, como também, enxertos permanentemente não-funcionantes.

Do ponto de vista semântico, podemos dividir a disfunção dos enxertos em duas síndromes com comportamento distinto.

A síndrome de não funcionamento primário (NFP) é caracterizada por acentuada e persistente elevação nos níveis de transaminases, coagulopatia refratária, acidose láctica, hipoglicemia e insuficiência renal aguda. A ausência completa de função hepática significa que o paciente terá de ser submetido a um re-transplante de urgência. A frequência dessa síndrome é variável, com incidências que variam de 2 a 23%. O NFP tem sido associado aos danos de preservação e reperfusão, que são de maior magnitude nesses enxertos. Uma associação entre o tempo de isquemia e os danos de preservação com a ausência de função primária também foi estabelecida (5;30;48).

A síndrome de disfunção inicial ou precoce do enxerto (DIE) reflete a ausência transitória de função primária. Essa forma de disfunção ocorre entre 7 e 30% dos casos e, na maioria das vezes, o fígado transplantado se recupera satisfatoriamente, embora apresente, inicialmente, uma elevação anormal das provas de função hepática e coagulopatia. Exames bioquímicos revelam um TP menor do que 50% e níveis de ALT e AST maiores do que 2000 U/L nos primeiros 5 dias pós-transplante. De qualquer forma, esses pacientes apresentam tempos de internação em UTI significativamente maiores, episódios de rejeição aguda e complicações nas vias biliares mais freqüentes; com conseqüente redução na sobrevida do enxerto, maior morbidade e mortalidade no pós-transplante (48;49).

5.6. Solução da Universidade de Wisconsin (UW) / Belzer /

Viaspan®

O esforço de pesquisa contínuo, encabeçado por um dos pioneiros de preservação de órgãos, Folkert O. Belzer, resultou no desenvolvimento de uma solução de preservação que introduziu, na década de oitenta, três novas filosofias, ou seja, novos substratos para o metabolismo anaeróbico.

A concentração osmótica já não necessita ser mantida através de glicose metabolicamente ativa, sendo alcançada de forma eficiente pela administração de substratos metabolicamente inertes, como o lactobionato e rafinose. O lactobionato substitui o íon cloreto e, em combinação com o trissacarídeo rafinose, é efetivo em prevenir o edema celular. A administração adicional de um portador de colóide, a *hydroxyhetylstarch* (HES) também previne o edema celular. A adição de anti-radicais livres de oxigênio, como glutatião, alopurinol, e adenosina previne o estresse oxidativo intra e extra-celular. Trabalhos iniciais mostraram o papel independente dos componentes da solução UW, sendo demonstrados como de maior importância o lactobionato, a rafinose e o glutatião; este último desempenhando um papel central como antioxidante (50).

Esta solução provou garantir tolerância de isquemia fria prolongada extrema, de 72 horas em rins e de 48 horas em fígados caninos (10). A solução de UW também foi testada prospectivamente em um estudo multicêntrico europeu para transplante renal, onde foi considerada superior a EC, diminuindo a taxa de disfunção do enxerto de 33% a 23% (9). No momento, UW é considerado a solução de preservação padrão para fígados, rins e pâncreas em nosso meio e em

centros de transplantes norte americanos. As tentativas para usar UW para preservação de coração e pulmão não são convincentes.

5.7. Solução de Histidina-Triptofano-Cetogluturato (HTK) /

Bretschneider / Custodiol ®

A solução de Histidina-Triptofano-Cetogluturato (HTK) foi introduzido por H.J. Bretschneider, de Göttingen, Alemanha, que estava interessado em desenvolver uma solução fisiológica para cardioplegia. A filosofia básica desta solução é a introdução de um sistema de tampão muito potente a base do aminoácido histidina junto com dois outros substratos, o triptofano e o glutarato. A solução de HTK tem uma viscosidade muito baixa e, de acordo com Bretschneider, deveriam ser aplicados volumes altos (cerca de 20 litros) com fluxo baixo (50 mmHg) para garantir o equilíbrio à perfusão. O Custodiol ® é uma solução que contém baixos níveis de sódio, potássio e cálcio. O mecanismo de preservação se dá através da inativação do metabolismo celular em decorrência da retirada de sódio e cálcio do meio intra-celular em combinação com o tamponamento do meio extra-celular, pela presença da histidina e dos cloretos de histidina, lavando a um prolongado estado de tolerabilidade isquêmica. Além disso, o triptofano oferece proteção e equilíbrio às membranas celulares e aumenta a capacidade de tamponamento. O alfa-cetogluturato serve como substrato para a produção de anaeróbica de energia durante o período de indução isquêmica. O manitol, por sua vez, funciona com agente osmótico no meio extra-celular, neutralizando o edema celular.

A solução de HTK foi testada em estudos clínicos. O *Eurotransplant Group* administrou um estudo multicêntrico randomizado que comparou UW contra HTK, e os resultados mostram mesma eficácia considerando o desfecho de disfunção primária de enxerto renal, sobrevida dos pacientes e dos enxertos (9). O seu uso clínico em preservação hepática é documentado por experiências de centros isolados, que mostram a mesma segurança e perfil de eficácia semelhante ao UW no período de tempo inferior a 12 horas de isquemia fria. (71;73)

A **Tabela 1** resume as principais diferenças na composição das soluções de preservação aqui citadas.

Tabela 1

Composição das soluções de EC, HTK, UW

| | EC | HTK | UW |
|--|-----|-----|--------|
| Na ⁺ (mmol/L) | 10 | 15 | 30 |
| K ⁺ (mmol/L) | 115 | 10 | 125 |
| Mg ²⁺ (mmol/L) | 0 | 4 | 5 |
| Cl ⁻ (mmol/L) | 15 | 50 | 0 |
| HCO ₃ ⁻ (mmol/L) | 10 | 0 | 0 |
| HPO ₄ ²⁻ (mmol/L) | 4 | 3 | 0 |
| H ₂ PO ₄ ⁻ (mmol/L) | 15 | 0 | 25 |
| SO ₄ ²⁻ (mmol/L) | 0 | 0 | 5 |
| D-glicose (mmol/L) | 198 | 0 | 0 |
| Manitol (mmol/L) | 0 | 30 | 0 |
| Rafinose (mmol/L) | 0 | 0 | 30 |
| Histidina (mmol/L) | 0 | 180 | 0 |
| Histidina-HCl (mmol/L) | 0 | 18 | 0 |
| Ácido lactobiônico (mmol/L) | 0 | 0 | 100 |
| Hidroxi-etil engomam (g/L) | 0 | 0 | 50 |
| Triptofano (mmol/L) | 0 | 2 | 0 |
| Alfa-cetoglutarato (mmol/L) | 0 | 1 | 0 |
| Adenosina (mmol/L) | 0 | 0 | 5 |
| Glutatião (mmol/L) | 0 | 0 | 3 |
| Alopurinol (mmol/L) | 0 | 0 | 1 |
| Dexametasona (mmol/L) | 0 | 0 | 0.02 |
| Insulina (U/L) | 0 | 0 | 40 |
| Penicilina G (U/L) | 0 | 0 | 200000 |

Leonhart, U; Tytko, B; Exner, M; Barthel F (11).

5.8. Comparando HTK e UW

5.8.1. Estudos experimentais

Os primeiros estudos experimentais envolvendo as soluções de preservação de HTK e UW iniciaram no final da década de 80. Desde então, vários parâmetros foram utilizados e os mais variados resultados obtidos da comparação entre as duas soluções.

A preservação hipotérmica e a reperfusão provocam alterações ultra-estruturais que se tornam mais intensas com o aumento do tempo de preservação. Essas incluem o alargamento das fenestrações endoteliais, vacuolização endotelial, eliminação de porções citoplasmáticas do hepatócito na microcirculação e perda da integridade do endotélio. Este último é provocado por proteases, gelatinases e metaloproteinases (46;51). O lactobionato e o glutatião reduzido, e não o glutatião oxidado, presentes na solução UW, são potentes inibidores de gelatinases. Através das propriedades da histidina, a solução de HTK seria um inibidor da atividade gelatinolítica mais efetivo do que a solução de UW, agindo sobre as enzimas MMP9 e MMP2. O GSH também inibe a atividade das duas enzimas, mas é mais seletivo e efetivo sobre a MMP9 do que a MMP2 (46).

Em 1994, Van Gulik conduziu um estudo em cães, no qual o lobo direito e o lobo esquerdo hepáticos eram perfundidos e preservados separadamente com solução de UW ou HTK (52). A análise microscópica do parênquima, realizada em

24 e 48 horas após a hepatectomia, mostrou edema celular importante, em progressão, em ambos os grupos. O escore de dano hepatocelular imuno-histoquímico usando 5'-nucleotidase (5`NT) evidenciou menor lesão parenquimatosa no grupo HTK (0 e 66%), respectivamente em 24 e 48 horas, do que no grupo UW (5 e 85%). Em um segundo momento do estudo, foram realizados transplantes hepáticos com os fígados reduzidos, sendo que todos os que tiveram TIF de 24 horas apresentara níveis enzimáticos similares e sobrevida de até 8 dias. Curiosamente, e contrariando os resultados da primeira fase da pesquisa, todos os enxertos preservados com HTK por 48 horas (n=5) não sobreviveram mais do que 10 horas; enquanto que no grupo UW (n=6) foi obtida sobrevida média maior do que 6 dias.

Em 1995, den Butter, em um modelo experimental de transplante em coelhos, demonstrou que havia melhor produção biliar, menos edema celular e menor concentração de LDH no perfusato de fígados preservados por 24 horas com UW do que com HTK. Porém, tal observação não era verdadeira para fígados preservados por 48 horas, quando os parâmetros citados eram igualmente ruins em ambos os grupos (53). As mesmas variáveis analisadas em um modelo porcino foram semelhantes nos dois grupos, porém com TIF reduzidos, uma vez que estes animais não toleram 24 horas de preservação (54).

Spiegel conduziu um estudo em ratos onde avaliou a produção de bile no trans-operatório e dosagem de transaminases no pós-operatório por 28 dias. A produção biliar foi significativamente maior no grupo UW do que nos grupos EC e HTK. Apesar de não avaliar tempo de isquemia e sobrevida, estas variáveis foram iguais nos três grupos, bem como os níveis de AST, ALT e bilirrubinas séricos

(55).

Em uma segunda fase deste mesmo estudo, foi realizada uma avaliação morfológica dos enxertos com biópsias após 4 horas de isquemia, 1 hora após reperfusão e em 4 semanas, após o sacrifício dos animais (56). No grupo HTK foi observado menos edema intracelular e intersticial, degeneração gordurosa, necrose intra-lobular e proliferação hepatocelular, do que nos grupos EC e UW, após 4 horas de isquemia. Mesmo após 1 hora de reperfusão não houve indício da ativação das células de Küpffer, que sabidamente tem grande importância no desenvolvimento dos mecanismos de lesão de isquemia e reperfusão hepática. Alterações tardias como proliferação ductular biliar e vascular e alterações sinusoidais apareceram também em menor frequência no grupo HTK. Estes achados levaram os autores a acreditarem que o poder da preservação de órgãos da solução de HTK está contido na diminuição da ativação das células de Kupffer.

Seguindo este mesmo raciocínio, Kinoshita demonstrou em TOF em humanos que a viabilidade das células de Kupffer, isoladas em cultura após desprenderem-se dos sinusóides, diminui em 30%. Já com HTK, a viabilidade dos mononucleares é maior do que 90% após cultura *in vitro* por 48 horas (57).

Visando implementar a fórmula das soluções de preservação, e prevenir danos de isquemia e reperfusão, muitas tentativas já foram feitas com adição de novos substratos cito-protetores. Em 2001, Díliz-Perez propôs a adição de fluorcarbonos (PFC) nas soluções de HTK e UW para preservação de hepatócitos de ratos. A viabilidade celular foi maior no grupo UW após 12 e 24 horas de isquemia ($p < 0.05$); porém, a formação de bolhas de membrana celular também o foi, após 24 e 36 horas ($p < 0.05$), o que denota danos irreversíveis. Os níveis

de LDH do meio extracelular em todos os grupos foram semelhantes em todos os tempos pré-determinados. Apesar destes achados, a adição de PFC não confirmou ser útil para se estender o tempo de preservação além de 24 horas (58).

A utilização prévia, a perfusão de HTK ou UW, de estreptoquinase via portal em ratos em parada cardíaca, demonstrou haver uma distribuição melhor e mais homogênea das soluções de preservação no tecido hepático (59). No entanto, após 24 horas de isquemia, a análise por RNM revelou importantes áreas hipoperfundidas do parênquima hepático. A utilização de HTK ou UW não teve impacto quando a diferenças na produção de bile, dosagem de enzimas no perfusato ou na concentração de ATP tecidual após reperfusão *ex-situ* (59). Para outros grupos de pesquisadores, estes mesmos parâmetros parecem ser constantes tanto com HTK quanto com UW, bem com outros índices indiretos utilizados a nível experimental, como por exemplo, a liberação de fosfatase ácida como representativa da atividade das células de Küpffer (60;61).

5.8.1.1. O endotélio

Os distúrbios micro-circulatórios severos devido aos danos endoteliais e a adesão leucocitária durante o reperfusão dos fígados transplantados são considerados com sérios contribuidores à disfunção precoce do enxerto.

Em um estudo experimental em ratos, os fígados preservados com UW, HTK ou EC foram estudados *in-situ* 1 hora após a reperfusão usando-se vídeo microscopia intravital. Após perfusão simples com 10 ml de solução, a reperfusão sinusoidal teve índices abaixo de 50% nos fígados preservados EC após 8 horas

de preservação. No grupo HTK, este indicador ficou abaixo de 50% após 16 horas de preservação, e permaneceu acima de 70% nos fígados preservados em UW por até 24 horas. A adesão permanente dos leucócitos foi mais intensa nos órgãos perfundidos com HTK após 16 e 24 horas (34% e 50%) comparados àqueles preservados com UW (17% e 33%; $P < 0.05$). Usando um volume da solução de HTK 10 vezes maior do que o peso do órgão durante uma nova série de fígados perfundidos por período equilibrado de 8 minutos, a perfusão sinusoidal (39,6%) e adesão do leucocitária (42,7%) não foram melhorados após 24 horas de preservação. Agora, utilizando-se um volume aproximadamente 40 vezes o do peso do fígado, a reperfusão sinusoidal (70,8%; $P < 0.01$) e adesão leucocitária (24,9%; $P < 0.01$) foram significativamente melhores com HTK do que com UW (62).

Com relação aos danos endoteliais sabidamente causados pela isquemia, estes foram analisados em culturas de células endoteliais hepáticas preservados a 4 °C por 24 e 48 horas com HTK e UW (28). A peroxidação lipídica ocorre de forma intensa em ambas as soluções, podendo ser minimizada com a adição do quelante do ferro deferoxamina, de substratos derivados do óxido nítrico e flavonóides anti-radicais livres de oxigênio. Com relação aos RLO, o meio de incubação com concentrações normais de O₂ parece ser mais deletério aos hepatócitos dos que os meios hipóxicos. As culturas endoteliais, preservadas tanto em HTK como em UW, tiveram uma perda de viabilidade em torno de 60% após 24 horas e de 80% após 48 horas de incubação normóxica. A perda da viabilidade celular foi menor (29% para UW e 13% para HTK) em 24 horas de incubação em meio hipóxico.

Outro estudo experimental comparativo realizado com culturas de células endoteliais umbilicais avaliou alterações ultra-estruturais celulares através de microscopia eletrônica (63). A preservação das estruturas morfológicas endoteliais seria melhor obtida com o uso da solução de UW do que com HTK ou EC. As duas últimas soluções apresentaram maior índice de lesão em mitocôndrias, retículo endoplasmático, membranas nucleares e fibras citoesqueléticas de adesão celular. As mesmas alterações estruturais, com preservação a frio com UW por 6 horas, foram de menor magnitude e prontamente reversíveis após 30 minutos de reaquecimento das culturas (63).

Para analisar eventos precoces de dano de reperfusão no endotélio, alguns autores propuseram a utilização da respirometria de alta resolução para avaliar a função mitocondrial das células endoteliais umbilicais, durante a reoxigenação tecidual, após 4 e 8 horas de preservação a frio. A produção de O₂ foi maior no grupo UW (64 ± 5%) do que no grupo HTK (49 ± 6%); porém, em ambos os grupos a membrana plasmática celular e a membrana mitocondrial permaneceram impermeáveis, demonstrando que a perda da capacidade catalítica respiratória pode ser o defeito mais precoce das lesões de preservação e reoxigenação (64).

Recentemente, um novo estudo utilizando cultura de células endoteliais hepáticas preservadas com UW, HTK e Celsior por períodos variadas de 2 até 48 horas, demonstrou que os níveis de LDH, de ATP e de bromido dimetiltetrazolio (MMT) eram significativamente diferentes entre os grupos. Os autores concluíram que a solução de UW foi superior as demais na preservação endotelial, já a partir de 6 horas de isquemia. Com esta solução, as culturas endoteliais mantiveram níveis intracelulares maiores de ATP e MMT e liberaram uma concentração menor

de LDH, em todas as etapas do período de 48 horas (65).

5.8.1.2. Apoptose

A morte celular seguida por isquemia e reperfusão era geralmente considerada como sendo provocada por necrose. Estudos têm demonstrado a apoptose de hepatócitos e células endoteliais sinusoidais cerca de 6 horas após a reperfusão hepática (66;67). Esse mecanismo pode representar um dos principais danos de reperfusão, pois foi demonstrada correlação entre o número de células apoptóticas com o tempo de isquemia e a viabilidade do enxerto. Em um modelo animal, o número de células endoteliais com apoptose, após 1 hora de reperfusão, aumentou de 22 para 53 em 24 horas. O grau de apoptose em hepatócitos passou de 2%, após 1 hora de reperfusão, para 48%, no decorrer de 24 horas (67).

Em um estudo que avaliou morte celular em fígados de ratos perfundidos com UW, HTK e Celsior, não houve diferença quando ao tipo e a intensidade da morte celular, por apoptose ou necrose, após preservação com as três soluções em diferentes tempos (8,16 e 24 horas) (68). As diferenças ocorreram com relação a outros aspectos, que são parâmetros indiretos, e não precisos, para avaliação de dano de preservação. A produção de bile foi melhor e os níveis de TGO e LDH, dosados no perfusato, foram menores com UW, após 16 horas de isquemia. Apesar da atividade mensurada de LDH e 5'-nucleotidase ser menor *in-situ* com UW, após 24 de isquemia, a dosagem de fragmentos de DNA apoptóticos, no perfusato das três soluções, não variou em qualquer TIF.

5.8.1.3. Depósito de microcristais

A formação de partículas visíveis ou invisíveis, em suspensão, dentro das bolsas resfriadas de solução de UW, tem despertado particular interesse na comunidade transplantadora européia. Há a possibilidade dessas partículas indissolúveis, se acumularem nas bolsas plásticas a baixas temperaturas, tanto na estocagem quanto no transporte da solução. A provável conseqüência disso seria o surgimento de dano nos órgãos preservados e futuras complicações em seus receptores, trazendo uma preocupação irrefutável às equipes transplantadoras. A presença de partículas indissolúveis na solução de UW, e a sua relação com distúrbios micro-circulatórios, foi demonstrada pela primeira vez por Walcher, em 1995, no transplante hepático em ratos (69).

Em um estudo experimental alemão, mais recente, foi demonstrado que todos os órgãos abdominais de ratos perfundidos com UW, que atingira temperaturas abaixo de 0°C, apresentaram depósitos de cristais indissolúveis à espectroscopia. Em contrapartida, utilizando-se solução de HTK a temperaturas de congelamento, não se observou tais depósitos em ácinos pancreáticos, glomérulos, espaços porta, interstício ou ao redor dos pequenos vasos. Utilizando-se um filtro de 40 microm, os cristais podem ser retidos, sem o seu acúmulo no parênquima. De qualquer forma, a utilização deste insumo acabará agregando mais custo ao sistema de perfusão com solução de UW (70).

