

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Avaliação experimental da viabilidade hepática, após isquemia normotérmica, pela espectroscopia de fluorescência induzida por laser (EFIL).

Jorge Luiz Fernandes

Ribeirão Preto

2008

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Avaliação experimental da viabilidade hepática, após isquemia normotérmica, pela espectroscopia de fluorescência induzida por laser (EFIL).

Dissertação de Mestrado

Jorge Luiz Fernandes

Ribeirão Preto

2008

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Avaliação experimental da viabilidade hepática, após isquemia normotérmica, pela espectroscopia de fluorescência induzida por laser (EFIL).

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

Área de Concentração: Ciências Médicas – Clínica Cirúrgica

Jorge Luiz Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Ajith Kumar Sankarankutty

Ribeirão Preto

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Fernandes, Jorge Luiz

Avaliação experimental da viabilidade hepática, após isquemia normotérmica, pela espectroscopia de fluorescência induzida por laser (EFIL)
Ribeirão Preto, 2008.
90p.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – Departamento de Cirurgia e
Anatomia. Área de Concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Sankarankutty, Ajith Kumar

1.Isquemia hepática 2. Viabilidade Hepática 3. Espectroscopia da
Fluorescência induzida por laser 4.Ratos

**“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas
incomparáveis.”**

Fernando Pessoa

Este trabalho foi realizado na unidade de Cirurgia Experimental da FMRP-USP, Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP-USP em conjunto com o Laboratório de Patologia, Departamento de Patologia da FMRP-USP, com o Laboratório do Grupo de Óptica, Instituto de Física de São Carlos – USP e com o Instituto de Anatomia Patológica de São Carlos.

À minha esposa Andréa e aos meus filhos Matheus e Carolina.

Agradecimentos

*Ao Departamento de Cirurgia e Anatomia de FMRP-USP
À Cirurgia Experimental da FMRP-USP
Ao Departamento de Óptica do Instituto de Física de São Carlos-USP
Ao Departamento de Patologia de FMRP-USP
À Seção de Pós-graduação da FMRP-USP
Ao Instituto de Anatomia Patológica de São Carlos*

*Ao Dr. Ajith Kumar Sankarankutty
Ao Dr. Orlando de Castro e Silva Jr.
Ao Dr. Vanderlei Salvador Bagnato
À Dra. Cristina Kurachi
À Dra. Juliana Ferreira
Ao Sebastião Pratavieira
Ao Dr. Sérgio Zucoloto
Ao Dr. Michel Antonio Kiyota Moutinho*

*À Marcia Aparecida Baratella
À Elis Regina Alves
À Juliana P. da Silva
Ao Sebastião Mazedo
À Maria Aparecida Neves Cardoso Picinato
À Clarice Fleury Fina
À Maria Cecília Jordani Gomes
À Maria Eliza Jordani de Souza
Ao Roberto Molina de Souza*

*À minha mãe Therezinha
À minha avó Annita
Ao meu avô José Nazzari (in memoriam)
À minha família*

À minha secretária Marley Schichi Pessa

Às pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho sob a forma de auxílio técnico ou pessoal

A todos os colegas médicos de São Carlos, pelo apoio e pelo suporte.

Resumo

Novos métodos para a caracterização de tecidos ou para investigar e analisar diversos parâmetros teciduais têm sido buscados ultimamente. A avaliação da viabilidade do fígado de ratos pela “espectroscopia de fluorescência induzida por laser” após isquemia normotérmica visa mostrar a eficácia do método e delinear critérios objetivos na sua utilização. A função mitocondrial, provas bioquímicas e a morfometria foram utilizadas como indicadores da viabilidade hepática. Estudos recentes mostram a eficácia do método em condições de hipotermia. Outros estudos foram realizados com outros parâmetros.