5.8.2. Estudos clínicos

Em um estudo retrospectivo alemão, Gubernatis (71) encontrou resultados semelhantes para preservação de fígados perfundidos com HTK e UW. A sobrevida dos pacientes em 5 anos foi de 66,5% e 61,7%; a sobrevida do enxerto foi de 57,7% e 49,5%; o percentual de DPE foi de 7,9% e 6,4% e o total de complicações biliares, a longo prazo, foi de 12,8% e 12,2%, respectivamente, para as soluções de HTK e UW.

Em outro estudo, randomizado e multicêntrico, para preservação renal, as soluções de HTK e UW foram comparadas quanto à incidência de disfunção inicial do enxerto, influenciada pela idade do doador e pelo tempo de isquemia fria prolongado (72).

A superioridade da solução de HTK em relação à solução de UW, no que diz respeito à reoxigenação do enxerto, em transplantes de fígado de doadores vivos relacionados, foi demonstrado por Hatano (73). Neste estudo foi utilizada espectrofotometria de hemácias após reperfusão venosa, arterial e ao término do procedimento, para aferir a taxa de saturação de hemoglobina hepática; bem como, controlados vários fatores que afetam deterioração de função de enxerto. Foi demonstrado, claramente, que a recuperação de oxigenação tecidual, depois da reperfusão no grupo de HTK, ocorreu de forma mais rápida, mais regular e homogênea, do que no grupo de UW.

5.8.2.1. Análise de enzimas no perfusato efluente da veia cava

Lange e colaboradores (74) compararam as dosagens de AST e LDH no perfusato efluente pela veia cava, após nova perfusão na mesa fria auxiliar, durante a preparação do enxerto para o implante. A média da atividade das enzimas dos fígados preservados com HTK era duas vezes maior do que com UW; no entanto, não houve correlação significativa entre o tempo de isquemia fria e o valor das enzimas. Também não houve relação com desenvolvimento de DPE, igual nos dois grupos.

O mesmo autor, estudando 50 enxertos hepáticos perfundidos com UW ou HTK, tentou relacionar a concentração de enzimas no perfusato efluente da cava com alterações histológicas e evolução clínica pós-operatória de TOF. Ao contrário das dosagens de ALT e AST, as dosagens LDH não apresentaram correlação com lesão hepática prévia, e tão pouco, pós-reperfusão. Cerca de 58% dos 12 enxertos que tiveram níveis de ALT e AST duas vezes maiores do que as médias (AST 800 U/L com UW e 1700 U/L com HTK e ALT 650 U/L com UW e 1400 U/L com HTK), apresentaram DPE (75). Desta maneira, utilizando técnicas de laboratório ágeis, porém rotineiras, seria possível definir, durante a preparação do fígado para o implante, quais os enxertos com maior probabilidade de disfunção no pós-transplante. Os enxerto considerados marginais, quando reperfundidos na mesa fria com 500 ml de uma ou outra solução, que apresentassem índices de ALT > 4200 e AST > 5100, teriam uma grande probabilidade de não funcionar, e não deveriam ser implantados, evitando o risco de DPE e mudando o prognóstico destes pacientes.

Em contra partida, recente estudo experimental, que induziu lesão hepatocelular, química com tetracloreto de carbono e, inflamatória com óleo de turpentina, em fígados de ratos preservados com UW, observou que as dosagens de AST, ALT e LDH no perfusato eram similares as do grupo controle. Tanto os agentes tóxicos, como a preservação a frio por 8 ou 24 horas, causaram aumentos importantes na produção destas e de outras enzimas, porém, neste contexto, não teria como prever o mal funcionamento dos enxertos (76).

5.8.1.2. Complicações de vias biliares

As complicações biliares pós-operatórias representam uma causa importante de morbidade depois no transplante hepático. A estenose focal, o tipo mais comum de complicação, é freqüentemente vista como um processo cicatricial e inflamatório no local de anastomose da via biliar. Além disso, o estreitamento difuso da via biliar dos enxertos pode ocorrer por lesão isquêmica e por dano de preservação. Conseqüentemente, estes dois tipos de lesão podem acarretar em dilatação dos ductos biliares intra-hepáticos, o que acontece freqüentemente depois de transplantes com enxertos ABO não idênticos. A trombose arterial, invariavelmente, leva a lesão isquêmica de via biliar, até mesmo com necrose de algum segmento (21). As alterações biliares intra-hepáticas e extra-hepáticas, com etiologia indefinida, ocorrem ocasionalmente, podendo representar até 25% de todas as complicações biliares (19).

No trabalho de Kadmon, foi examinado a freqüência, a etiologia e os tipos de complicações de vias biliares intra-hepáticas em 59 transplantes hepáticos,

que tinham sido preservados em solução de UW e acompanhados por pelo menos 3 meses. Alterações de vias biliares assintomáticas estavam presentes em vários casos, tendo sido causadas por problemas cirúrgicos (1 caso), isquemia por trombose arterial (3 casos), ou incompatibilidade do sistema ABO (1 caso). Porém, 67% das alterações biliares (10 casos) aconteceram na ausência destas complicações. Neste grupo, 75% das estenoses biliares coincidiram com TIF prolongada, excedendo 10 horas de preservação fria (19).

Os danos de reperfusão do epitélio biliar já foram estudados através da análise da ultra-estrutura dos canálculos biliares, durante diferentes etapas do TOF: hepatectomia, isquemia fria e após 60 a 90 minutos da reperfusão do órgão. Pequenas mudanças no estado funcional de filamentos do actina foram observadas no epitélio canalicular após isquemia prolongada, mas a morfologia dos canálculos só mudou drasticamente após a reperfusão. A área e o perímetro médios dos canálculos aumentam marcadamente, e há perda significativa no número de microvilosidades biliares por unidade da área canalicular. Os canálculos biliares parecem ser uma das estruturas do fígado mais suscetíveis aos danos de isquemia e reperfusão, o que, por sua vez, explicaria a intensa colestase a qual os pacientes podem apresentar a partir do segundo dia após a cirurgia, com um pico, aproximadamente, entre o décimo e o décimo sexto dia pós-operatório (77).

Um grupo de 134 TOF em 123 receptores foi analisado retrospectivamente por Canelo em 2003, sendo 63 casos com HTK e 71 casos com UW. Comparando os resultados de acordo com dados do pré, do trans e do pós-operatórios de doadores e receptores, os autores não encontraram nenhuma diferença

significativa entre os grupos. Parâmetros como transfusão intra-operatória de plasma fresco congelado, tempo de estada em UTI e danos isquêmicos em biópsias dos enxertos, não foram diferentes. A incidência de complicações e a taxa de sobrevida dos pacientes e dos enxertos foram comparáveis em ambos os grupos. Quanto aos exames laboratoriais, somente a bilirrubina foi mais elevada no grupo de UW. As complicações biliares foram mais acentuadas no grupo UW, com 8 casos, contra 5 do grupo HTK. As lesões biliares do tipo isquêmico (LBI) estavam presentes somente no grupo de UW (78).

O único estudo prospectivo que compara as duas soluções em transplante de fígado inter-vivos em adultos foi conduzido por Testa, em 2003 (79). Neste estudo, UW e HTK foram usados na perfusão dos lobos direitos dos doadores na mesa de fundo auxiliar. Os volumes das soluções foram pré-determinados conforme a volumetria hepática pré-operatória. As dosagens bioquímicas do fígado, as complicações, e a sobrevivência do enxerto e do paciente, com um seguimento médio de 13 meses (DP: +/-7), não apresentaram nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos. A sobrevida dos pacientes e dos enxertos foi de 84% e 80%, respectivamente. Em suma, os autores concluíram que as soluções de UW e HTK são igualmente eficazes no contexto do transplante hepático inter-vivos. A HTK teria uma ligeira vantagem prática sobre a UW, porque não necessita ser removida do enxerto antes da reperfusão. Com relação aos custos, mesmo utilizando-se 1 litro a mais de solução, a HTK torna-se ainda assim mais barata do que a UW (79).

Um estudo multicêntrico prospectivo foi desenvolvido de 1996 a 1999 em quatro centros europeus, e os resultados de 214 pacientes submetido à TOF com

órgãos preservados com HTK foram publicados em 2004 (80). Foi demonstrada uma incidência de DPE de 8.8%, com uma taxa de NFP de 2.3% e DIE em 6.5% dos casos. A sobrevida dos pacientes e dos enxertos em 1 ano foi de 83% e 80%, respectivamente. As complicações cirúrgicas precoces (17%), como sangramento, trombose de veia porta e de artéria hepática, e infecções graves (21%), como sepse, pneumonia e colangite, foram identificadas como fatores de risco independentes para a perda dos enxertos e óbito dos pacientes. O TIF médio nesta série de casos foi de 444 minutos (+/- 224). A incidência de complicações de via biliar foi de 10% após 1 mês, 17% após 3 meses e 28% após 1 ano de seguimento. A lesão mais comum foi do tipo isquêmica (9%), seguida pelas estenoses (7%). Curiosamente, apesar da incidência alta de complicações a curto e longo prazo, os autores ainda usam dreno biliar em T (Kehr), responsável por 4,7% de CVB em 1 ano (80).

6. Justificativa Fundamentada

A solução de Belzer (UW), como é conhecida em nosso meio, é a solução padrão, utilizada pela maioria dos serviços que realizam transplantes de fígado no mundo. A solução de HTK tem sido razoavelmente utilizada em centros transplantadores da Europa, principalmente na Alemanha e Áustria (7;8;16;81). No início da produção desta dissertação não havia relatos do seu uso na América Latina e a literatura internacional não publicara nenhum estudo randomizado e prospectivo.

O custo de importação de 1 litro da solução de HTK é cerca de 60% menor do que 1 litro de solução de UW. Este fato, isoladamente, já nos motiva a comparar ambas as soluções quanto a aspectos clínicos e laboratoriais relacionados ao transplante hepático, os quais sendo superponíveis, favorecem a escolha da solução de HTK por aspectos financeiros, diminuindo os custos do transplante em nosso meio.

7. Objetivos

Avaliar, comparativamente, através de um ensaio clínico randomizado, as soluções de preservação de órgãos de HTK e UW, ao término de pelo menos quatro meses de seguimento, com relação sueguintes variáveis:

1. Disfunção primária de enxerto (DPE)
2. Tempo de isquemia fria (TIF)
3. Alterações de provas de bioquímicas hepáticas (BT, BD, ALT / TGP, AST / TGO, GGT, FA, TP, Fator V e LDH)
4. Complicações de vias biliares (CVB)
5. Sobrevida do receptor
6. Sobrevida do enxerto

8. Pacientes e método

8.1. Delineamento

Estudo do tipo ensaio clínico randomizado, prospectivo, alocando casos de transplante hepático adulto (receptores maiores de 18 anos) realizados no Hospital Dom Vicente Scherer (HDVS) da ISCMPA e transplante hepático infantil (receptores maiores de 12 anos), realizados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), no período de dezembro de 2002 a agosto de 2004.

As variáveis de interesse do estudo são: tipo de solução de perfusão, idade, raça e sexo dos receptores e doadores, uso e dose de drogas vaso ativas e esteatose nos doadores; etiologia da hepatopatia dos receptores (cirrose por álcool, VHB, VHC, criptogênica, autoimune), escore de Child-Pugh, tempo de isquemia fria (TIF), quente (TIQ) e total (TIT), disfunção primária do enxerto (DPE), não funcionamento primário do enxerto (NFP), complicações de vias biliares (CVB) e sobrevida dos receptores e do enxerto. As doenças consideradas complicações da cirrose, como encefalopatia hepática e hemorragia digestiva, não foram especificamente avaliadas neste estudo, pois não perfazem variáveis importantes para os desfechos de interesse, exceto para caracterização da amostra.

8.2. Seleção de doadores (enxertos hepáticos)

No período de dezembro de 2002 a agosto de 2004 foram alocados aleatoriamente 102 fígados de doadores de múltiplos órgãos. Como procedimento padrão, os processos de morte encefálica são notificados pelos hospitais responsáveis a Central de Transplantes do Estado do Rio Grande do Sul. Estes mesmos hospitais são responsáveis pela manutenção dos potenciais doadores em condições clínicas favoráveis em suas UTIs. Após obtenção do consentimento informado de seus familiares, o paciente em morte encefálica passa a ser efetivamente um doador de múltiplos órgãos e o fígado é ofertado ao primeiro paciente da lista de espera, única e cronológica, de transplante hepático. A rotina de avaliação dos potenciais doadores de múltiplos órgãos esta contida no **anexo 1**.

Foram utilizados os fígados de doadores de múltiplos órgãos ofertados pela Central de Transplantes do Estado do Rio Grande do Sul, previamente avaliados para tal fim (protocolo de doação de órgãos e tecidos), de todos os grupos sanguíneos, sem limite de idade, que não apresentaram contra indicação ao transplante. Não foram utilizados fígados de doadores com história de neoplasia maligna ou metastática e com grau de esteatose hepática superior a 60%, comprovado por biópsia.

A **Tabela 2** contém critérios de exclusão do estudo, que necessariamente não contra indicam o transplante de forma absoluta, e perfazem alguns dos itens de uma lista de critérios de marginalidade para aproveitamento dos órgãos.

Outros critérios de marginalidade e de risco relativo para disfunção do enxerto, foram considerados e controlados em uma análise estatística adequada (47). São esses, por exemplo: idade do doador maior que 65 anos, uso de vasopressor em doses altas (dopamina > 10 mcg/kg/min, noradrenalina > 0.3 mcg/kg/min ou uso concomitante de 2 vasopressores), presença de infecção (febre, hemograma infeccioso e foco definido), hipernatremia (sódio > 170 meq/L), hipoxemia ($PO_2 < 70$ mmHg), congestão hepática na inspeção inicial, hipotermia (temperatura de 35 °C), internação prolongada em UTI (> 3 dias) e alterações das aminotransferases hepáticas.

Tabela 2

Critérios de exclusão de doadores

Trauma hepático importante

. lesão de grau 2 ou maior

História de etilismo abusivo recente confirmada

Instabilidade hemodinâmica sustentada peri-operatória

. hipotensão nas 2 últimas horas (PAS < 80 mm Hg).

Parada cardio-respiratória em qualquer momento

Esteatose hepática importante

. maior que 60% em exame de congelação

Colestase, colangite ou isquemia centro lobular (congelação)

Doses altas de vasopressores

. dopamina > 20 mcg/kg/min e ou

. noradrenalina > 0.6 mcg/kg/min

8.3. Seleção dos receptores

A inclusão de pacientes no estudo foi em ordem cronológica, correspondendo à oferta de órgãos pela Central de Transplantes do Estado. A seleção dos receptores foi baseada no sistema ABO de compatibilidade de grupos sanguíneos, conforme a seleção do programa de computador da Central de Transplantes (DATASUS), de acordo com a lista de espera oficial. Os casos de hepatite aguda grave (hepatite fulminante) implicam na realização de TOF em caráter de emergência, sendo estes pacientes listados como prioridade máxima, imediatamente após terem internado em UTI; independentemente do fator tempo de espera em lista ou compatibilidade ABO. Os casos de hepatite fulminante ABO incompatíveis foram excluídos do estudo.

Os pacientes apresentando insuficiência hepática crônica e progressiva, com quaisquer de suas múltiplas complicações, foram incluídos em protocolo de exames para confirmar o diagnóstico e avaliar as condições clínicas tolerabilidade e risco ao transplante hepático, com ênfase nos sistemas cardiovascular e respiratório. Este protocolo também incluiu a pesquisa de anormalidades na circulação portal, da sorologia viral e de neoplasia hepática. Além disso, foi realizada avaliação psiquiátrica e das condições sócio-econômicas dos futuros candidatos. Não sendo identificada contra-indicação nesta avaliação, os candidatos assinavam os termos de consentimento para a realização do transplante. Seus nomes eram encaminhados à Central de Transplantes e então permaneciam em lista de espera, realizando visitas periódicas, até o surgimento

de doador com compatibilidade sanguínea, conforme as diretrizes da lista única em vigor no país.

Dessa forma, com o doador de múltiplos órgãos já alocado, o receptor era chamado para a internação hospitalar imediata. Na internação, eram realizados a anamnese e o exame físico completo, coleta de sangue para exames de bioquímica, hematologia, coagulação, novos marcadores virais e radiografias de tórax e de seios da face; bem como paracentese diagnóstica, quando na presença de ascite suspeita de PBE. Confirmada a ausência de qualquer infecção que contra indicasse o transplante naquele momento, o paciente era então encaminhado ao centro cirúrgico; já estando o enxerto preservado a sua espera.

Os casos foram distribuídos em cada grupo de estudo (UW ou HTK), conforme a demanda de oferta de órgãos, através de randomização pelo sistema de listagem em blocos do programa de computador PIP 3, no momento da comunicação da doação à equipe. A amostra consecutiva foi utilizada quando a retirada de pâncreas foi realizada concomitantemente; uma vez que, até o momento, é imperativo a perfusão deste órgão com solução de UW. Conforme as leis brasileiras, todo o doador com idade de até 45 anos, deve ter o pâncreas ofertado para transplante conjugado com rim, o que limita o uso da solução de HTK para doadores desta faixa etária.

O termo de Consentimento Informado (**Anexo 2**) foi exposto para os pacientes no período pós-operatório, durante a sua estada na enfermaria ou após a alta, durante o atendimento ambulatorial. Optou-se por este momento, para a consulta e adesão dos pacientes ao estudo, com o intuito de se evitar o caráter

coercivo e condicional que a assinatura do termo no período pré-operatório poderia ter com o ingresso em lista e a realização do TOF.

8.4. Preservação dos órgãos e procedimentos cirúrgicos

8.4.1. Cirurgia de retirada de fígado para transplante

A cirurgia de captação de múltiplos órgãos foi realizada em hospitais da capital e do interior do Estado, utilizando-se uma técnica de ampla dissecação do pedículo hepático. Para profilaxia antibiótica, foram utilizados cefotaxime (1g) e vancomicina (1g), em infusão endovenosa, imediatamente antes da incisão, conforme rotina seguida pela equipe. A descrição de técnica operatória utilizada neste procedimento esta descrita no **anexo 3**.

Os dados epidemiológicos, hemodinâmicos e anatômicos do doador, bem como seus exames laboratoriais (provas de função hepática, eletrólitos, marcadores virais) e intercorrências (presença de infecção, tempo de internação em UTI, trauma) foram anotados em formulário específico padrão (**anexo 4**); e posteriormente transcritos para o formulário de pesquisa.

8.4.2. As soluções de preservação

O volume utilizado para a perfusão *in-situ*, pela aorta canulada, foi diferente para uma e outra solução, baseando-se nos princípios físicos químicos de cada uma delas. Usualmente, a literatura recomenda o uso de pelo menos 8 litros de HTK para a perfusão de todos os órgãos abdominais. Já o laboratório fabricante, preconiza o consumo de 300 ml da solução por quilo de peso do doador de múltiplos órgãos, ou seja, cerca de 20 litros do seu produto para um doador de 70 Kg. No entanto, utilizamos o volume 4000 ml para perfusão arterial, via aorta abdominal e 1000 ml para perfusão portal, via veia mesentérica superior, o que já foi suficiente para obtermos um perfusato de aspecto límpido, com baixa concentração de hemácias vista à olho nu.

Inicialmente, a solução de UW foi introduzida no nosso meio de forma a ser utilizada com volumes de até 8 litros para perfusão das vísceras abdominais. Devido ao altíssimo custo da solução, foi-se diminuindo paulatinamente o volume a ser utilizado, até o limite de 2 litros para perfusão arterial, 1 litro para perfusão venosa e 1 litro para estocagem do enxerto, perfazendo o total de 4000 ml. Não havendo relatos de prejuízo à preservação e ao posterior funcionamento dos enxertos com volumes menores, o SUS padronizou assim o uso do UW para transplante hepático e assim procedemos neste estudo.

Depois de retirado, cada órgão recebeu mais 1000 ml de solução designada a ele, sendo 500 ml através da veia porta, e 500 ml pela artéria

hepática. O órgão era então embalado, junto com o perfusato refluído pelas veias supra-hepáticas, *ex-situ*.

Tabela 3

Volumes e vias de infusão das soluções de preservação

| | Aorta abdominal | Veia mesent. superior | Veia porta (<i>ex situ</i>) | Artéria hepática (<i>ex situ</i>) |
|-----|-----------------|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| HTK | 4 litros | 1 litro | 500 ml | 500 ml |
| UW | 2 litros | 1 litro | 500 ml | 500 ml |

8.4.3. A cirurgia de bancada

Sob uma mesa cirúrgica especial, com um sistema de resfriamento a gás freon em espiral de cobre, mantendo-se a temperatura controlada por um termostato, entre 0 e 4 °C, preparava-se o fígado para o implante. A veia cava supra-hepática era dissecada, sendo ressecado o excesso de tecido perivascular e suturando-se os orifícios das veias frênicas e supra-renal direita com Prolene 5.0. O mesmo ocorria com a artéria hepática e veia porta, onde o excesso de tecido perivascular era retirado e os orifícios de pequenas ramificações ligados com Prolene 6.0. As artérias esplênica e gástrica esquerda e a veia gástrica eram revisadas e tinha suas ligaduras refeitas se necessário fosse. Os linfonodos pericoledocianos eram removidos e os vasos linfáticos ligados; porém, evitando-se

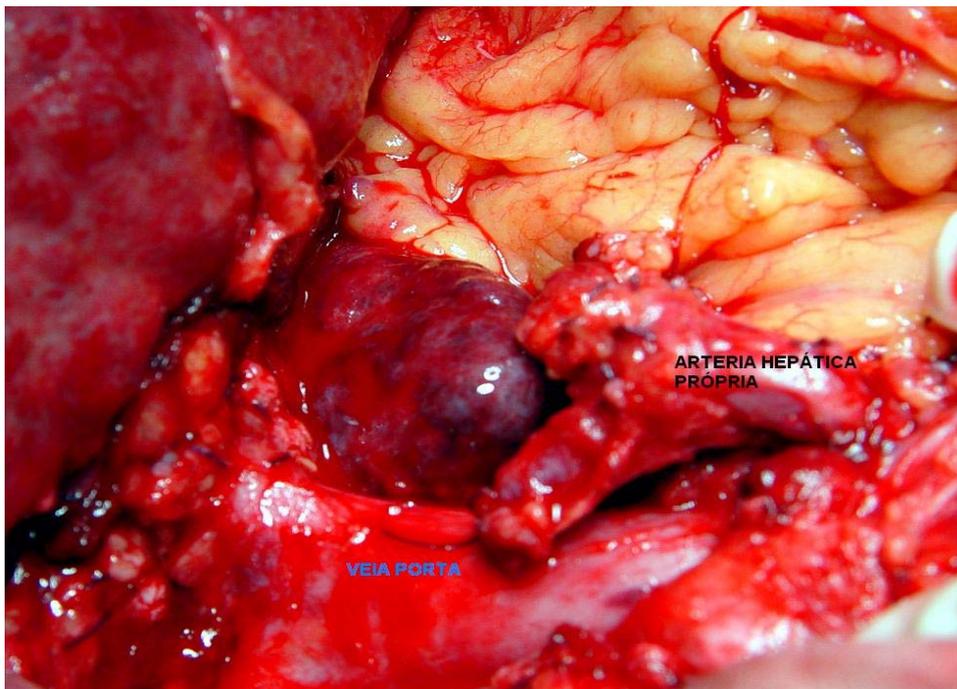
desvascularizar a via biliar extra-hepática. Uma sonda de Nelaton de 14 F era colocada através da VCI infra-hepática para coleta de exames no trans-operatório e a veia era fechada com sutura contínua de Prolene 4.0.

Entende-se como perfusato a solução que drenou pelo sistema das veias hepáticas para a cava do enxerto imediatamente após a infusão de qualquer solução pelo sistema venoso portal ou arterial hepático. O perfusato, a ser analisado nesta dissertação, é o líquido efluente imediatamente drenado pela VCI do enxerto após sua lavagem com Ringer lactato, antes da reperfusão venosa.

8.4.4. A cirurgia do transplante hepático

As cirurgias de implante hepático foram realizadas no bloco cirúrgico do HDVS e no do HCPA (2 casos), utilizando-se da técnica habitual de preservação da cava retro-hepática do receptor (*Piggyback*). Não foram incluídos no estudo aqueles casos onde o transplante foi realizado pela técnica clássica, com ressecção da cava do receptor com ou sem circulação extra-corpórea cavo-axilar.

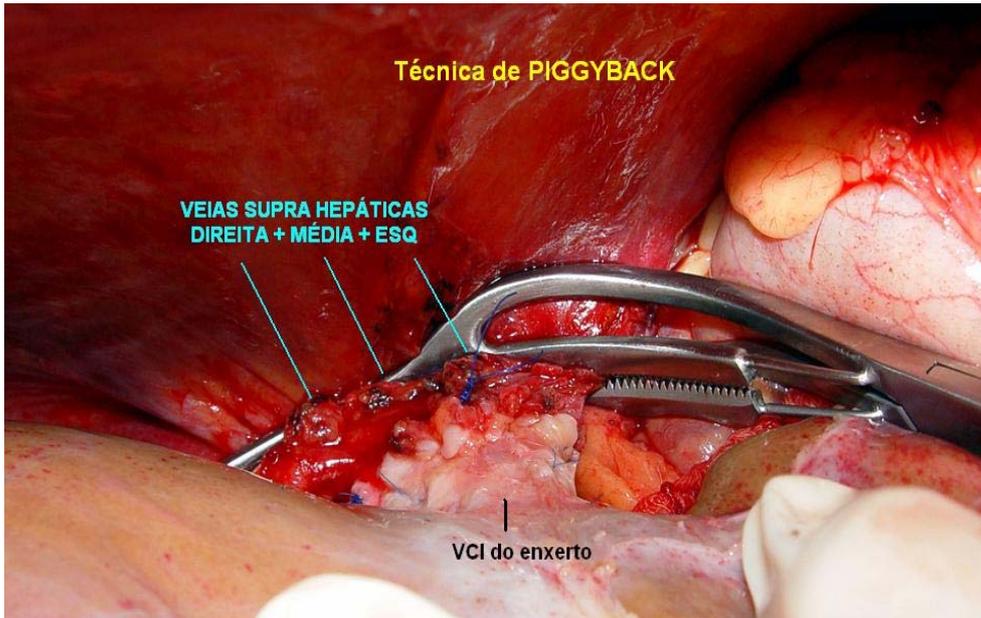
A técnica cirúrgica empregada está descrita com detalhes no **anexo 5** e pode ter alguns dos seus passos principais observados nas **Fotografias 1, 2, 3, 4, 5**.



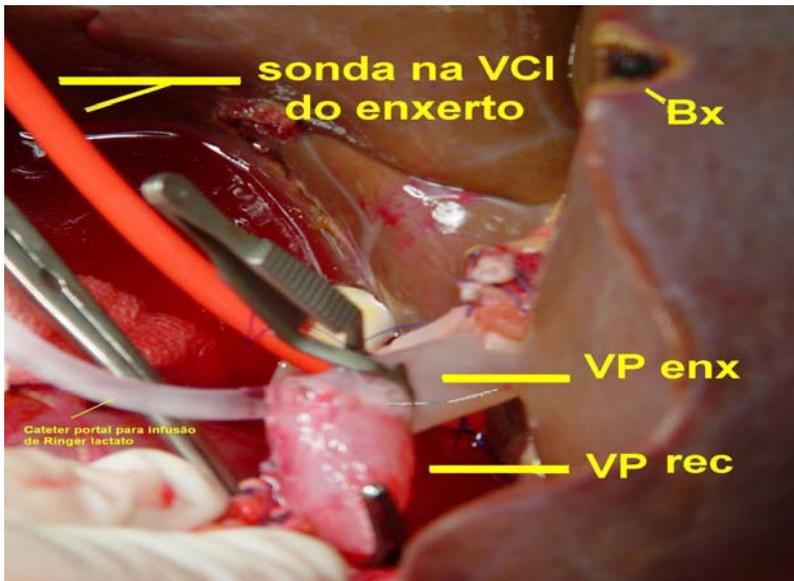
Fotografia 1. Dissecção do pedículo hepático no TOF

Antes da reperfusão venosa, os primeiros 20 ml de perfusato que eram drenados pelo sistema cava do enxerto foram coletados para serem dosados os níveis de enzimas (ALT, AST e LDH) no efluente inicial de solução de preservação (t0). A colocação prévia de um cateter de 14 F no coto distal da veia cava inferior do enxerto possibilitou a sua aspiração, sem contato com o peritônio (**Fotografia 3**).

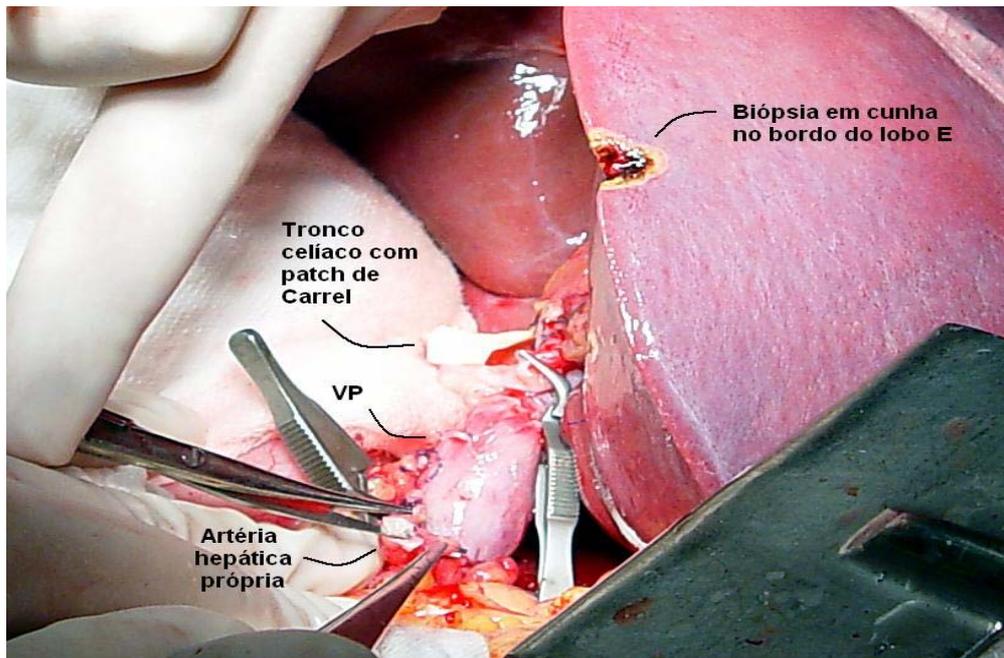
Imediatamente após a reperfusão portal, uma nova amostra de 20 ml de sangue foi coletada pelo mesmo cateter implantado na cava do enxerto (t1). Iniciada a reperfusão portal, considerou-se o término de tempo de isquemia quente (TIQ). Após a revascularização arterial do enxerto, considerou-se como término do tempo de isquemia total (TIT).



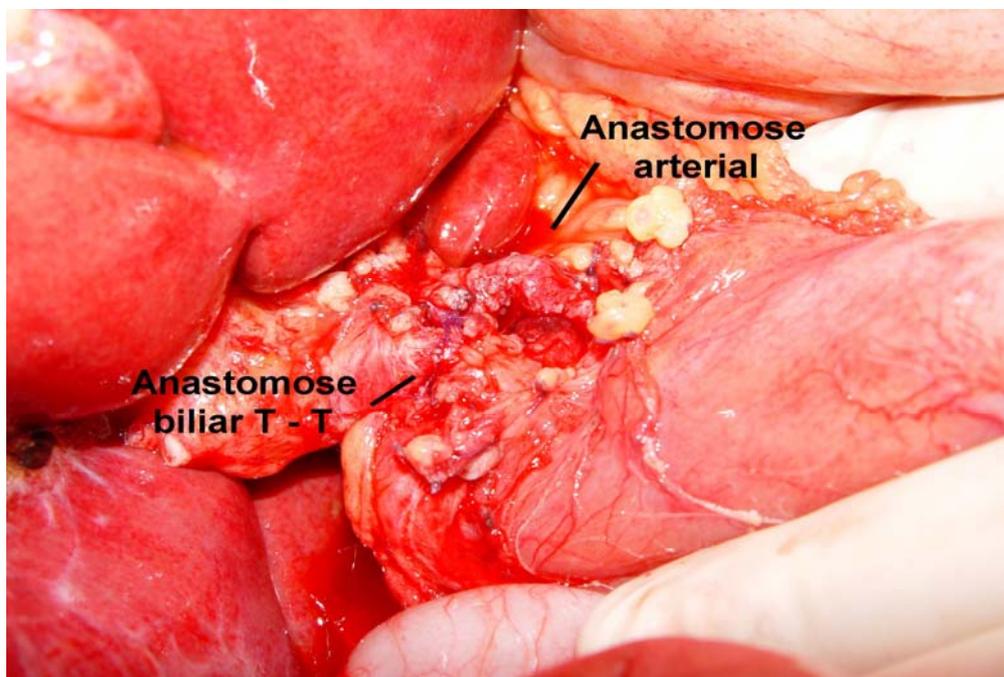
Fotografia 2. Técnica de TOF com preservação de VCI do receptor



Fotografia 3. Anastomose portal e lavagem do enxerto com Ringer lactado antes da reperusão



Fotografia 4. Preparação para a anastomose arterial após a reperfusão venosa



Fotografia 5. Anastomose biliar concluída no TOF

8.4.5. O pós-operatório

Ao término do procedimento, o paciente era encaminhado à UTI para recuperação anestésica e acompanhamento da função inicial do enxerto, bem como o diagnóstico precoce de complicações. As coletas de bilirrubinas, AST, ALT, FA, GGT, fator 5 e TP de veia periférica eram então iniciadas durante a primeira hora da chegada na UTI. Durante sete dias consecutivos novas amostras eram coletadas no primeiro horário da manhã conforme rotina da UTI. As coletas do 15º e 30º dias eram realizadas na enfermaria ou já a nível ambulatorial.

Os métodos e valores de referência das enzimas hepáticas e provas de coagulação estão especificados na **Tabela 4**. As especificações, suas implicações e o comportamento bioquímico destes marcadores biológicos estão descritos no **Anexo 6**.

A avaliação complementar dos enxertos foi feita por ecografia com *doppler* a cores dos vasos abdominais no 1º e 7º dias do pós-operatório, visando à detecção precoce de trombose de artéria hepática ou da veia porta.

A imunossupressão foi realizada com esteróides, iniciados na fase anepática da cirurgia do receptor, e com tacrolimus, iniciado no primeiro dia de pós-operatório em todos os pacientes. Conforme a evolução clínica e laboratorial e em suspeitando-se de rejeição celular aguda, introduzia-se micofenolato mofetil, em média a partir do 12º dia.

Foram considerados, como critérios de não funcionamento primário (NFP) do enxerto, níveis séricos persistentes de AST maiores do que 1500 U/L e/ou ALT

maiores do que 2500 U/L nos primeiros cinco dias de transplante, combinado a um TP menor que 50% ao término do quinto dia. O diagnóstico de NFP ainda é composto pela necessidade de transfusão de fatores de coagulação e de re-transplante hepático, em caráter de urgência, no decorrer da primeira semana (82).

Tabela 4

Equipamentos e métodos para a mensuração dos exames laboratoriais

| Exames | Equipamentos | Método | Valores de referência |
|---------|---------------------|-----------------------------|-----------------------|
| BT | AD VIA 1650 - Bayer | Cinético automatizado | 1,2 a 0,8 U/L |
| BD | AD VIA 1650 - Bayer | Cinético automatizado | 0,6 a 0,2 U/L |
| AST | AD VIA 1650 - Bayer | Cinético automatizado | 14 a 42 U/L |
| ALT | AD VIA 1650 - Bayer | Cinético automatizado | 10 a 43 U/L |
| FA | AD VIA 1650 - Bayer | Cinético automatizado | 32 a 122 U/L |
| GGT | AD VIA 1650 - Bayer | Cinético colorimétrico | 5 a 45 U/L |
| TP | ST4 - Bayer | Coagulométrico automatizado | 70 a 120 % |
| Fator 5 | ST4 - Bayer | Coagulométrico automatizado | 70 a 140 % |

8.4.6. Análise estatística

Os dados coletados foram analisados pelo programa de computador SPSS, versão 10.0 e Epi Info 6.04.

O cálculo de tamanho de amostra, o qual foi realizado para obter-se um $p\beta > 0.80$ e um $p\alpha < 0.05$, determinou no mínimo 45 casos em cada grupo, constituindo assim um poder estatístico significativo ao estudo.

Os dados demográficos dos doadores e dos receptores de cada grupo foram avaliados através do teste t de Student para variáveis contínuas ou de Qui-Quadrado, para as variáveis categóricas. As demais variáveis categóricas de desfecho de interesse foram analisadas pelo teste Exato de Fisher, quando indicado. Como a análise preliminar dos grupos não foi significativamente diferente, confirmando-se uma adequada da randomização, optou-se pela não realização de uma análise multivariável.

As comparações dos níveis de bilirrubinas, AST, ALT, FA, GGT, LDH, TP e fator V, entre os grupos, foram realizadas pelo teste não paramétrico “U” de Mann-Whitney, aplicado a variáveis quantitativas sem distribuição normal, através de transformação logarítmica, quando indicada.

As incidências de DPE, óbito e CVB, nos dois grupos de interesse, foram analisadas por um modelo regressão de logística bivariada. A probabilidade de sobrevivência dos pacientes e dos enxertos foi calculada pelo método de Kaplan-Meier (análise de sobrevida).

9. Resultados

Foram estudados 102 pacientes submetidos ao TOF, sendo 65 no grupo UW (63,7%) e 37 no grupo HTK (36,3%). Na **Tabela 5** estão contidas as características da amostra de doadores e de enxertos hepáticos preservados com HTK e UW. As características da população de receptores em estudo esta demonstrada na **Tabela 6**.

A distribuição de sexo e raça de doadores e de receptores foi semelhante nos dois grupos ($p > ,05$). A média de idade dos doadores no grupo UW foi de 38,1 anos (DP $\pm 14,4$) e no grupo HTK de 44,6 anos (DP $\pm 14,2$), com $p < 0,036$. A esteatose hepática esteve presente nos doadores de forma semelhante nos dois grupos de estudo: 18,9% no grupo HTK e 20,3% no grupo UW ($p > ,05$). A estratificação em três subgrupos distintos conforme o grau de esteatose, determinado pelo patologista em exame anátomo-patológico de congelação, também não determinou diferença entre os grupos (**Tabela 5**). A esteatose inferior a 30%, esteve presente em 9,4% no grupo UW e 8,1% no HTK. A esteatose de 30% a 60% foi encontrada em 10,9% no grupo UW e 10,8% no grupo HTK ($p < 0,64$). A utilização de noradrenalina ou de dopamina ou ainda a combinação e mesmo a concentração destas drogas vaso-ativas não variou entre os grupos. Todos os doadores mantiveram PAM superior a 70 mmHg no período peri-operatório da hepatectomia para transplante, não fazendo hipotensão sustentada por mais de 2 horas .