Os animais foram divididos em dois grupos: G1(isquemia parcial de 1 hora), com 12 animais, G2(isquemia parcial de 2 horas), também com 12 animais. A isquemia parcial foi realizada com oclusão vascular do lobo mediano e do lobo lateral esquerdo, permitindo fluxo sanguíneo para o lobo caudado e para o lobo lateral direito. Após o período de isquemia a pinça vascular foi removida e as leituras da espectroscopia de fluorescência foram realizadas antes da isquemia, após o período de isquemia e 24 horas após a reperfusão. Imediatamente após as leituras espectroscópicas, foram realizadas coletas de sangue para dosagem das bilirrubinas, AST, ALT e DHL. Após a última coleta de sangue o tecido hepático, do lobo submetido à isquemia, foi retirado e encaminhado parte para o exame histopatológico (morfometria) e parte para avaliação da função mitocondrial.

Foi possível comparar os padrões espectrais com a área de necrose. Os padrões espectrais foram distintos nas 3 fases e foi possível avaliar evidências de associação das respostas da espectroscopia de fluorescência com relação à Morfometria, pelo Teste Exato de Fisher ($p < 0,01$), e também em relação à sua concordância, pelo Coeficiente Kappa, variando de concordância moderada à concordância quase perfeita. Valores semelhantes foram obtidos na avaliação do Potencial de Membrana mitocondrial.

A “espectroscopia de fluorescência induzida por laser” após isquemia normotérmica mostrou ser um método rápido e eficaz na avaliação de lesões isquêmicas e de tecidos viáveis.

Abstract

New methods that discriminate tissue characteristics or investigate and analyze several tissue parameters have been lately under study. The experimental evaluation of hepatic viability by laser induced fluorescence spectroscopy after normothermic ischemia aims to show the efficacy of the method and to delineate objective tools in its utilization. Mitochondrial function, biochemistry tests and morfometry were used as hepatic viability indicators. Recently studies show the efficacy of the method for hypothermic conditions. Many others studies were performed with different parameters.

The animals were divided into two groups: G1 (One hour partial hepatic ischemia), with 12 animals and G2 (Two hours partial hepatic ischemia) with 12 animals as well. The partial hepatic ischemia was performed with the vascular occlusion of the median lobe and of the left lateral lobe, allowing circulation to the right lateral lobe and to caudate lobe. After ischemia the vascular clamp was removed and laser induced fluorescence spectra were taken before ischemia, after ischemia and 24 hours after reperfusion. Immediately after the fluorescence measurement, blood harvest was done to laboratorial evaluation, for Bilirubin, AST, ALT and DHL dosage. After the last blood harvest, the hepatic ischemic lobe was removed. A tissue sample was used for morfometric analysis and another one for mitochondrial function performance test.

It was possible to correlate spectral features with necrosis area. The spectral curve-fitting were different at the 3 phases and it was possible to evaluate evidences of response of laser induced fluorescence spectroscopy in relation to morfometry by Fisher's exactly test ($p < 0.01$) and in relation of its concordance, as well, by Kappa coefficient, with results between moderate concordance to almost perfect concordance. Similar results were acquired in the evaluation of mitochondrial membrane potential.

The "laser induced fluorescence spectroscopy" after normothermic ischemia showed to be a fast and efficient method to evaluate ischemic injury and viable tissues.