No grupo em que foi utilizada a solução de UW, 64,6% dos receptores eram homens, com idade média de 49,9 anos (DP +-14). No grupo em que o fígado foi preservado com HTK, 62,2% dos receptores eram homens, com idade média de 51,4 anos (DP +- 12). Houve um caso de re-transplante alocado para cada grupo e um caso de hepatite fulminante, ou aguda grave, no grupo UW e dois casos no grupo HTK. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos quanto à etiologia da doença hepática e classificação de gravidade da doença hepática, pelos critérios do escore de Child-Pugh. O grupo UW teve 55,4% de pacientes com cirrose por VHC e o HTK 64,9%, porém este grupo não

Tabela 5

Dados comparativos dos doadores de fígados preservados com HTK ou UW ($p\alpha > 0.05$)*

| | HTK | UW | total |
|----------------------------|-------------------|-------------------|------------|
| Gênero | | | |
| feminino | 12 (32,4%) | 25 (39,0%) | 37 (36,3%) |
| masculino | 25 (67,6%) | 40 (61,0%) | 65 (63,7%) |
| Cor | | | |
| brancos | 27 (72,9%) | 44 (67,7%) | 71 (69,6%) |
| negros | 03 (8,1%) | 02 (3,1%) | 05 (4,9%) |
| ignorados | 07 (19,0%) | 19 (29,2%) | 26 (25,4%) |
| Idade média (anos)* | | | |
| DP | 44,6 (+- 14,2) | 38,1 (+- 14,4) | 41,3 |
| Esteatose hepática | | | |
| ausente | 30 (81,1%) | 51 (79,7%) | 81 (80,2%) |
| < 30% | 03 (8,1%) | 06 (9,4%) | 09 (8,9%) |
| 30% a 50% | 02 (5,4%) | 06 (9,4%) | 08 (7,9%) |
| 60% | 02 (5,4%) | 01 (1,5%) | 03 (3,0%) |

* exceto para idade: $p\alpha = 0.036$

apresentou nenhum caso de cirrose alcoólica e teve um número menor de casos de cirrose criptogênica (**Tabela 6**).

Tabela 6

Dados comparativos dos receptores de transplante hepático, nos grupos com soluções de preservação de UW e HTK ($p > 0.05$)

| | HTK | UW | total |
|-----------------------------|------------|------------|------------|
| Gênero | | | |
| feminino | 14 (37,8%) | 23 (35,4%) | 37 (36,3%) |
| masculino | 22 (62,2%) | 42 (64,6%) | 65 (63,7%) |
| Cor | | | |
| brancos | 34 (91,1%) | 56 (86,2%) | 90 (88,2%) |
| negros | 03 (8,1%) | 04 (6,2%) | 07 (6,9%) |
| pardos | 00 (0,0%) | 05 (7,7%) | 05 (4,9%) |
| Idade média (anos) | 51,4 | 49,9 | 50,6 |
| DP | (+- 12) | (+- 12) | |
| Escore Child Pugh | | | |
| A | 04 (11,1%) | 08 (12,7%) | 12 (12,1%) |
| B | 16 (44,4%) | 27 (42,9%) | 43 (43,4%) |
| C | 16 (44,4%) | 28 (44,4%) | 44 (44,4%) |
| Etiologia da cirrose | | | |
| VHC | 24 (64,9%) | 36 (55,4%) | 60 (58,8%) |
| VHB | 07 (18,9%) | 04 (6,2%) | 11 (10,8%) |
| Álcool | 00 (0,0%) | 05 (7,7%) | 05 (4,9%) |
| Viral e alcoólica | 01 (2,7%) | 04 (6,2%) | 05 (4,9%) |
| Criptogênica | 03 (8,1%) | 11 (16,9%) | 14 (13,7%) |
| Outras | 02 (5,4%) | 05 (7,7%) | 07 (6,8%) |
| Hepatite Fulminante | 02 (5,4%) | 01 (1,5%) | 03 (2,9%) |
| Carcinoma HC | 05 (13,5%) | 05 (7,7%) | 10 (9,8%) |
| Re-transplante | 01 (2,7%) | 01 (1,5%) | 02 (1,9%) |

VHC: vírus da hepatite C; VHB: vírus da hepatite B; HC : hépatocelular

A análise bioquímica das transaminases e da desidrogenase láctica no líquido de preservação, drenado pela veia cava imediatamente antes da perfusão (t0), apresentou uma amplitude muito grande de resultados. Da mesma maneira se comportaram as mesmas enzimas imediatamente após a reperfusão (t1), porém com uma amplitude de resultados com variações menores. As medianas de LDH do perfusato e pós-perfusão foram 10243 mg/dl (DP=20337) e 5355 mg/dl (DP=16605), respectivamente, nos pacientes que evoluíram ao óbito; e 7243 mg/dl (DP=8350) e 3612 mg/dl (DP=3755) nos pacientes com sobrevida. ($p\alpha = 0.24$ e 0.16). As medianas de ALT/TGP no perfusato e no sangue pós reperfusão foram, respectivamente, 3137 mg/dl (DP=7722) e 1035 mg/dl (DP=2707) nos pacientes que evoluíram ao óbito; e 2854 mg/dl (DP=3799) e 1029 mg/dl (DP=1677) nos pacientes com sobrevida ($p\alpha = 0.66$ e 0.89). As medianas de AST/TGO no perfusato e no sangue pós reperfusão foram 3815 mg/dl (DP=11782) e 1269 mg/dl (DP=4253) nos pacientes que evoluíram ao óbito, respectivamente; e 4441 mg/dl (DP=4332) e 1574 mg/dl (DP=2032) nos pacientes com sobrevida, ($p\alpha = 0.33$ e 0.75).

Com relação à DPE, as medianas de LDH no perfusato e no sangue pós reperfusão foram 10292 mg/dl (DP=23030) e 10050 mg/dl (DP=18102), respectivamente, nos pacientes que evoluíram com DPE; e 7043 mg/dl (DP=8195) e 3612 mg/dl (DP=3604) nos pacientes se DPE ($p\alpha = 0.24$ e 0.012). As medianas de ALT/TGP no perfusato e sangue pós reperfusão foram 8031 mg/dl (DP=8430) e 4208 mg/dl (DP=2801), respectivamente, nos pacientes que evoluíram com DPE; e 2864 mg/dl (DP=3709) e 1102 mg/dl (DP=1591) nos pacientes se DPE, ($p\alpha = 0.24$ e 0.09). As medianas de AST/TGO no perfusato e no sangue pós reperfusão

foram 11691 mg/dl (DP=12919) e 6157 mg/dl (DP=4213), respectivamente, nos pacientes que evoluíram com DPE; e 4219 mg/dl (DP=4156) e 1474 mg/dl (DP=1902) nos pacientes sem DPE ($p\alpha = 0.22$ e 0.04).

Por conseguinte, não foi possível demonstrar nenhuma associação entre o nível destas enzimas no perfusato (t_0) com disfunção do enxerto ou óbito. No entanto, as dosagens do sangue da VCI do enxerto imediatamente após a reperusão (t_1), demonstram uma associação com AST/TGO, e não ALT/TGP, com disfunção de enxerto no pós-operatório de TOF (**Figura 1**). Não houve diferença com relação a estas variáveis em relação aos grupos HTK e UW.

Em ambos os grupos, o tempo médio de isquemia fria (TIF) foi semelhante, sendo de 8 horas e 48 minutos no grupo HTK contra 9 horas e 36 minutos no grupo UW ($p\alpha >0.05$), conforme demonstrado na **Tabela 7**, juntamente com os tempos de isquemia quente e total. Este último considerando o tempo até a reperusão arterial.

A evolução seqüencial das provas bioquímicas hepáticas diárias, a partir do pré-operatório, durante há primeira semana, ao término da segunda e quarta semanas, está demonstrada nas **Figuras 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9**. Não houve diferença estatisticamente significativa quanto aos níveis de bilirrubinas, transaminases, GGT, fosfatase alcalina, fator 5, TP e LDH entre os dois grupos ($p\alpha >0.05$).

Tabela 7

Comparação dos tempos médios de isquemia no transplante hepático com soluções de preservação de UW e HTK ($p\alpha > 0.05$)

| | HTK | UW |
|-------------------------|--------|--------|
| tempo de isquemia fria | 527,9 | 579,3 |
| DP | +185,5 | +166,3 |
| tempo de quente | 49,1 | 47,9 |
| DP | +9,3 | +12,1 |
| tempo de isquemia total | 615,8 | 670,3 |
| DP | +182,5 | +168,1 |

Tempos em minutos. DP = desvio padrão

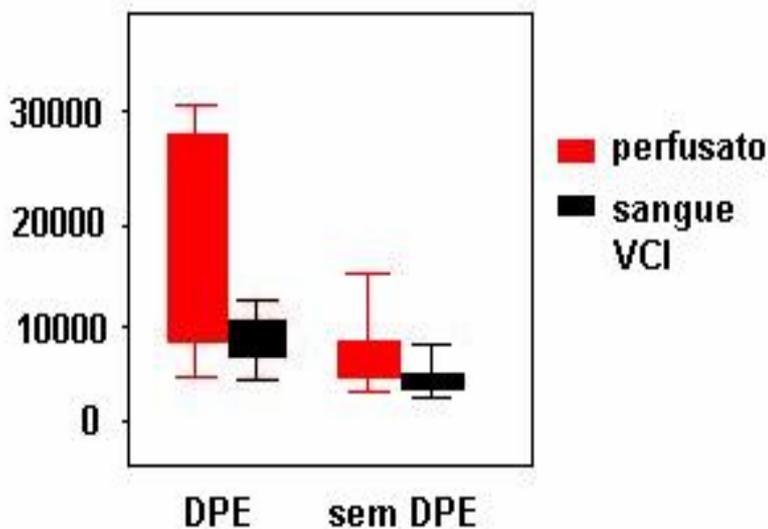
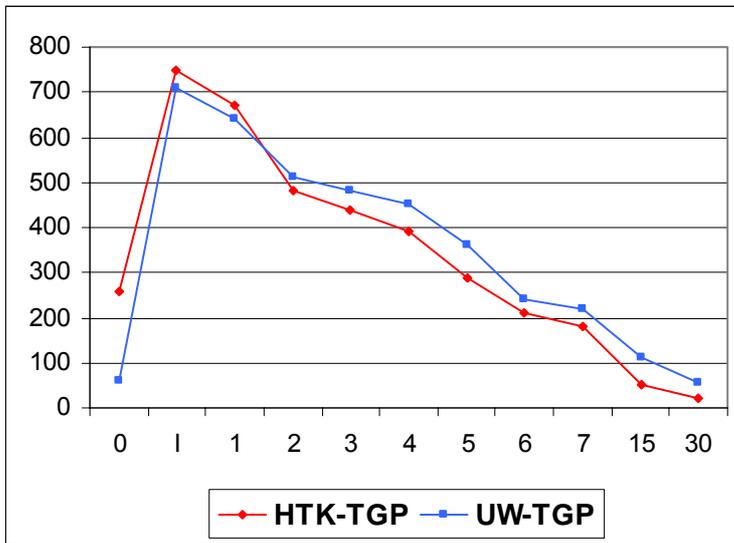
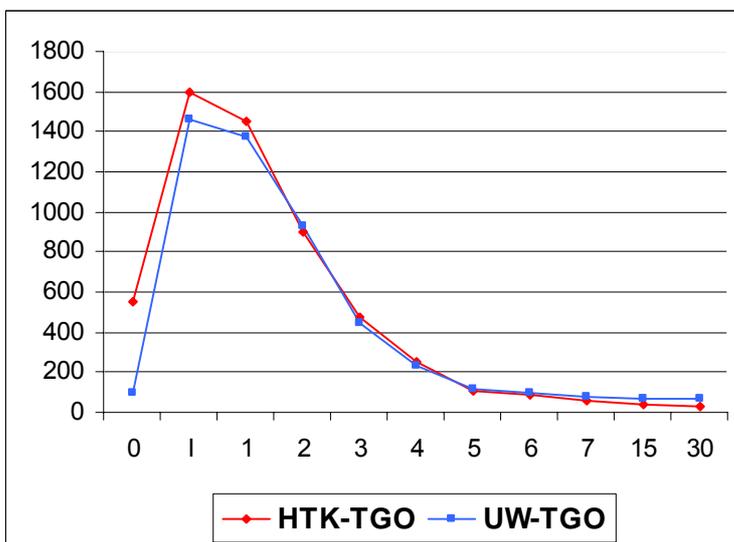


Figura 1. Dosagem de AST/TGO no perfusato e no sangue pós-reperfusão coletados pelo cateter da VCI e a ocorrência de disfunção do enxerto (DPE), no trans-operatório do transplante hepático



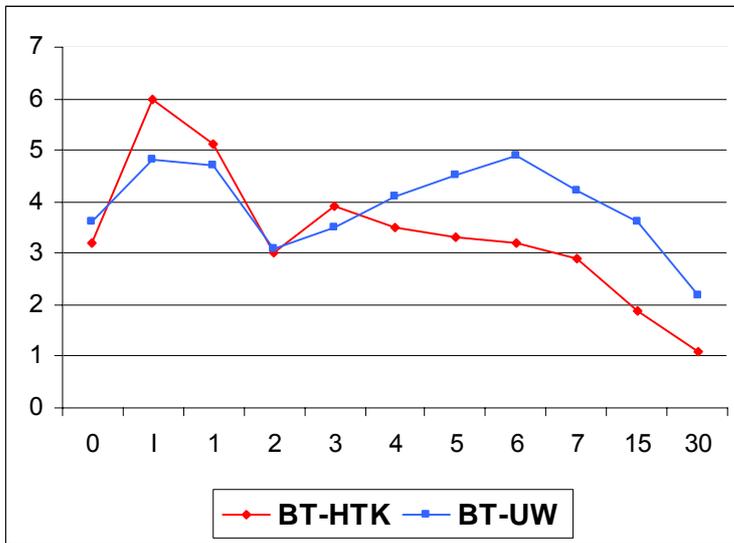
0 – Nível sérico pré-operatório 1 – Pós-operatório imediato

Figura 2. Comparação do nível sérico de transaminase glutâmico pirúvica (TGP), nos dias pós-operatório do transplante hepático, com soluções de preservação de UW e HTK



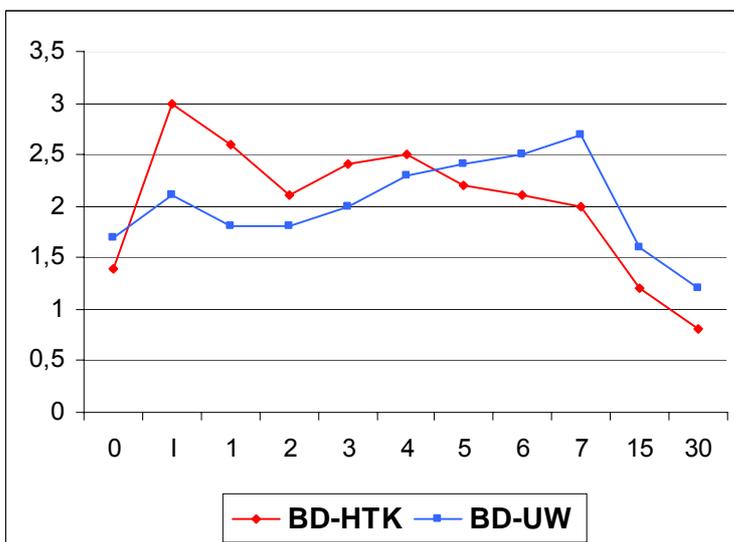
0 – Nível sérico pré-operatório 1 – Pós-operatório imediato

Figura 3. Comparação do nível sérico de transaminase glutâmico oxalacética (TGO), nos dias pós-operatório do transplante hepático, com soluções de preservação de UW e HTK



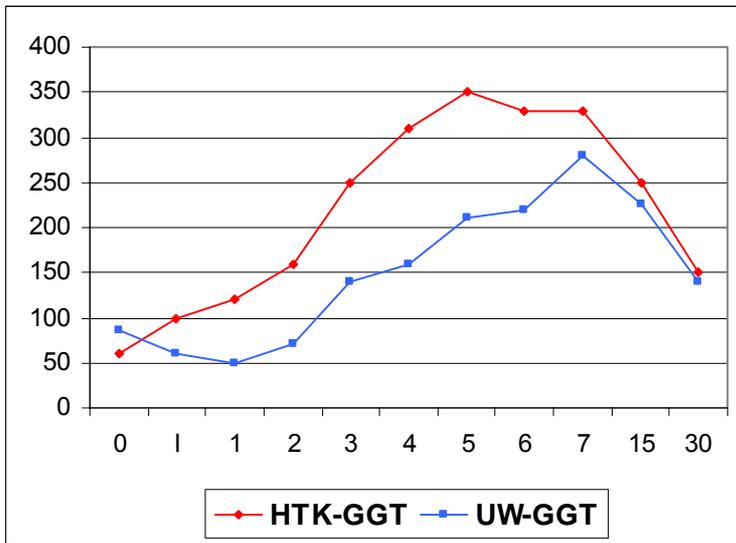
0 – Nível sérico pré-operatório I – Pós-operatório imediato

Figura 4. Comparação do nível sérico de bilirrubinas totais (BT), nos dias pós-operatório do transplante hepático, com soluções de preservação de UW e HTK



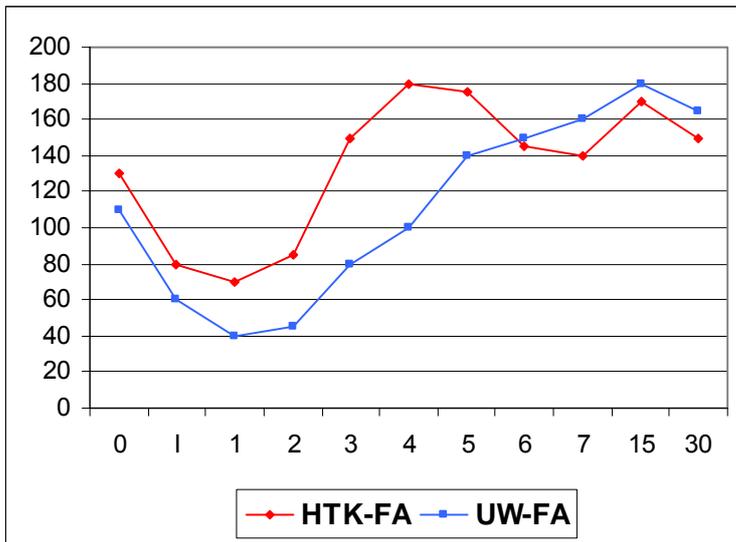
0 – Nível sérico pré-operatório I – Pós-operatório imediato

Figura 5. Comparação do nível sérico de bilirrubina direta (BD), nos dias pós-operatório do transplante hepático, com soluções de preservação de UW e HTK



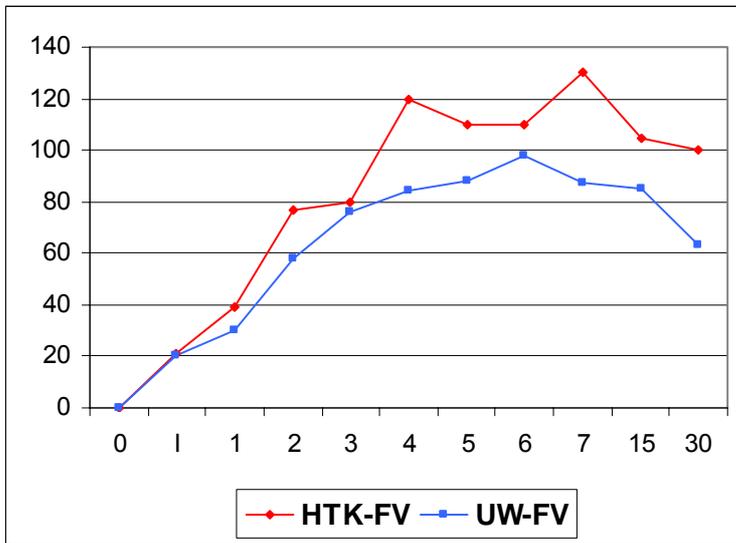
0 – Nível sérico pré-operatório 1 – Pós-operatório imediato

Figura 6. Comparação do nível sérico de gama glutamiltranspeptidase (GGT), nos dias pós-operatório do transplante hepático, com soluções de preservação de UW e HTK



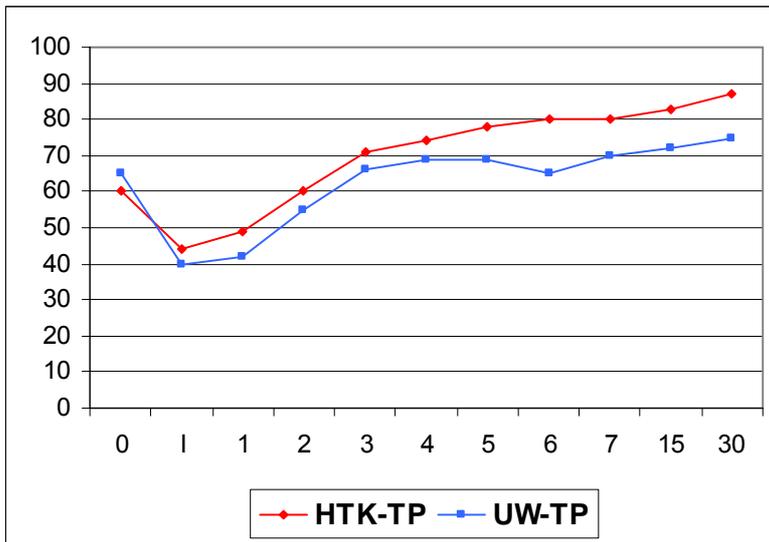
0 – Nível sérico pré-operatório 1 – Pós-operatório imediato

Figura 7. Comparação do nível sérico de fosfatase alcalina (FA), nos dias pós-operatório do transplante hepático, com soluções de preservação de UW e HTK



0 – Nível sérico pré-operatório 1 – Pós-operatório imediato

Figura 8. Comparação do nível sérico de fator 5 (FV), em porcentagem, nos dias pós-operatório do transplante hepático, com soluções de preservação de UW e HTK



0 – Nível sérico pré-operatório 1 – Pós-operatório imediato

Figura 9. Comparação dos tempos de protrombina (TP), em percentual, nos dias pós-operatório do transplante hepático, com soluções de preservação de UW e HTK

Tabela 8Estratificação dos tempos de isquemia no TOF com HTK e UW ($p\alpha = 0.3$)

| TIF | HTK | UW | Total |
|-----------------|------------|------------|------------|
| < 08 horas | 18 (50,0%) | 20 (31,3%) | 38 (38,0%) |
| 08 a 11,9 horas | 12 (33,3%) | 27 (42,2%) | 39 (39,0%) |
| 12 a 14,9 horas | 05 (13,9%) | 15 (23,4%) | 20 (20,0%) |
| > 15 horas | 01 (2,8%) | 02 (3,1%) | 03 (3,0%) |

TIF: tempo de isquemia fria; TOF: transplante ortotópico de fígado

Não houve diferença estatística entre os grupos com relação ao surgimento de rejeição celular aguda (RCA), confirmada por biópsia, no primeiro mês pós-transplante (**Tabela 9**).

Tabela 9Incidência de rejeição nos primeiros 30 dias de TOF com HTK e UW ($p\alpha = 0.71$)

| RCA | HTK | UW | Total |
|----------|------------|------------|------------|
| ausente | 30 (90,9%) | 57 (95,0%) | 87 (93,5%) |
| presente | 03 (9,1%) | 03 (5,0%) | 06 (6,5%) |

RCA: rejeição celular aguda; TOF: transplante ortotópico de fígado

As complicações de via biliar tiveram uma apresentação significativamente diferente entre os grupos em estudo. Dos 102 casos alocados inicialmente, 89 tiveram seguimento mínimo de quatro meses pós-operatórios. Em 3 casos foram realizadas anastomoses bileo-digestivas: 2 re-transplantes e um caso de

desproporção de calibre de vias biliares. Os outros 10 casos evoluíram para o óbito antes que esta complicação pudesse se manifestar ou ser avaliada. Não houve nenhum óbito relacionado às quatro categorias de complicações biliares expressas na **Tabela 10**.

Tabela 10

Categorização das complicações de via biliar no TOF com HTK ou UW ($p\alpha = 0.086$)

| CVB | HTK | UW | Total |
|-----------------|------------|------------|------------|
| ausente | 23 (74,1%) | 53 (91,4%) | 76 (83,5%) |
| estenose | 04 (12,9%) | 04 (6,9%) | 08 (8,8%) |
| fístula | 02 (6,4%) | 00 (0,0%) | 02 (3,3%) |
| lesão isquêmica | 02 (6,4%) | 01 (1,7%) | 03 (3,3%) |
| sub-total * | 31 (86,1%) | 58 (89,2%) | 89 (87,2%) |

* O sub-total expressa os valores absolutos dos casos seguidos até o desfecho e os valores percentuais com relação ao total de casos do estudo (n = 102)
CVB: complicações de vias biliares; TOF: transplante ortotópico de fígado

A incidência de óbito foi similar em ambos os grupos: UW com 6 casos (9,2%) e HTK com 4 casos (10,8%) em cada grupo ($p\alpha = 0.52$). Considerando-se o total de casos, estes valores passam para 5,9% com UW e 3,9% com HTK. A incidência de disfunção do enxerto foi de 2,8% no grupo HTK (01 caso em 35) e 9,3% no grupo UW (06 casos em 64) ($p\alpha = 0,15$). Considerando-se o total de casos, estes valores passam para 6,1% com UW e 1% com HTK. Cinco pacientes

com disfunção grave do enxerto, evoluíram para o óbito por não funcionamento primário, com ou sem co-morbidades, perfazendo 71% do total de pacientes com DPE (**Tabela 12**). Apenas dois casos com disfunção inicial de enxerto, um de cada

Tabela 11

Complicações de via biliar no TOF com HTK e UW ($p\alpha = 0.033$)

| CVB | HTK | UW | Total |
|----------|------------|------------|------------|
| ausente | 23 (74,2%) | 53 (91,4%) | 76 (85,4%) |
| presente | 8 (25,8%) | 05 (8,6%) | 13 (14,6%) |
| Totais | 31 (100%) | 58 (100%) | 89 (100%) |

CVB: complicações de vias biliares; TOF: transplante ortotópico de fígado

grupo, tiveram pronta recuperação da função hepática e sobreviveram. Um paciente com NFP do grupo UW foi retransplantado e não sobreviveu.

A análise da de sobrevida do enxerto e dos pacientes pelo método de Kaplan-Meier está representado nas **figuras 10, 11, 12 e 13**. Não houve diferença nas curvas de sobrevida entre o grupo UW e HTK estimada para 2 anos pós TOF.

Quando analisados os tempos de isquemia fria, estratificados em toda a amostra, não se encontrou associação com complicações biliares, DPE ou óbito ($p\alpha > 0.05$) (**Tabela 15**). O mesmo ocorreu na análise dos dados quando comparados os grupos em estudo. No entanto, analisando-se as médias dos tempos de isquemia fria, evidenciou-se uma associação com TIF prolongados, maiores que 12 horas (735 minutos) com DPE ($p\alpha = 0.029$). Esta associação não

foi encontrada com relação a óbito e complicação biliares para toda a população em estudo ($p > 0.05$). No grupo HTK o TIF médio dos casos de DPE foi de 855 minutos (14,2 horas) e no grupo UW a média de TIF dos casos de DPE foi de 715 minutos (11,9 horas).

Não houve associação independente com a esteatose dos doadores e o surgimento de DPE, complicações biliares ou óbito, com razão de risco de OR= 0,72 (IC 95% 0,13 a 3,86), 1,20 (IC 95% 0,25 a 6,30) e 1,30 (IC 95% 0,32 a 5,38).

Tabela 12

Comparação dos casos de óbito com DPE no total de casos de TOF ($p < 0.001$)

| DPE | Óbitos | Sobrevida | Total |
|----------|-----------|------------|------------|
| Ausente | 04 (3,9%) | 91 (89,2%) | 95 (93,1%) |
| Presente | 06 (5,9%) | 01 (1,0%) | 07 (6,9%) |
| Total | 10 (9,8%) | 92 (90,2%) | 102 (100%) |

DPE: disfunção primária de enxerto; TOF: transplante ortotópico de fígado

A análise dos tempos de isquemia fria estratificados evidenciou de forma significativa uma diferença com relação ao surgimento de DPE com tempos de isquemia progressivamente maiores (**tabela 13**). Não houve nenhum caso de DPE com TIF menor do que 8 horas, sendo 7,7% dos casos de TIF entre 8 e 12 horas apresentaram DPE e os casos de TIF maior do que apresentaram quase três vezes esse percentual (20%). No entanto, os únicos 3 casos de TIF maior que 12 horas, não apresentaram DPE e tão pouco complicações biliares ou óbito. Com relação a esses outros dois desfechos, não houve associação com os tempos de

isquemia categorizados, bem como com as médias do TIF, analisado como variável quantitativa. A análise das médias do TIF com relação à DPE também teve relevância estatística, sendo que os sete casos de DPE tiveram 12,3 horas de TIF (735 minutos) comparado a 9,1 horas (547,6 minutos) dos demais pacientes ($p\alpha = 0.029$) (Tabela 14).

Tabela 13

Comparação do TIF com relação a óbito, DPE e complicações biliares em todos os TOF

| TIF | DPE ($p\alpha = 0.023$) | | Óbito ($p\alpha > 0.05$) | | CVB ($p\alpha > 0.05$) | |
|-------------|---------------------------|------------|----------------------------|------------|--------------------------|------------|
| | Ausente | Presente | Ausente | Presente | Ausente | Presente |
| Menor 8 h | 38 (100%) | 00 (0,0%) | 36 (94,7%) | 02 (5,3%) | 29 (80,6%) | 07 (19,4%) |
| 8 a 11,9 h | 36 (92,3%) | 03 (7,7%) | 35 (89,7) | 04 (10,3%) | 30 (90,9%) | 03 (9,1%) |
| 12 a 14,9 h | 16 (80,0%) | 04 (20,0%) | 16 (80,0%) | 04 (20,0%) | 14 (82,4%) | 03 (17,6%) |
| Maior 15 h | 03 (100%) | 00 (0,0%) | 03 (100%) | 00 (0,0%) | 03 (100%) | 00 (0,0%) |
| Totais | 93 (93,0%) | 07 (7,0%) | 90 (90,0%) | 10 (10,0%) | 76 (85,4%) | 13 (14,6%) |

TIF: tempo de isquemia fria; DPE: disfunção primária de enxerto; CVB: complicações de vias biliares; TOF: transplante ortotópico de fígado

A análise por regressão logística para a avaliação de DPE com relação à TIF e idade dos doadores, que teve a média significativamente maior no grupo HTK, demonstrou significância somente para TIF ($p\alpha = 0.029$). A mesma análise de TIF e idade para CVB ($p\alpha = 0.35$ e 0.66 , respectivamente) e óbito ($p\alpha = 0.80$ e 0.28) não foi significativa. O risco atribuído a cada hora a mais de isquemia fria, após 12 horas de TIF, de surgimento de DPE no pós-operatório é de 45% (1,450 – IC 95% 1,042 a 2,017). A dicotomização dos tempos de isquemia fria, em maior ou

Tabela 14

Relação das médias dos tempos de isquemia fria com DPE, óbito e CVB no TOF

| | | n | TIF (min.) | DP | pα |
|-------|----------|----|------------|-------|-------|
| DPE | Ausente | 93 | 547,6 | 172,4 | 0.029 |
| | Presente | 07 | 735,0 | 85,0 | |
| Óbito | Ausente | 92 | 627,2 | 149,3 | 0.355 |
| | Presente | 10 | 553,4 | 176,0 | |
| CVB | Ausente | 13 | 557,7 | 179,7 | 0.807 |
| | Presente | 77 | 531,1 | 172,2 | |

TIF: tempo de isquemia fria; DPE: disfunção primária de enxerto; CVB: complicações de vias biliares; TOF: transplante ortotópico de fígado

menor do que 12 horas, teve menor significância para a relação do TIF prolongado com DPE ($p\alpha = 0.073$), provavelmente devido ao número restrito de casos com TIF maior do que 12 horas.

A comparação por regressão logística, de ambas as soluções, relacionando as médias de TIF com DPE, não demonstrou diferenças entre o surgimento de disfunção com o passar do tempo de isquemia, utilizando-se uma ou outra solução ($p\alpha = 0.27$). Dentro do grupo UW, que apresentou a maioria dos casos de DPE, fica mais uma vez evidenciada a relação de disfunção com TIF prolongado ($p\alpha = 0.023$). Com relação à comparação entre os grupos HTK e UW, não houve diferença estatística entre as médias dos TIF e a ocorrências óbito e complicações biliares (**Tabela 15**). A esteatose hepática presente em 20 doadores (19,8%) não teve implicância no desenvolvimento de DPE ou evolução desfavorável para o óbito nesta amostra de pacientes (**Tabela 16**).

Tabela 15

Relação das médias dos tempos de isquemia fria com DPE, óbito e CB no TOF com soluções de preservação de HTK e UW

| | | n | HTK | | p α | n | UW | | p α |
|-------|----------|----|-------|-------|------------|----|-------|-------|------------|
| | | | TIF | DP | | | TIF | DP | |
| DPE | Ausente | 36 | 518,7 | 179,7 | 0.078 | 58 | 565,1 | 167,1 | 0.023 |
| | Presente | 01 | 850,0 | 0,0 | | 06 | 715,8 | 74,8 | |
| Óbito | Ausente | 33 | 512,3 | 183,6 | 0.784 | 59 | 579,1 | 169,1 | 0.319 |
| | Presente | 04 | 652,5 | 173,7 | | 06 | 610,3 | 145,6 | |
| CVB | Ausente | 23 | 518,8 | 200,6 | 0.147 | 58 | 574,5 | 169,1 | 0.573 |
| | Presente | 08 | 483,6 | 146,9 | | 05 | 605,5 | 169,7 | |

TIF: tempo de isquemia fria; DPE: disfunção primária de enxerto; CVB: complicações de vias biliares; TOF: transplante ortotópico de fígado

Tabela 16

Comparação do grau de esteatose do enxerto hepático com óbito, DPE e complicações de vias biliares no total de casos de TOF

| | DPE (p α > 0.05) | | Óbito (p α > 0.05) | | CVB (p α > 0.05) | |
|------------------|-------------------------|------------|---------------------------|------------|-------------------------|------------|
| | Ausente | Presente | Ausente | Presente | Ausente | Presente |
| Esteatose | | | | | | |
| Presente | 18 (90,0%) | 02 (10,0%) | 18 (90,0%) | 02 (10,0%) | 14 (82,3%) | 3 (17,6%) |
| Ausente | 75 (92,3%) | 06 (7,4%) | 73 (90,1%) | 08 (9,9%) | 62 (86,1%) | 10 (13,8%) |
| Totais | 93 (92,1%) | 08 (7,9%) | 91 (90,0%) | 10 (10,0%) | 76 (89,2%) | 13 (14,1%) |

TIF: tempo de isquemia fria; DPE: disfunção primária de enxerto; CVB: complicações de vias biliares; TOF: transplante ortotópico de fígado

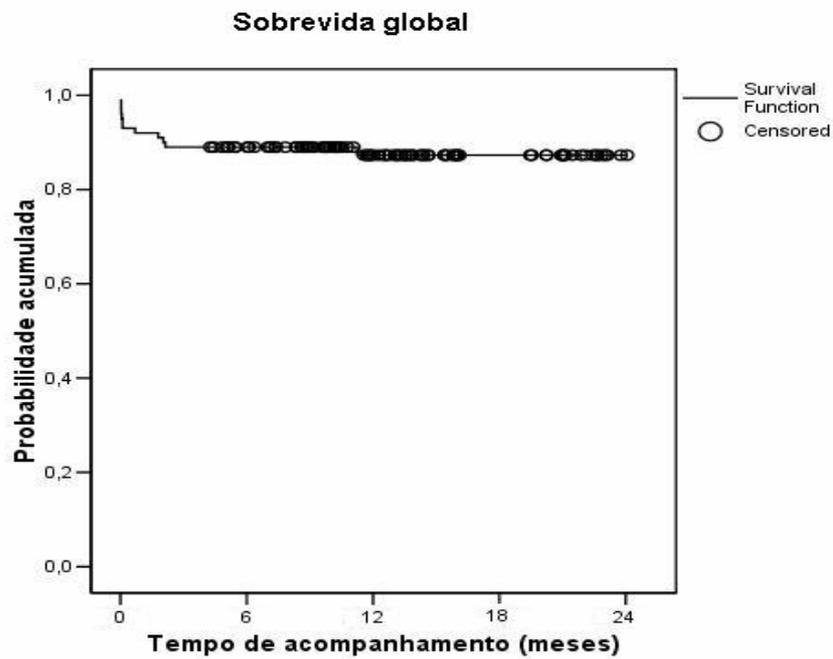


Figura 10. Análise de sobrevida dos receptores de TOF em 2 anos



Figura 11. Análise de sobrevida global dos enxertos hepáticos após TOF

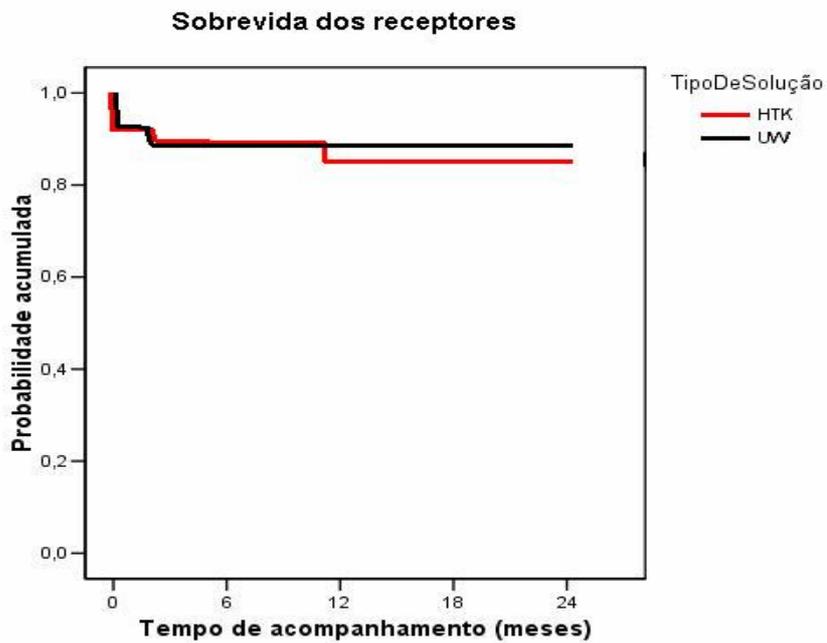


Figura 12. Análise de sobrevida dos receptores de TOF com HTK ou UW em 2 anos ($p\alpha > 0.05$)

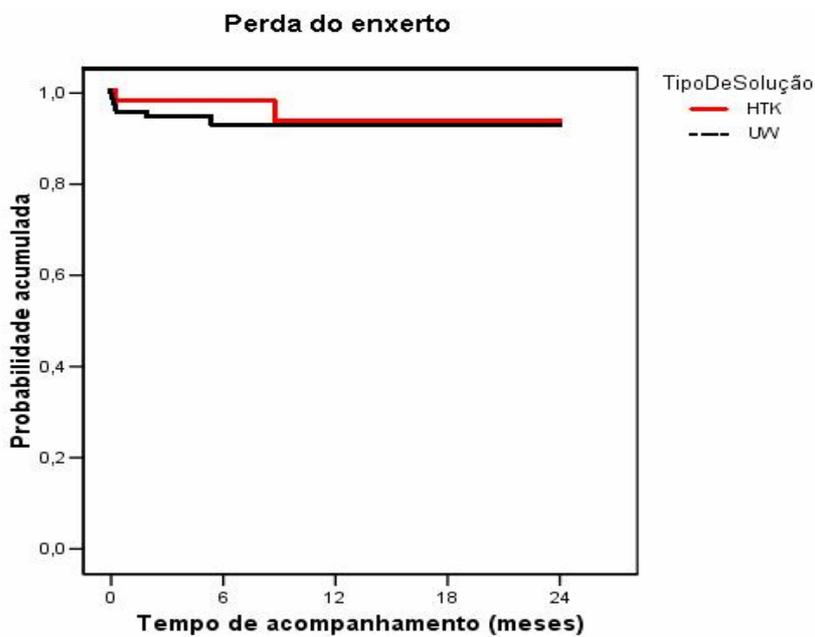


Figura 13. Análise de sobrevida dos enxertos hepáticos após TOF com HTK ou UW ($p\alpha > 0.05$)

10. Discussão

A solução de UW é certamente a mais usada para a preservação de fígados, rins e pâncreas em todo o mundo. Dados clínicos e experimentais fornecem um excelente embasamento científico para a sua utilização em doadores de múltiplos de órgãos. A UW pode ser considerada atualmente a solução padrão para preservação de órgãos abdominais.