Sumário

1.	Introdução.....	12
	a. Isquemia e Reperusão.....	12
	b. Isquemia e Reperusão no Transplante Hepático.....	14
	c. Espectroscopia da Fluorescência Induzida por Laser.....	16
	d. Métodos Comparativos.....	23
	i.Avaliação Laboratorial.....	23
	ii.Avaliação Histopatológica e Morfométrica.....	24
2.	Objetivo.....	25
3.	Método.....	26
	a. Animal de Experimentação.....	26
	b. Delineamento de Pesquisa.....	26
	c. Procedimento Operatório.....	28
	d. Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser.....	30
	e. Análise das Componentes Principais.....	34
	f. Estudo Laboratorial.....	35
	i.Função Mitocondrial.....	35
	ii.Bioquímica.....	36
	g. Estudo Histopatológico e Morfométrico.....	38
	h. Análise Estatística – Objetivo e Metodologia.....	39
	i. Metodologia para a Apresentação.....	40
4.	Resultados	41
	a. Espectroscopia da Fluorescência Induzida por Laser.....	41
	b. Análise das componentes principais.....	51
	c. Resultados Laboratoriais	58
	d. Resultado Histopatológicos e Morfométricos.....	62
	e. Resultados Estatísticos.....	68
5.	Discussão.....	77
6.	Conclusão.....	80
7.	Referências bibliográficas.....	81
8.	Abreviaturas.....	88

1. Introdução

a. Isquemia e Reperfusão Hepática

A lesão isquêmica do fígado representa um importante problema nas grandes cirurgias hepáticas, transplante de fígado, choque e trauma. O tempo que células, tecidos e órgãos ficam viáveis sem o suprimento sanguíneo é finito, mas pode variar dependendo do órgão e da espécie. Alguns autores relatam que o fígado humano pode suportar até 60 minutos de isquemia, sem aumento das complicações pós-operatórias, falência hepática ou mortalidade^(1,2).

Isquemia e reperfusão são eventos distintos. Sem oxigênio as células morrem. A hipotermia protege, mas pode não prevenir disfunção progressiva e destruição. A fisiopatologia do tecido sem suprimento sanguíneo é bem descrita⁽³⁾ (Figura 1.1).