Entretanto, com o passar do tempo, novas necessidades foram surgindo, e os centros transplantadores não americanos optaram por testar outras soluções. A manipulação mais difícil de muitos sacos de 1 litro, a alta viscosidade da solução e o seu preço elevado, perfazem desvantagens de ordem técnica e econômica para muitas equipes e hospitais que usam UW. Alguns grupos transplantadores europeus consideram a solução de HTK como de maior facilidade para manipulação. Isto tanto na preparação do enxerto na cirurgia de bancada, por sua menor viscosidade nas luvas cirúrgica, como pelo fato de ser mais prática a instalação de um único frasco de 5 litros para aorta e de outro de 2 litros para veia porta. Em momentos de necessidade de rapidez e agilidade, para não se perder os órgãos de um doador instável, este pequeno detalhe pode fazer a diferença.

O fato do glutatião, o principal elemento anti-radicaís livres de oxigênio de sua fórmula, não poder ser detectado por análise química no seu invólucro, provavelmente devido à difusão, pode colocar em dúvida a qualidade da solução (7). O surgimento de microcristais insolúveis nos frascos de UW, durante o congelamento acidental da solução, poderá exigir, a curto prazo, o uso de filtros especiais nas linhas de perfusão; o que agregará mais custo ao uso deste

produto. Outros estudos ainda precisam ser conduzidos, ao nível da microscopia eletrônica, para efetivamente correlacionar o grau de dano hepatocelular com a presença destas micro-partículas no parênquima hepático, após a reperfusão. Estes fatos podem incentivar os concorrentes a produzirem compostos novos, com custo menor, com fórmulas mais simples, com controle de qualidade mais adequado e com uma melhor relação entre custo e benefício.

Uma desvantagem da solução de HTK é a necessidade imperiosa de mantê-la sempre a temperaturas inferiores a 15° C, sob pena de ocorrerem alterações irreversíveis em sua composição química em temperaturas maiores. A dependência térmica do valor de pH da solução é a seguinte: pH de 7,4 a 15°C, de 7,1 a 25°C e de 6,8 a 35°C. A solução de UW também não pode ser estocada a temperaturas superiores a 20°C, porém não é tão suscetível a variações térmicas causando alterações importantes do seu pH.

A solução de HTK já tem uma posição consagrada na preservação cardíaca. Tem sido demonstrada a sua segurança e eficácia por mais de 30 anos. Nos últimos anos, alguns estudos clínicos evidenciaram a sua efetividade em preservar fígado e rins. A idéia inicial desta série de estudos, embasados em estudos experimentais preliminares, era a de efetividade comparável à solução de UW, com relação a tempos de isquemia inferiores há 10 horas. Em nosso estudo, conseguimos demonstrar que o uso de HTK é seguro acima de 12 horas de isquemia fria. Além disso, podemos observar que, transplantando-se fígados de doadores com poucos critérios de marginalidade, poderemos expandir o TIF por até 16 horas, com pouco risco de DPE, mesmo utilizando baixos volumes de solução.

O elevado volume de perfusão inicialmente sugerido não é realmente necessário, já tendo sido proposto um volume total de 10 litros para perfusão de doadores de múltiplos órgãos. Esta economia pode proporcionar reduções de custos significativas, particularmente se considerarmos o preço de 1 litro de HTK cerca de 60% mais baixo do que 1 litro de UW (7). Estudos experimentais, que analisaram parâmetros subjetivos, dependentes dos examinadores, como a microscopia intravital para adesão leucocitária e índice de permeabilidade sinusoidal na reperfusão precoce, sugeriram a utilização de volumes absurdos de HTK para uso em TOF em humanos (62;81). Na prática cirúrgica, a lenta perfusão dos órgãos abdominais, por 20 a 30 minutos, a pressões de 50 mmHg, pode trazer o equilíbrio desejado a nível celular sem o desperdício de enormes volumes de solução. No entanto, a utilização de somente 6 litros de solução de HTK, sendo 4 litros infundidos na aorta e mais meio litro na artéria hepática, pode não ser o suficiente para a adequada preservação da via biliar. Controlados outros fatores de confusão, nosso estudo evidenciou uma significativa incidência de CVB no grupo HTK. Nos parece plausível explicar estes 25,8% de CVB, em contra partida a apenas 8,6% no grupo UW, por não se ter protegido de forma efetiva o epitélio biliar ao usar-se menos solução do que o preconizado pela literatura até o momento.

Apesar da perfusão dos enxertos serem extremamente importantes para sua adequada preservação, ainda não existe um consenso quanto à padronização e o uso mais adequado das soluções de preservação. A maioria dos cirurgiões do hemisfério norte perfunde os órgãos abdominais até o perfusato drenar límpido.

Desta maneira, fazem uso de até 6 litros de UW, ou de 10 a 15 litros de HTK, pela aorta infra-renal, para a preservação de rins, fígado, pâncreas e intestino delgado.

Em nosso meio, devido a entraves financeiros e burocráticos, estamos limitados ao uso de 4 litros de UW para todo o procedimento da cirurgia de retirada de fígado. Se o pâncreas também for removido, pode-se fazer uso de 1 litro adicional de solução pela aorta. Desta maneira, muitos cirurgiões brasileiros optaram pela mistura de soluções de preservação. É de prática comum, em vários centros transplantadores do país, a utilização de soluções baratas, como o Ringer lactato ou o Euro-Collins, antes da perfusão definitiva com 2 litros de UW. Esta variante contém custos, mas mistura soluções extra-celulares com intra-celulares e não tem respaldo experimental na literatura.

Os estudos publicados, anteriormente ao início elaboração desta dissertação, compararam séries de casos históricos de TOF sem randomização, e os seus resultados podem estar sob a influência de vários fatores. Especificamente, a idade do doador, sua história médica pregressa, seu tempo de estadia em UTI e suas condições clínicas no período peri-operatório podem ser variáveis determinantes de dano hepatocelular pré-preservação (47,48). Os tempos de isquemia variados, sem controle fidedigno e não comparáveis, podem causar diferentes graus de dano de preservação, avaliados no contexto clínico destes estudos. Todas estas variáveis devem ser controladas direta ou indiretamente, uma vez que influenciam a qualidade do enxerto e tem importância fundamental no seu funcionamento e na plena recuperação dos pacientes.

A randomização realizada em nosso estudo parece ter distribuído de forma equilibrada tanto doadores com receptores nos dois grupos. Uma ressalva se faz

com relação a necessidade de, obrigatoriamente, alocarmos doadores com idade inferior a 45 anos para o grupo UW, quando a retirada de pâncreas foi determinada pela Central de Transplantes. Eventualmente, tivemos de utilizar uma amostra consecutiva de paciente para o grupo UW, mesmo que este tipo de alocação não estivesse determinada pelo sistema de randomização em blocos. No intuito de não perdermos casos selecionados e compormos uma amostra satisfatória, acabamos por obter um número mínimo de pacientes no grupo HTK (n=36) e ficamos com quase o dobro de pacientes no grupo UW (n=65). Apesar da significativa diferença das médias de idade entre os grupos, a sua análise por regressão logística não demonstrou impacto nos desfechos de interesse, como óbito, DPE e CVB.

10.1. Tempo de isquemia fria

Além de todos os aspectos relacionados à conservação e das potencialidades inerentes à preservação orgânica com estas soluções, não se deve esquecer de que o tempo isquemia fria é o principal fator de risco para a disfunção do órgão. Conseqüentemente, o TIF deve ser mantido tão curto quanto possível. Os cirurgiões transplantadores mais experientes estão dispostos aceitar 24 horas ou mais de TIF no transplante renal com doadores cadáveres, pois a falha do órgão pode ser tratada por métodos dialíticos. Em outros casos, onde a imediata função do órgão é essencial para a sobrevivência do paciente, como no transplante cardíaco, o TIF não pode ser prolongado além de 4 horas.

Independente do órgão transplantado, os melhores resultados, a curto e a longo prazo, são sempre aqueles em que se tem tempos de isquemia, quente e fria, reduzidos.

Ambas as soluções parecem ser igualmente efetivas na preservação de enxertos hepáticos de doadores cadáveres para transplante ortotópico de fígado. No entanto, permanece obscuro se a solução de HTK é melhor do que a solução de UW para preservação hepática em casos de TIF prolongado, maior do que 12 horas. Uma amostra maior e estratificada poderia responder a este questionamento no futuro, bem como modelos experimentais bem controlados.

Tentando minimizar os danos de preservação associados com o aumento dos tempos de isquemia em um contexto de ensaio clínico, não nos propusemos a acrescentar mais TIF aos casos de forma premeditada. Os 3 casos de TIF maior do que 15 horas tiveram seus implantes e, conseqüentemente, suas reperfusões, retardadas por problemas logísticos; tanto durante a captação do órgão quanto no seu implante. Felizmente, estes pacientes não apresentaram complicações significativas no período pós-operatório. Isso muito provavelmente ocorreu devido a ausência de critérios de marginalidade nos seus doadores, o que permitiu aos enxertos submeterem-se à isquemia mais prolongada, sem a gênese de danos de preservação irreparáveis.

10.2. Alterações bioquímicas pré e pós-operatórias

A grande variabilidade e amplitude de resultados das dosagens de LDH, AST e ALT, no perfusato efluente da VCI antes da reperfusão (t_0), pode ser explicada pela inadequação do método cinético automatizado para dosagem destas enzimas em soluções que não o sangue ou plasma. As características físico-químicas das soluções de UW e HTK são notoriamente diferentes, e ambas foram removidas do meio intra e extra-celular e diluídos por Ringer lactato antes de serem coletados pelo cateter colocado na VCI do enxerto hepático. O substrato onde estas enzimas se encontravam para serem mensuradas poderia ser inadequado para a correta mensuração pelos aparelhos de laboratório que dispomos, calibrados para analisar sangue e fluídos corporais.

Já no que tange a mensuração das enzimas no sangue pós-reperfusão (t_1), podemos observar altas concentração de AST e LDH no efluente venoso dos enxertos que desenvolveram disfunção. Desta maneira, pudemos demonstrar uma associação entre níveis séricos de LDH maiores do que 4372 U/L e de AST maiores do que 2030 U/L com DPE hepático ($p\alpha = 0.015$ e $p\alpha = 0.041$, respectivamente). Curiosamente, a enzima mais específica para avaliação de dano inflamatório e necrose hepatocelular, a ALT/TGP, foi a única que não demonstrou tal achado significativo ($p\alpha = 0.085$).

Alguns autores preconizam que as dosagens de ALT/TGP e de LDH na solução drenada pela cava do enxerto antes da reperfusão (*washout solution*), poderiam compor um indicador laboratorial fidedigno para predizer o desfecho

clínico de disfunção precoce dos enxertos (83). Aqueles pacientes que apresentam índices maiores de enzimas no perfusato, especialmente a ALT, apresentarão níveis séricos maiores no primeiro mês pós-operatório. Porém, existe a relação com a manutenção de níveis altos das enzimas de dano hepatocelular com quadros de rejeição, que se manifestam neste período, o que pode vir a ser um fator de confusão para a interpretação de tais resultados. De qualquer maneira, são tantas as variáveis que determinam ou contribuem para o mau funcionamento dos enxertos hepáticos, que nos parece muito simplista, ou pelo menos ainda difícil, determinar um ponto de corte isolado nestes exames laboratoriais, que possa predizer com exatidão quais os enxertos que desenvolverão disfunção primária. A dosagem de níveis enzimáticos no sangue pós-reperfusão (t1), imediatamente drenado da cava do enxerto por cateter, nos parece ser uma alternativa melhor e menos sujeita a variabilidade de resultados do que a dosagem no perfusato pré-reperfusão (t0).

A análise enzimática do efluente venoso de enxertos renais submetidos a longos períodos de isquemia fria falhou em predizer, com acurácia, quais os enxertos, com critérios de danos de preservação semelhantes, funcionariam ou não (84). No entanto, neste mesmo contexto, foi demonstrado que a LDH sérica, dosada no período pós-operatório, tem valor preditivo para prever o adequado funcionamento do transplante renal. Além disso, tem uma associação importante com o surgimento e a remissão de quadros de rejeição celular aguda.

Em nosso estudo, a dosagem de LDH no perfusato também não foi um método efetivo para predizer disfunção do enxerto hepático, e tão pouco averiguamos sua associação com RCA. O nível sérico pós-operatório, que não

variou entre os grupos em estudo, não apresentou uma associação significativa com o surgimento de DPE neste período, provavelmente pela diminuição do poder estatístico relacionado à perda de dados, por ausência de coleta seqüencial do exame em cerca de 30 % dos casos na primeira semana pós-operatória.

A GGT variou de forma mais acentuada entre o segundo e o sexto dias pós-operatório no grupo HTK, porém a nossa amostra de pacientes não nos permite inferir sobre a significância deste achado ($p\alpha > 05\%$ e $p\beta < 80\%$) (**Figura 6**). Pode-se atribuir uma elevação inicial maior da GGT no grupo HTK às características físico-químicas da solução, ou ao acaso. A solução de HTK possui menor concentração de íons sódio e de íons potássio do que a de UW. Também se apresenta com maior fluidez, com índice de viscosidade de 3, a 4° C, enquanto a solução de UW tem índice 9 (17). Esses fatores podem proporcionar uma reperfusão mais rápida à nível de microcirculação hepática e uma maior liberação de enzimas mediadoras de dano hepatocelular pós sinusoidal num período mais precoce, quando utilizarmos uma solução de baixa viscosidade.

10.3. Disfunção primária do enxerto hepático

A incidência de DPE foi maior, porém não significativa, no grupo UW, do que no grupo HTK, 9,2% contra 2,8%, respectivamente em seus grupos, e 6% contra 1%, no total de casos.

A perda do enxerto e a maior mortalidade dos pacientes com DPE foram bem documentadas por Pokorny em um grande estudo retrospectivo que avaliou

628 TOF de 1982 até 1997. Durante um período de 45 meses, o autor observou que os pacientes que tiveram DIE, ou mesmo NFP, e foram retransplantados, evoluíram com uma sobrevida significativamente menor do que aqueles em que a função hepática se mostrou satisfatória desde o início (82).

O mesmo autor realizou um estudo prospectivo em 4 centros transplantadores europeus, de 1996 a 1999, onde os resultados de 214 pacientes com fígados preservados com HTK foram analisados. A incidência de DPE foi de 8,8%, com uma frequência de NFP de 2,3% e de DIE de 6,5%. A sobrevida global dos pacientes em 1 ano foi de 83%, e dos enxertos de 80%. Em modelos de análise uni e multivariadas, DPE e complicações precoces infecciosas foram identificadas como fatores de risco independentes para as sobrevidas de enxertos e pacientes (80).

Os dados aqui expostos são superponíveis aos do nosso estudo, tanto no que concerne ao grupo HTK, isoladamente, como com relação ao total da amostra, nos aspectos mencionados. Em nossa análise, a sobrevida estimada para 24 meses de transplante é de 86% para receptores e 94% para enxertos, independentemente da solução utilizada (**Figuras 10 e 11**). Com relação à incidência de DPE em 99 casos estudados (7,1%), não houve diferença entre os grupos UW, que apresentou 6 casos de DPE (6,1%), e HTK, com apenas 1 caso (1%). Provavelmente, a não significância deste achado se deve ao baixo poder estatístico desta amostra para aferir um desfecho até certo ponto considerado raro. A incidência de NFP foi similar a da literatura (de 2 até 23%), perfazendo 5,05% do total de casos.

10.4. Complicações de vias biliares

As complicações de vias biliares são fontes de morbidade importante no contexto do TOF. As estenoses não anastomóticas, ou, as lesões isquêmicas de via biliar que acarretam tais alterações, freqüentemente necessitam do tratamento definitivo com o re-transplante hepático. Em 1995, Sankary estudou 131 pacientes submetidos a TOF preservado exclusivamente com UW (85). Cerca de 11% destes pacientes apresentou estenoses de via biliar por leão isquêmica. Os fatores mais significativos associados ao evento foram TIF prolongado e altas doses de dopamina nos doadores. Fatores estes sabidamente importantes para aumentar a chance de dano de preservação e de isquemia do epitélio biliar, dependente de suprimento sangüíneo arterial. Uma vez que todos os enxertos tinham sua reperusão venosa realizada antes da reperusão arterial, os autores acreditaram que este período de isquemia arterial quente poderia ser o responsável pelo surgimento das lesões. Em uma segunda parte deste estudo, a incidência de estenose não anastomótica foi de 2%, em 45 pacientes, com revascularização simultânea, arterial e portal.

Em nosso estudo, os tempos de isquemia fria, quente e total (arterial) foram semelhantes nos dois grupos. A técnica operatória para reconstrução da via biliar foi sempre a da anastomose colédoco-coledociana término-terminal com pontos separados de PDS 6.0; salvo em dois casos, onde foi imperativa a aplicação da técnica de anastomose bileo-digestiva em Y de Roux. Por conseguinte estes casos foram posteriormente excluindo da análise de CVB.

Contrariando o que a literatura nos evidenciava até o momento, encontramos um número significativamente maior de CVB nos pacientes que fizeram uso de HTK para preservação hepática (**Tabelas 10 e 11**). Foram 8 casos (25,8%) de CVB com HTK (04 casos / 12,9% de estenoses em anastomose, 02 casos / 6,4% de fístulas, 02 casos / 6,4% de lesões do tipo isquêmica) contra 05 casos (8,6%) no grupo UW (04 casos / 6,9% de estenoses em anastomoses, nenhum caso de fístula e 01 caso / 1,7% de lesão de tipo isquêmica).