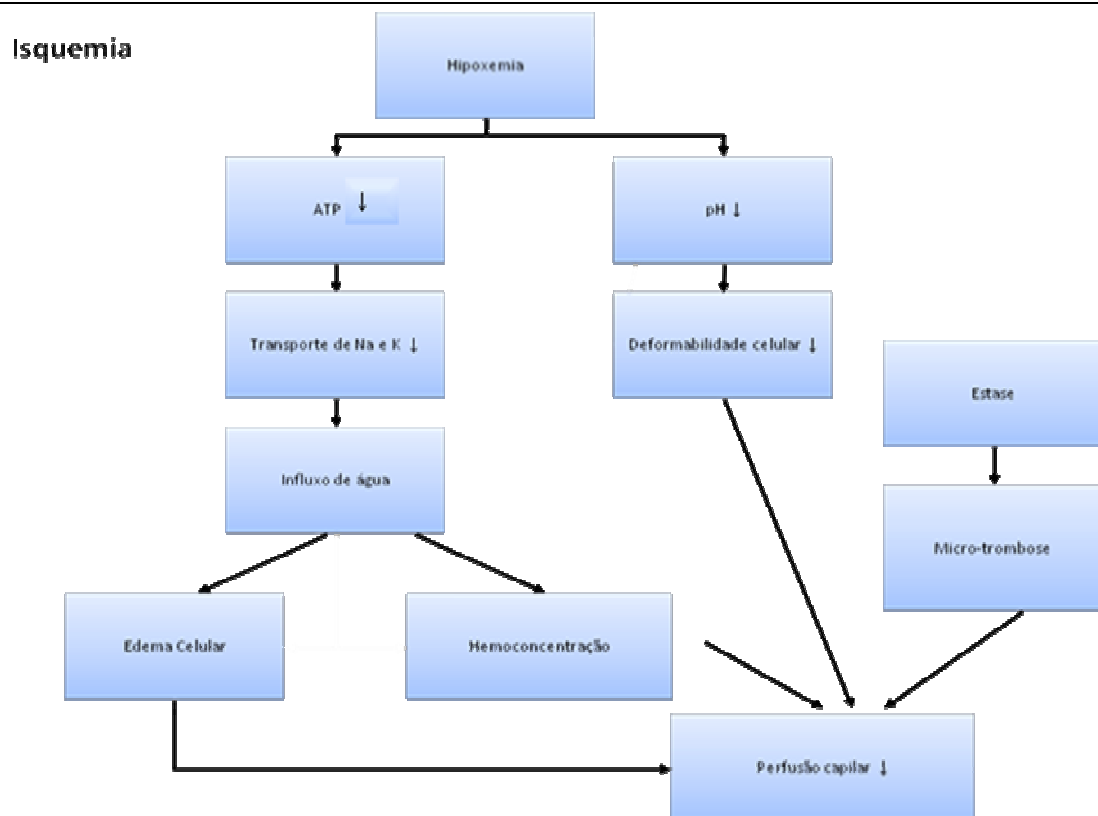


Figura 1.1 – Mecanismos fisiopatológicos nas lesões por isquemia (Adaptado de Prague Applications in Microscopic Circulation, Vol 19, Menger MD, et al, p106. Copyright 1993) .

Há diminuição energética com isquemia tecidual, inibição de transporte pela membrana, sobrecarga de cálcio, distúrbios do metabolismo do ácido aracdônico, elevada produção de agentes vasoconstrictores e aumento dos leucócitos endoteliais com interação dos neutrófilos. Seqüelas de lesão por isquemia e reperfusão são observadas, como dano endotelial, que pode contribuir para arteriopatia crônica, e resposta inflamatória ⁽⁴⁾. Há um aumento do volume das células endoteliais como um resultado do influxo de íons e de água ⁽⁵⁾, com aumento do órgão. Devido à migração da água ocorre hemoconcentração. A anóxia leva à acidose e também altera a visco-elasticidade dos leucócitos circulantes e dos macrófagos, deixando-os compactados e obstruindo a microvasculatura levando à redução ainda maior do suprimento sanguíneo. A captura e agregação passiva dos eritrócitos acentuam o processo.