Acreditamos ter conseguido controlar a maioria das variáveis pertinentes, que poderiam ter influenciado este desfecho, tais como hipotensão e uso de altas doses de vasopressores nos doadores, TIF, TIQ e TIT. Os doadores do grupo HTK tiveram uma média de idade significativamente maior do que os do grupo UW: 44 anos e meio contra 38 anos completos. Essa discrepância foi causada pela obrigatoriedade, segundo a lei vigente, de se utilizar UW em todos os doadores de pâncreas, que precisam ter até 45 anos. O grupo HTK acabou sendo composto por doadores mais idosos, mesclados com doadores mais jovens, dos quais não foram removidos os pâncreas para transplantes. Desta forma, existe a possibilidade da utilização de enxertos com mais de 60 anos apresentarem alterações vasculares inerentes da idade avançada, tais com aterosclerose e proliferação da muscular na hipertensão arterial sistêmica.

Em um dos primeiros estudos que avaliou CVB, Kadmon demonstrou uma incidência de 25,4% destas complicações em 59 pacientes em 3 meses de seguimento. Os enxertos preservados por mais de 10 horas tiveram um risco maior de desenvolvimento de complicações, às quais o autor atribuiu exclusivamente ao tempo de isquemia prolongado (19). Em nosso estudo, tivemos

a oportunidade de acompanhar nossos pacientes por pelo menos 4 meses de seguimento e detectamos 14,6% de CVB, em pacientes sintomáticos. A técnica operatória de reconstrução da via biliar foi sempre a mesma, e não observamos associação com tempos de isquemia maiores do que 12 horas com o surgimento de CVB.

Em um estudo de publicação recente, porém com dados históricos, e portanto, passível de vieses de confusão, foi demonstrada a incidência maior de complicações de via biliar em pacientes cujos fígados foram preservados com UW (11,3%), do que com HTK (7,9%), porém sem significância estatística ($p\alpha = 0,52$) (78). A técnica cirúrgica para reconstrução da via biliar não foi padronizada neste estudo, havendo 42% dos casos com anastomose látero-lateral, 43% término-terminal oblíqua, 7,5% término-terminal clássica e 6,5% anastomoses bileo-digestivas. Nossos dados prospectivos evidenciaram que as CVB estavam presentes em 25,8% dos casos em que se utilizou HTK e em 8,6% dos casos onde UW foi usada ($p\alpha = 0,033$). A análise pontual, conforme o tipo de complicação biliar, provavelmente também seria capaz de demonstrar uma maior incidência no grupo HTK, e só não o fez devido ao número reduzido de casos por esta subdivisão ($p\alpha = 0,086$). De qualquer maneira, fica evidente a tendência de desenvolvimento de quaisquer complicações de via biliar utilizando apenas 4 litros de HTK para perfusão arterial, independentemente do tempo de isquemia fria.

Em um estudo bem controlado, inserido no contexto do transplante inter-vivos, Testa não encontrou diferenças com relação às CVB entre os pacientes que usaram HTK ou UW, após um seguimento médio de 13 meses (79). Foram utilizados volumes médios de solução de UW de aproximadamente 1 litro, tanto

para perfusão portal, como arterial, do lobo direito. Quanto à solução de HTK, foi utilizado em média 1,5 litros para a artéria hepática direita e 2 litros para o ramo portal. A proporção aqui utilizada foi a mesma idealizada por nós para compor este estudo, o dobro de HTK em relação ao UW para perfusão arterial. No entanto, no nosso caso, todo o volume de perfusão foi distribuído para todos os órgãos abdominais, sem sabermos efetivamente qual a quantidade de solução que perfundiu o território vascular hepático. Provavelmente, utilizamos um menor volume de solução, considerando tanto UW quanto HTK, para preservar todo o fígado, do que Testa utilizou para preservar a via biliar do lobo direito no transplante inter-vivos. Talvez, a tentativa de reduzirmos custos com doadores cadáveres, economizando no volume das soluções de preservação, não se justifique no contexto do TOF. O manejo com procedimentos invasivos (CPRE, CTPH, e re-intervenções cirúrgicas), antibióticoterapia, diárias de UTI e o risco iminente de mortalidade relacionado às CVB, poderão não justificar a economia de 2 ou 4 litros de solução de preservação.

A preservação de fígados com HTK pode ser considerada como uma alternativa segura e bem estabelecida em substituição a preservação com a solução de UW, quando os tempos da preservação são inferiores há 12 horas (78;80). Em nosso estudo, podemos observar que tempos de isquemia de até 16 horas podem ser bem tolerados utilizando-se qualquer uma das soluções, desde que não tenhamos muitos critérios de marginalidade. A avaliação definitiva da eficácia das soluções da preservação requer um maior número de experimentações clínicas, randomizadas e prospectivas, que comparem HTK e

UW, controlando todos os fatores de confusão, para obter-se uma análise fidedigna e apurada dos resultados.

11. Conclusões

Ambas as soluções de preservação, HTK e UW, são efetivas na preservação dos enxertos hepáticos.

1. A incidência DPE foi pequena e similar entre os dois grupos; porém ocorreu maior mortalidade relacionada à NFP no grupo UW, sem significância estatística.

2. O TIF, analisado tanto na sua média e quanto estratificado, foi semelhante entre os dois grupos, sendo o maior fator causal isolado de DPE, independentemente do tipo de solução utilizada.

3. Os níveis enzimáticos de ALT/TGP, AST/TGO e LDH no perfusato e de ALT/TGP no sangue pós-reperfusão não têm associação com DPE ou óbito. Os níveis de transaminase glutâmico oxalacética, no sangue da VCI pós-reperfusão, sugerem que pacientes com índices de AST/TGO acima de 6000 mg/dl têm risco maior para desenvolver DPE no período pós-operatório.

Os níveis de desidrogenase láctica, no sangue da VCI pós-reperusão, sugerem que pacientes com níveis de DLH acima de 10.000 mg/dl têm risco aumentado para DPE no período pós-operatório.

As alterações de provas bioquímicas hepáticas, medidas nos primeiros 30 dias pós-operatórios, apresentaram uma distribuição semelhante nos casos de TOF preservados com UW e HTK.

4. As CVB estiveram significativamente mais presentes no grupo HTK, tanto de forma global quanto estratificada por subtipos. A utilização de um volume de 4 litros de solução na perfusão arterial pode ter sido responsável por tal achado, bem como a média de idade maior dos doadores deste grupo.

5. A incidência de óbito e análise de sobrevida dos receptores e dos enxertos hepáticos foi semelhante nos grupos UW e HTK.

12. Referências bibliográficas

- (1) Starlz TE. The saga of the liver transplantation (1955-1967). Journal of the American College of Surgeons 195, 587-609. 2002.
- (2) Grezzana Filho TJM. Correlação entre os níveis de glutatião (GSH) pré-reperusão com lesão tecidual hepática pós reperusão no transplante de fígado. Dissertação de mestrado - UFRGS. 2003.
- (3) Williams JW. History of Transplantation. In: Williams, J.W. Hepatic Transplantation. W.B.Saunders Company 1990: 31-43.
- (4) Kahan BD. The Jean Borel symposium. Transplantation Proc. 31, 3-61. 1999.
- (5) Madrey WC, Schiff ER, Sorrel MF. Transplantation of the liver. 3a ed. Philadelphia: Lippincot, Williams and Wilkins, 2001.
- (6) Lange R, Erhard J, Rauen U, de Groot H, Eigler FW. Hepatocellular injury during preservation of human livers with UW and HTK solution. Transplant Proc 1997; 29(1-2):400-402.
- (7) Muhlbacher F, Langer F, Mittermayer C. Preservation solutions for transplantation. Transplant Proc 1999; 31(5):2069-2070.

- (8) Pokorny H, Grunberger T, Rockenschaub S, Krenn CG, Puhalla H, Langer F et al. Preservation of the liver: is it possible to extend the time of storage? *Transplant Proc* 1999; 31(5):2074-2076.
- (9) de Boer J, De Meester J, Smits JM, Groenewoud AF, Bok A, van d, V et al. Eurotransplant randomized multicenter kidney graft preservation study comparing HTK with UW and Euro-Collins. *Transpl Int* 1999; 12(6):447-453.
- (10) Jamieson NV, Sundberg R, Lindell S, Claesson K, Moen J, Vreugdenhil PK et al. Preservation of the canine liver for 24-48 hours using simple cold storage with UW solution. *Transplantation* 1988; 46(4):517-522.
- (11) Leonhardt U, Tytko A, Exner B, Barthel M, Stockmann F, Kohler H et al. The effect of different solutions for organ preservation on immediate postischemic pancreatic function in vitro. *Transplantation* 1993; 55(1):11-14.
- (12) Riege R, Busing M, Kozuschek W. Preservation of the pancreas for transplantation. *Transplant Proc* 1999; 31(5):2095-2096.
- (13) Hesse UJ, Troisi R, Jacobs B, Berrevoet F, De Laere S, Maene L et al. Cold preservation of the porcine pancreas with histidine-tryptophan-ketoglutarate solution. *Transplantation* 1998; 66(9):1137-1141.
- (14) Troisi R, Meester D, Regaert B, Jacobs B, Van den BC, Cuvelier C et al. Physiologic and metabolic results of pancreatic cold storage with Histidine-

- Tryptophan-Ketoglutarate-HTK solution (Custodiol) in the porcine autotransplantation model. *Transpl Int* 2000; 13(2):98-105.
- (15) Bretschneider HJ. Myocardial protection. *Thorac Cardiovasc Surg* 1980; 28(5):295-302.
- (16) Holscher M, Groenewoud AF. Current status of the HTK solution of Bretschneider in organ preservation. *Transplant Proc* 1991; 23(5):2334-2337.
- (17) Belzer FO, Kalayoglu M, D'Alessandro AM, Pirsch JD, Sollinger HW, Hoffmann R et al. Organ preservation: experience with University of Wisconsin solution and plans for the future. *Clin Transplant* 1990; 4(2):73-77.
- (18) Kalayoglu M, Sollinger HW, Stratta RJ, D'Alessandro AM, Hoffmann RM, Pirsch JD et al. Extended preservation of the liver for clinical transplantation. *Lancet* 1988; 1(8586):617-619.
- (19) Kadmon M, Bleyl J, Kuppers B, Otto G, Herfarth C. Biliary complications after prolonged University of Wisconsin preservation of liver allografts. *Transplant Proc* 1993; 25(1 Pt 2):1651-1652.
- (20) Adam R, Bismuth H, Diamond T. Effect of extended cold ischemia with UW solution on graft function after liver transplantation. *The Lancet* 340 (8832), 1373-1376. 1992.

- (21) Sanchez-Urdazpal L, Gores GJ, Ward EM, Maus TP, Wahlstrom HE, Moore SB et al. Ischemic-type biliary complications after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1992; 16(1):49-53.
- (22) Sanchez-Urdazpal L, Gores GJ, Ward EM, Maus TP, Buckel EG, Steers JL et al. Diagnostic features and clinical outcome of ischemic-type biliary complications after liver transplantation. *Hepatology* 1993; 17(4):605-609.
- (23) Sanchez-Urdazpal L, Gores GJ, Ward EM, Hay E, Buckel EG, Wiesner RH et al. Clinical outcome of ischemic-type biliary complications after liver transplantation. *Transplant Proc* 1993; 25(1 Pt 2):1107-1109.
- (24) Jamieson NV. An overview of abdominal organ preservation for transplantation. In: Hesse UJ, de Hemptinne B, editors. *Organ preservation with UW and HTK solution*. Lengerich: Pabst Science Publishers, 1999: 19-36.
- (25) Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 1992; 53(5):957-978.
- (26) Gebhard MM, Kirlum HJ, Schlegel C. Organ preservation with HTK solution. In: Hesse UJ, de Hemptinne B, editors. *Organ preservation with UW and HTK solution*. Lengerich: Pasbt Scince Publishers, 1999: 75-90.

- (27) Heijnen BH, Elkhaloufi Y, Straatsburg IH, van Gulik TM. Influence of acidosis and hypoxia on liver ischemia and reperfusion injury in an in vivo rat model. *J Appl Physiol* 2002; 93(1):319-323.
- (28) Rauen U, Reuters I, Fuchs A, de Groot H. Oxygen-free radical-mediated injury to cultured rat hepatocytes during cold incubation in preservation solutions. *Hepatology* 1997; 26(2):351-357.
- (29) Sankary HN, Chong A, Foster P, Brown E, Shen J, Kimura R et al. Inactivation of Kupffer cells after prolonged donor fasting improves viability of transplanted hepatic allografts. *Hepatology* 1995; 22(4 Pt 1):1236-1242.
- (30) Jaeschke H. Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. *J Hepatol* 1996; 25(5):774-780.
- (31) Jaeschke H, Smith CW, Clemens MG, Ganey PE, Roth RA. Mechanisms of inflammatory liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 139(2):213-226.
- (32) Post S, Menger MD, Rentsch M, Gonzalez AP, Herfarth C, Messmer K. The impact of arterialization on hepatic microcirculation and leukocyte accumulation after liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1992; 54(5):789-794.
- (33) Post S, Gonzalez AP, Palma P, Rentsch M, Stiehl A, Menger MD. Assessment of hepatic phagocytic activity by in vivo microscopy after liver transplantation in the rat. *Hepatology* 1992; 16(3):803-809.

- (34) Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2001; 181(2):160-166.
- (35) Bilzer M, Lauterburg BH. Oxidant stress and potentiation of ischemia / reperfusion injury to the perfused rat liver by human polymorphonuclear leukocytes. *J Hepatol* 1994; 20(4):473-477.
- (36) Menger MD, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow". *Am J Physiol* 1992; 263(6 Pt 2):H1892-H1900.
- (37) Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia - reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am J Physiol* 1992; 263(6 Pt 2):H1901-H1906.
- (38) Menger MD, Vollmar B. The role of microcirculation in organ preservation. In: Hesse UJ, de Hemptinne B, editors. *Organ preservation with UW and HTK solution*. Lengerich: Pabst Science Publishers, 1999: 37-46.
- (39) Vollmar B, Glasz J, Post S, Menger MD. Role of microcirculatory derangements in manifestation of portal triad cross-clamping-induced hepatic reperfusion injury. *J Surg Res* 1996; 60(1):49-54.
- (40) Vollmar B, Richter S, Menger MD. Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. *Am J Physiol* 1996; 270(5 Pt 1):G798-G803.

- (41) Baumstark C, Schenk M, Becker HD, Sessler MJ. Intracellular Ca²⁺ regulation in hepatocytes under experimental transplantation conditions. *Transpl Int* 2002; 15(5):233-239.
- (42) Minor T, Vollmar B, Kötting M, Saad S, Nagelschmidt M, Klauke H et al. Energy metabolism in organ preservation: gaseous aerobiosis to improve viability of fresh and predamaged livers during hypothermic storage. In: Hesse UJ, de Hemptinne B, editors. *Organ preservation with UW and HTK solution*. Lengerich: Pabst Science Publishers, 1999: 47-60.
- (43) Nieminem AL, Saylor AK, Hermann B. ATP depletion rather than mitochondrial depolarization mediates hepatocyte killing after metabolic inhibition. *Am.J.Physiol* 267, 67-74. 1994.
- (44) Sasaki K, Johkura K, Ogiwara N, Liang Y, Cui L, Teng R et al. Three-dimensional morphological analysis of antigen-antibody reaction in hepatic sinusoids preserved in hypothermic UW solution. *Cryobiology* 2001; 42(2):145-150.
- (45) McKeown CM, Edwards V, Phillips MJ, Harvey PR, Petrunka CN, Strasberg SM. Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation* 1988; 46(2):178-191.
- (46) Bilzer M, Gerbes AL. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *J Hepatol* 2000; 32(3):508-515.

- (47) Briceno J, Solorzano G, Pera C. A proposal for scoring marginal liver grafts. *Transpl Int* 2000; 13 Suppl 1:S249-S252.
- (48) Briceno J, Marchal T, Padillo J, Solorzano G, Pera C. Influence of marginal donors on liver preservation injury. *Transplantation* 2002; 74(4):522-526.
- (49) Jassem W, Battino M, Cinti C, Norton SJ, Saba V, Principato G. Biochemical changes in transplanted rat liver stored in University of Wisconsin and Euro-Collins solutions. *J Surg Res* 2000; 94(1):68-73.
- (50) Jamieson NV, Lindell S, Sundberg R, Southard JH, Belzer FO. An analysis of the components in UW solution using the isolated perfused rabbit liver. *Transplantation* 1988; 46(4):512-516.
- (51) 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* 2000; 31(5):1115-1122.
- (52) van Gulik TM, Reinders ME, Nio R, Frederiks WM, Bosma A, Klopper PJ. Preservation of canine liver grafts using HTK solution. *Transplantation* 1994; 57(2):167-171.
- (53) den Butter G, Saunder A, Marsh DC, Belzer FO, Southard JH. Comparison of solutions for preservation of the rabbit liver as tested by isolated perfusion. *Transpl Int* 1995; 8(6):466-471.

- (54) Steininger R, Roth E, Holzmüller P, Reckendorfer H, Grünberger T, Sperlich M et al. Comparison of HTK- and UW-solution for liver preservation tested in an orthotopic liver transplantation model in the pig. *Transpl Int* 1992; 5 Suppl 1:S403-S407.
- (55) Spiegel HU, Schleimer K, Kranz D, Oldhafer KJ. Organ preservation with EC, HTK, and UW solutions in orthotopic liver transplantation in syngeneic rats. Part I: Functional parameters. *J Invest Surg* 1998; 11(1):49-56.
- (56) Spiegel HU, Schleimer K, Freise H, Diller R, Drews G, Kranz D. Organ preservation with EC, HTK, and UW, solution in orthotopic rat liver transplantation. Part II. Morphological study. *J Invest Surg* 1999; 12(4):195-203.
- (57) Kinoshita K, Ikai I, Gomi T, Kanai M, Tsuyuki S, Hirose T et al. Exposure of hepatic sinusoidal mononuclear cells to UW solution in situ but not ex vivo induces apoptosis. *J Hepatol* 1998; 29(2):300-305.
- (58) Diliz-Perez H, Guadalupe VB, Campos D, Diliz-Nava H. [Preservation of hepatocytes in UW and HTK solutions with added fluorocarbons]. *Rev Gastroenterol Mex* 2001; 66(1):27-31.
- (59) Minor T, Hachenberg A, Tolba R, Pauleit D, Akbar S. Fibrinolytic preflush upon liver retrieval from non-heart beating donors to enhance postpreservation viability and energetic recovery upon reperfusion. *Transplantation* 2001; 71(12):1792-1796.

- (60) Tolba RH, Akbar S, Puetz U, Minor T. Current organ preservation solutions for liver preservation: experimental comparison. *Transplant Proc* 2000; 32(7):1673-1674.
- (61) Tolba RH, Akbar S, Muller A, Glatzel U, Minor T. Experimental liver preservation with Celsior: a novel alternative to University of Wisconsin and histidine-tryptophan-alpha-ketoglutarate solutions? *Eur Surg Res* 2000; 32(3):142-147.
- (62) Walcher F, Marzi I, Buhren V. The impact of liver preservation in HTK and UW solution on microcirculation after liver transplantation. *Transpl Int* 1992; 5 Suppl 1:S340-S342.
- (63) Eberl T, Salvenmoser W, Rieger G, Gorny I, Heiss V, Kumpitsch B et al. Ultrastructural analysis of human endothelial cells after hypothermic storage in organ preservation solutions. *J Surg Res* 1999; 82(2):253-260.
- (64) Steinlechner-Maran R, Eberl T, Kunc M, Schrocksnadel H, Margreiter R, Gnaiger E. Respiratory defect as an early event in preservation-reoxygenation injury of endothelial cells. *Transplantation* 1997; 63(1):136-142.
- (65) Jansen H, Jansen PH, Broelsh C. UW is superior to Celsior and HTK in the protection of human liver endothelial cells against preservation injury. *Liver Transpl.* vol. 10, 1514-1523. 2004.