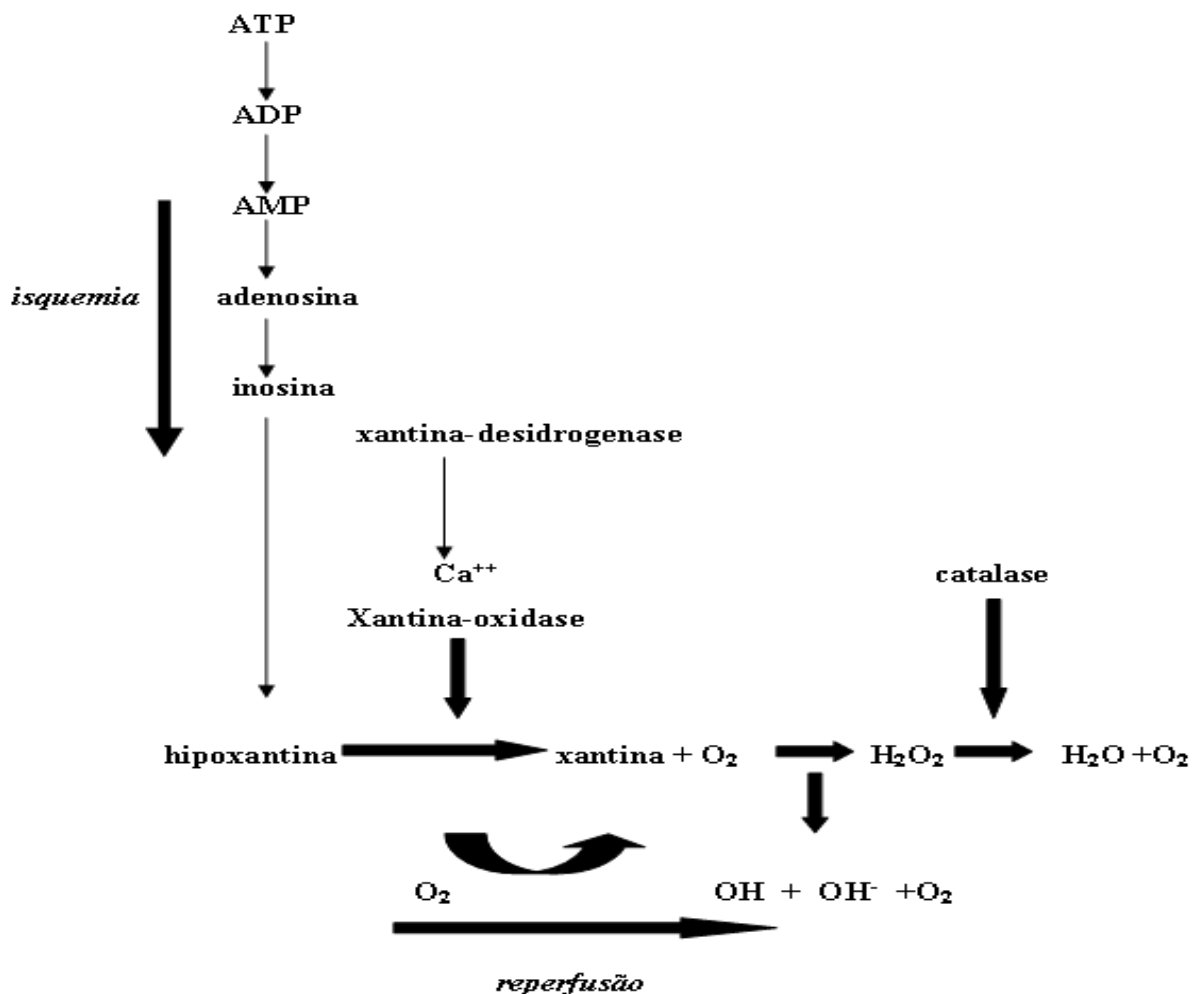
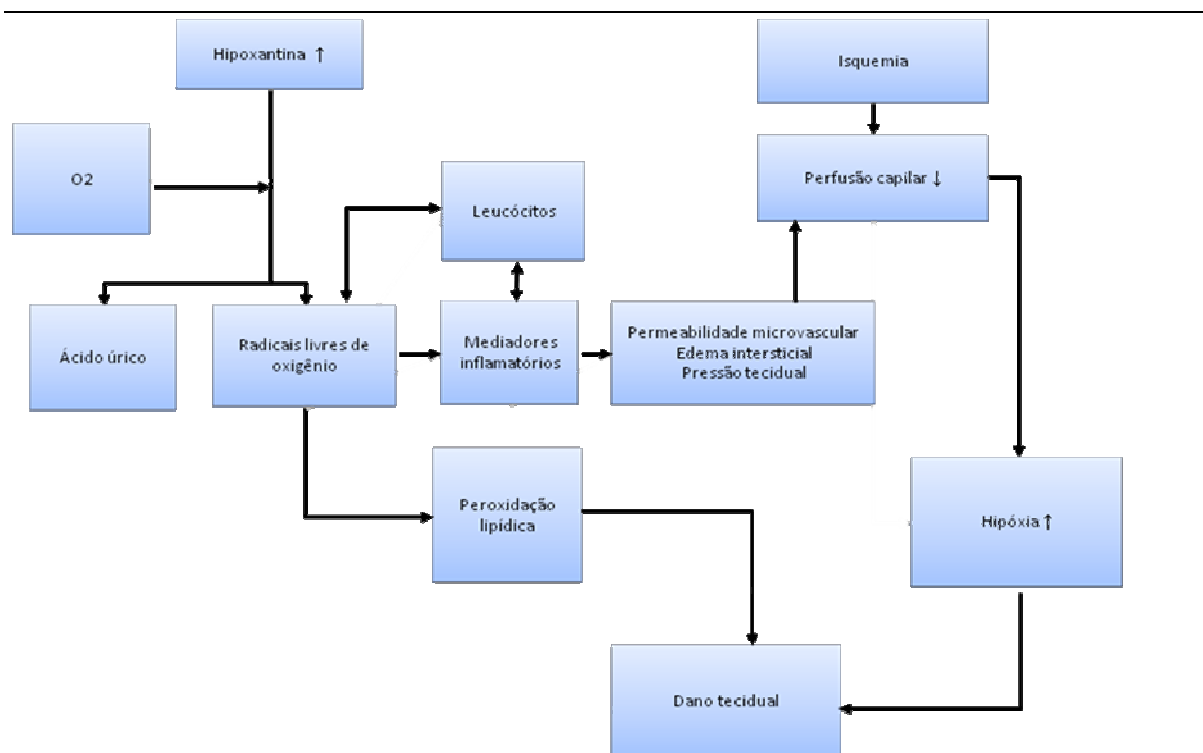