- (66) Sasaki H, Matsuno T, Nakagawa K, Tanaka N. Induction of apoptosis during the early phase of reperfusion after rat liver ischemia. *Acta Med Okayama* 1997; 51(6):305-312.
- (67) Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation* 1999; 67(8):1099-1105.
- (68) Straatsburg IH, Abrahamse SL, Song SW, Hartman RJ, van Gulik TM. Evaluation of rat liver apoptotic and necrotic cell death after cold storage using UW, HTK, and Celsior. *Transplantation* 2002; 74(4):458-464.
- (69) Walcher F, Marzi I, Schafer W, Flecks U, Larsen R. Undissolved particles in UW solution cause microcirculatory disturbances after liver transplantation in the rat. *Transpl Int* 1995; 8(2):161-162.
- (70) Tullius SG, Filatenkow A, Horch D, Mehlitz T, Reutzel-Selke A, Pratschke J et al. Accumulation of crystal deposits in abdominal organs following perfusion with defrosted University of Wisconsin solutions. *Am J Transplant* 2002; 2(7):627-630.
- (71) Gubernatis G, Pichlmayr R, Lamesch P, Grosse H, Bornscheuer A, Meyer HJ et al. HTK-solution (Bretschneider) for human liver transplantation. First clinical experiences. *Langenbecks Arch Chir* 1990; 375(2):66-70.

- (72) de Boer J, Smits JM, De Meester J, van d, V, Bok A, Persijn GG et al. A randomized multicenter study on kidney preservation comparing HTK with UW. *Transplant Proc* 1999; 31(5):2065-2066.
- (73) Hatano E, Tanaka A, Shinohara H, Kitai T, Satoh S, Inomoto T et al. Superiority of HTK solution to UW solution for tissue oxygenation in living related liver transplantation. *Transplant Proc* 1996; 28(3):1880-1881.
- (74) Lange R, Erhard J, Rauen U, de Groot H, Eigler FW. Determination of hepatocellular enzymes in effluent of human liver grafts for preoperative evaluation of transplant quality. *Transplantation* 1996; 62(9):1255-1259.
- (75) Lange R, Erhard J, Rauen U, Hellinger A, de Groot H, Eigler FW. Injury to hepatocytes and non-parenchymal cells during the preservation of human livers with UW or HTK solution: a determination of hepatocellular enzymes in the effluent perfusate for preoperative evaluation of the transplant quality. *Transpl Int* 1996; 9 Suppl 1:S472-S476.
- (76) Gioli-Pereira L, Coradin K, Nagaoka MR, Durval R, Kouyoumdjian M. Enzyme release from injured, preserved and ex vivo reperfused liver does not indicate malfunction. *Transplantation* volume 74, 1081-1083. 2002.
- (77) Cutrin JC, Cantino D, Biasi F, Chiarpotto E, Salizzoni M, Andorno E et al. Reperfusion damage to the bile canaliculi in transplanted human liver. *Hepatology* 1996; 24(5):1053-1057.

- (78) Canelo R, Hakim NS, Ringe B. Experience with histidine tryptophan ketoglutarate versus University Wisconsin preservation solutions in transplantation. *Int Surg* 2003; 88(3):145-151.
- (79) Testa G, Malago M, Nadalin S, Treptow B, Paul A, Frilling A et al. Histidine-tryptophan-ketoglutarate versus University of Wisconsin solution in living donor liver transplantation: results of a prospective study. *Liver Transpl* 2003; 9(8):822-826.
- (80) Pokorny H, Rasoul-Rockenschaub S, Langer F, Windhager T, Rosenstingl A, Lange R et al. Histidine-tryptophan-ketoglutarate solution for organ preservation in human liver transplantation-a prospective multi-centre observation study. *Transpl Int* 2004; 17(5):256-260.
- (81) Walcher F, Marzi I, Buhren V. Liver preservation in UW and HTK solution: the influence on sinusoidal perfusion after liver transplantation. *Transplant Proc* 1991; 23(5):2376-2377.
- (82) Pokorny H, Gruenberger T, Soliman T, Rockenschaub S, Langle F, Steininger R. Organ survival after primary dysfunction of liver grafts in clinical orthotopic liver transplantation. *Transpl Int* 2000; 13 Suppl 1:S154-S157.
- (83) Devlin J, Dunne JB, Sherwood RA, Chambers SM, Tan KC, Peters TJ et al. Relationship between early liver graft viability and enzyme activities in effluent preservation solution. *Transplantation* 1995; 60(7):627-631.

- (84) Codd JE, Garvin PJ, Morgan R, Jellinek M, Newton WT. Allograft viability determined by enzyme analysis. *Transplantation* 1979; 28(6):447-450.
- (85) Sankary HN, McChesney L, Frye E, Cohn S, Foster P, Williams J. A simple modification in operative technique can reduce the incidence of nonanastomotic biliary strictures after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1995; 21(1):63-69.

13. Anexos

Anexo 1

Descrição da avaliação dos doadores de órgãos

O diagnóstico de morte encefálica é firmado de acordo com os critérios estabelecidos na legislação brasileira (lei nº 10.211), que determina o exame clínico padronizado realizado por dois médicos diferentes, um deles com título de especialista em neurologia, com intervalos de seis horas, e posteriormente, a confirmação por exame complementar de imagem (arteriografia de quatro vasos cerebrais, cintilografia perfusional cerebral ou ecografia com doppler de vasos cerebrais) ou EEG de trinta minutos. Simultaneamente, são realizados exames de marcadores de infecções virais crônicas (VHC, VHB, HIV, HTLV, CMV) e parasitárias (Toxoplasmose, Chagas), provas de função hepática (AST, ALT, FA, BT, BD, GGT), uréia, creatinina, TP, eletrólitos (Na⁺, K⁺), hemograma, gasometria arterial, glicemia, amilase e lipase. Os pacientes em morte encefálica com sorologia positiva para HIV, HbsAg e HTLV 1 e 2 não são submetidos a retirada de órgãos; portanto, deixam de ser considerados doadores de múltiplos órgãos.

Anexo 2

Termo de consentimento informado

Estamos realizando uma pesquisa científica para comparar duas soluções de preservação de órgãos que dispomos atualmente. Estas soluções são líquidos que colocamos nos órgãos dos doadores para mantê-los conservados, em ótimas condições, até a hora do transplante.

Ambas as soluções são efetivas na preservação de fígados para transplante, não havendo nenhum prejuízo para sua saúde. No entanto, nós queremos saber qual é a melhor, comparando vários aspectos, através de uma pesquisa pioneira no país. Para tanto, precisaremos analisar um fragmento do fígado retirado antes do transplante (biópsia). Se você aceitar participar desta pesquisa, a sua participação será a de nos permitir analisar este pequeno pedaço de 1 cm³ já retirado, estudar os exames de sangue rotineiramente realizados após a cirurgia e os seus dados clínicos de prontuário.

Gostaríamos de pedir o seu consentimento para que este pesquisador, e a equipe de Transplante Hepático Infantil do HCPA e o Grupo de Transplante Hepático da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, possam utilizar seus dados clínicos e laboratoriais registrados no seu prontuário. O consentimento, por ser um ato voluntário, poderá ser retirado a qualquer momento, sem que haja prejuízo para o seu atendimento na instituição (hospital). Será preservado o seu anonimato e/ou do paciente pelo qual você é responsável, tanto na elaboração como na divulgação dos resultados da pesquisa.

Pesquisador responsável: Dra. Maria Lúcia Zanotelli

Telefone: 33168232 / 32148211

Porto Alegre, ____ de _____ 200__.

Pesquisador:

Paciente ou seu responsável

Anexo 3

A cirurgia de retirada de fígado para transplante

O procedimento cirúrgico era iniciado com uma incisão mediana fúrculo-púbica expondo o mediastino e o abdome (laparotomia e esternotomia), com hemostasia dos vasos da parede abdominal e do esterno. Seguia-se então a inspeção do tamanho, cor, textura e superfície dos lobos hepáticos, bem como a pesquisa de anormalidades como trauma e neoplasias na cavidade abdominal. Caso a macroscopia do fígado aponta-se para esteatose hepática, procedia-se à biópsia de um fragmento em cunha de aproximadamente 1 cm³ do bordo do lobo hepático esquerdo para análise histo-patológica por congelação. Caso o fígado apresenta-se aspecto sugestivo de isquemia ou qualquer outra lesão digna de avaliação histo-patológica imediata, um fragmento hepático era removido para análise por congelação do mesmo modo.

A retirada do enxerto seguia com a secção dos ligamentos redondo e triangular esquerdo, seguido da abertura do omento gastro-hepático, observando-se para reconhecer a presença eventual da artéria hepática esquerda acessória, presente em 10% dos doadores. O pilar diafragmático é incisado, e a aorta supra-celíaca exposta e cerclada. A seguir, mobilizava-se o cólon direito e o duodeno amplamente até a raiz da artéria mesentérica superior, expondo os grandes vasos do retroperitônio. A VCI e a aorta infra-renal eram cercladas. A veia mesentérica superior (VMS) era identificada na base do mesocólon e cerclada. Procedia-se á dissecação do pedículo hepático por meio de ligaduras com fio absorvível

multifilamentar de poligalactina (Vicryl 3.0). A artéria hepática era individualizada e pesquisava-se a presença de artéria hepática direita acessória, presente em torno de 15% dos casos. A veia porta e a via biliar principal eram identificadas e o ducto colédoco seccionado junto ao seu trajeto retro-duodenal, após ligadura distal. Como fase final era realizada a colecistectomia e lavagem das vias biliares com soro fisiológico. Após 5 minutos da injeção endovenosa em *bolus* de 200 unidades de heparina por kg de peso do doador, procedia-se a canulação da aorta e da VMS. Tendo sido ligada próxima a bifurcação dos vasos ilíacos, a aorta infra-renal era canulada de forma retrógrada diretamente com a ponta terminal de um equipo de 10 mm de diâmetro. A VMS era ligada distalmente e canulada com cânula aramada venosa de 12 F. O clampeamento aórtico supra-celíaco e da veia cava inferior (VCI) infra-renal eram realizados e a cava justa-atrial e infra-renal seccionadas para termos início a perfusão dos órgãos abdominais e a isquemia fria. Ao mesmo tempo, os órgãos eram resfriados externamente com solução de Ringer lactato congelada.

Ao término da perfusão, em torno de 20 minutos, realizava-se a dissecação da veia porta, que era seccionada junto à sua origem, atrás do pâncreas. Após eram realizada a dissecação minuciosa da artéria hepática até sua origem no tronco celíaco e aorta, com ligadura das artérias gástrica esquerda e esplênica com Vicryl 3.0. A aorta então era seccionada, deixando um *patch* de Carrel ligado ao tronco celíaco. Em seguida, A VCI era igualmente dissecada e seccionada acima das veias renais e a veia cava supra-hepática tinha suas dissecação circunferencial realizada no mediastino, separando-a do centro tendíneo do diafragma. As últimas aderências do fígado ao diafragma e os ligamentos

triangular direito e hépato-renal eram seccionados. O órgão era removido da cavidade e novamente perfundido por via portal e arterial com 500 ml de solução de preservação em cada território vascular, e embalado em saco plástico estéril juntamente com o perfusato. Entende-se como perfusato a solução que drenou pelo sistema das veias hepáticas para a cava do enxerto imediatamente após a infusão de qualquer solução pelo sistema venoso portal ou arterial hepático.

O enxerto hepático era acondicionado em dois sacos de plásticos estéreis e colocado em uma caixa de plástico rígida cheia de Ringer lactato gelado. Esta, por sua vez, era novamente ensacada e armazenada sob gelo não estéril, contido em caixa térmicas padrão de 40 litros, para transporte de órgãos. Finalmente, os vasos ilíacos eram retirados, embalados e acondicionados da mesma forma que o fígado, para serem utilizados como possíveis enxertos vasculares, caso necessário.

Anexo 4

RELATÓRIO DO DOADOR DE FÍGADO

CIRURGIÕES: _____ / _____

NOME: _____ IDADE: _____ anos

COR: b p m a SEXO: f m DATA NASC.: ____ / ____ / ____

CAUSA MORTIS:

MORTE ENCEFÁLICA: data: ____ / ____ / ____ . hora: _____ h.

TESTE CONFIRMATÓRIO: arteriografia ecodoppler EEG

PRESSÃO ARTERIAL: na UTI: ____ / ____ mmHg; na cirurgia: ____ / ____ mmHg

DROGAS VASOATIVAS: noradrenalina _____ ml/h
_____ mc/Kg/min

dopamina _____ ml/h
_____ mc/Kg/min

PCR: não sim RCR: ____ min. TRAUMA ABDOME: não sim

ALCOOLISMO: não sim ____ anos DROGADIÇÃO: não sim ____ a

SOROLOGIA: Anti- HIV: neg pos HTLV I e II: neg pos

Anti-HBs: neg pos HBs-Ag: neg pos

Anti-HBc IgG: neg pos Anti-HBc IgM: neg pos

Toxo IgG: neg pos Toxo IgM: neg pos

Chagas IgG: neg pos Chagas IgM: neg pos

CMV IgG: neg pos CMV IgM: neg pos

VDRL: neg pos FTA.ABS: neg pos

Anti-HSV IgG: neg pos Anti-HSV IgG: neg pos

EXAMES LABORATORIAIS:

| | | |
|------------|--|--|
| TGO | | |
| TGP | | |
| FA | | |
| GGT | | |
| BT | | |
| BD | | |
| LDH | | |
| AMILASE | | |
| LIPASE | | |
| UREIA | | |
| CREATININA | | |
| SÓDIO | | |
| POTÁSSIO | | |
| GLICEMIA | | |

SOLUÇÃO DE PRESERVAÇÃO: UW HTK

INÍCIO: DA CIRURGIA: ____ h ____ min **DA PERFUSÃO:** ____ h ____ min.

FIM DA PERFUSÃO: ____ h ____ min. **FÍGADO NO GELO:** ____ h ____ min.

ARTÉRIA HEPÁTICA:: TC c/ D+M+E DIR ramo AMS: ESQ ramo AGE
 _____(outra)

HOSPITAL DE ORIGEM: _____

HOSPITAL DE RETIRADA: _____

Anexo 5

A cirurgia de transplante hepático

A hepatectomia total

A incisão padrão realizada é a de Hasegawa: subcostal bilateral com extensão medial superior até o apêndice xifóide. Através de uma dissecação junto à placa hilar, a via biliar extra-hepática era dissecada e ligada o mais proximal possível, enquanto que a artéria hepática era ligada nas suas ramificações direita e esquerda. A veia porta era preparada da mesma forma, porém, permanecia sem ligadura, mantendo fluxo ao fígado e evitando congestão esplâncnica a montante. Os ramos tributários retro hepáticos da VCI eram suturados com PDS 5.0, conforme a técnica de *Piggyback*, que permite a preservação da cava retro-hepática. Após o clampeamento da veia porta e sua secção distal sob a placa hilar, inicia a fase anapática da cirurgia. Procedia-se, então, ao clampeamento e à secção das veias supra-hepáticas, criando-se assim, um óstio único e comum, para a anastomose com a veia cava supra-hepática do enxerto.

O implante

Com o enxerto no campo cirúrgico, o implante iniciava com a anastomose das veias supra-hepáticas do receptor com a veia cava supra-hepática do enxerto de forma término-terminal com Prolene 3.0 ou 4.0 contínuo. Na impossibilidade de fazermos uso desta anastomose, foi usada uma variante da técnica que é a anastomose látero-lateral, com ambas as veias cavas retro-hepáticas. A veia porta

era anastomosada de forma término-terminal com PDS 6.0 e, antes da reperfusão venosa, o enxerto era lavado através da veia porta, com 1 litro de solução de Ringer lactato a temperatura ambiente (+- 22° C), para a retirada da solução de preservação. A anastomose portal é então concluída e libera-se os clampes da veia porta e a seguir das veias supra-hepáticas e ocorre a reperfusão venosa do enxerto.

A seguir realizava-se a anastomose arterial de forma também término-terminal com fios de PDS 6.0 contínuo ou 7.0 em pontos separados. Na maioria das vezes se faz a anastomose da artéria hepática própria do receptor com o tronco celíaco do enxerto. Após a revascularização arterial do enxerto, com todas as anastomoses vasculares concluídas, a via biliar principal era reconstruída através de anastomose término-terminal, sem drenagem externa. Na eventualidade de discrepância importante entre o calibre das vias biliares, era realizada uma anastomose em Y de Roux. A drenagem da cavidade era utilizada de maneira criteriosa, conforme o perfil de coagulação do paciente e o julgamento do cirurgião com relação ao campo cirúrgico. O fechamento da cavidade foi realizado com fio de Vycril 0 em três planos aponeuróticos, Vycril 3.0 contínuo no subcutâneo e Mononylon 3.0 em Donatti na pele.

Anexo 6

Exames bioquímicos

Os níveis séricos das bilirrubinas (BT e BD) são o resultado da sua produção, conjugação e excreção na bile. A elevação da BT e BD no soro é inespecífica e apenas moderadamente sensível como teste de função hepática, podendo estar relacionada a processos inflamatórios intra-hepáticos, como hepatite e rejeição, bem como colestase extra-hepática relacionada à obstrução de vias biliares. É possível que níveis séricos alterados não retornem de imediato ao normal logo após resolução do quadro responsável por seu aumento, uma vez que grande parte da BD forma ligação covalente com a albumina sérica, que tem meia vida de até 3 semanas.

A atividade sérica da fosfatase alcalina (FA) reflete a produção de um grupo de isoenzimas derivadas do fígado, ossos, intestino e placenta. O nível sérico de FA está elevado na colestase intra e extra-hepática, na obstrução parcial ou completa dos ductos biliares, nas doenças infiltrativas e granulomatosas do fígado e na regeneração óssea. A FA está localizada na membrana celular dos hepatócitos. Durante períodos de colestase em que também ocorre dano celular do epitélio biliar, fragmentos de membrana são solubilizados na corrente sanguínea. O aumento no nível de ácidos biliares hepáticos também estimula a síntese de FA.

A gama-glutamiltansferase (GGT) é outra enzima de membrana plasmática dos hepatócitos, bem como a 5'-nucleotidase (5'-NT), e são liberadas

na circulação em episódios de obstrução biliar e colestase.

A alanino-aminotransferase (ALT/TGP) e a aspartato-aminotransferase (AST/TGO) são enzimas intra-celulares de transferência de aminas presentes em grande quantidade nos hepatócitos. Após lesão ou destruição das células hepáticas, são liberadas na circulação. São provas sensíveis de lesão hepática, e a magnitude da sua atividade sérica reflete a gravidade da necrose hepática. Podem estar elevadas em casos de rejeição celular aguda, hepatites agudas, esteatose, hemocromatose ou mesmo hepatite viral crônica. O aumento de 15 vezes dos seus valores normais está fortemente relacionado à lesão inflamatória aguda hepática e necrose hepatocelular. A AST é menos específica, podendo refletir necrose de tecido muscular esquelético ou cardíaco, como no infarto do miocárdio.

O tempo de protrombina (TP) e o Fator 5 (FV) refletem a capacidade de síntese protéica hepática. São fatores de coagulação exclusivamente produzidos nos hepatócitos, e a diminuição dos seus níveis séricos está relacionada à hepatopatia aguda ou crônica e com a diminuição da atividade pró-coagulante da via intrínseca da coagulação.