Figura 1.2 - Mecanismos de produção de radicais livres pela ação da xantina oxidase ⁽⁸⁾.

Estes fatores em combinação podem obstruir o fluxo mesmo após a reperfusão, levando à isquemia adicional e maior dano às células já lesadas. O aumento da síntese da

prostaglandina H e da lipoxigenase, na presença do NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) ou do NADPH (NADP reduzido), ativa neutrófilos e produz superóxido (O_2), que também é sintetizado na mitocôndria após isquemia e reperfusão ^(6,7).

A reperfusão, em contraste, pode restaurar a oxigenação e a viabilidade do tecido. Ao mesmo tempo, a maior parte do dano associado com isquemia e reperfusão, é causada por eventos associados com a reperfusão, o “paradoxo da reperfusão”, pela produção dos radicais livres de oxigênio pela ação da xantina-oxidase ⁽⁸⁾ (Figura 1.2) e pela redução da perfusão capilar (Figura 1.3).



Reperfusão

Figura 1.3 - Mecanismos fisiopatológicos nas lesões por reperfusão (Adaptado de Prague Applications in Microscopic Circulation, Vol 19, Menger MD, et al, p106. Copyright 1993).

b. Isquemia e Reperfusão no Transplante Hepático

O transplante de fígado está bem estabelecido como tratamento na insuficiência hepática, e, maior atenção deve ser dada na avaliação do órgão nas várias etapas do transplante (Figura 1.4). Um fator crítico para o sucesso no transplante é a integridade do metabolismo energético e balanço de oxigênio micro-vascular e mitocondrial intracelular do

fígado. O suprimento de oxigênio para as células depende da saturação de hemoglobina (HbO₂), fluxo sanguíneo tecidual e pressão parcial tecidual de oxigênio ⁽⁹⁾. A demanda de oxigênio é específica para cada órgão.

O dano ao fígado causado pela isquemia e reperfusão representa um processo contínuo que culmina com lesão hepatocelular. Este processo é deflagrado quando o fígado é transitoriamente privado de oxigênio, e pode ocorrer durante o processo de transplante. A forma mais grave de disfunção do enxerto, que é o Não-Funcionamento Primário, ocorre em somente de 10 a 20% dos fígados transplantados, é associado com alta taxa de falência hepática e retransplante precoce e morte ⁽¹⁰⁻¹²⁾.

Avaliação mais objetiva da lesão por isquemia e reperfusão poderia aumentar o número de pacientes transplantados com sucesso, através da utilização de uma parcela de enxertos que são descartadas após sua avaliação subjetiva. É importante, então, monitorar o tecido, nos vários passos no transplante. Diferentes técnicas podem ser requeridas para a avaliação da vitalidade tecidual ⁽⁹⁾.

Estas técnicas podem ser utilizadas comparando-as com os seguintes estágios do procedimento de transplante: (1) durante o estágio de pré-transplante no doador, (2) durante a preservação, (3) durante o transplante, propriamente dito, e (4) durante o período pós-transplante imediato.

MONITORAMENTO NOS ESTÁGIOS DO TRANSPLANTE

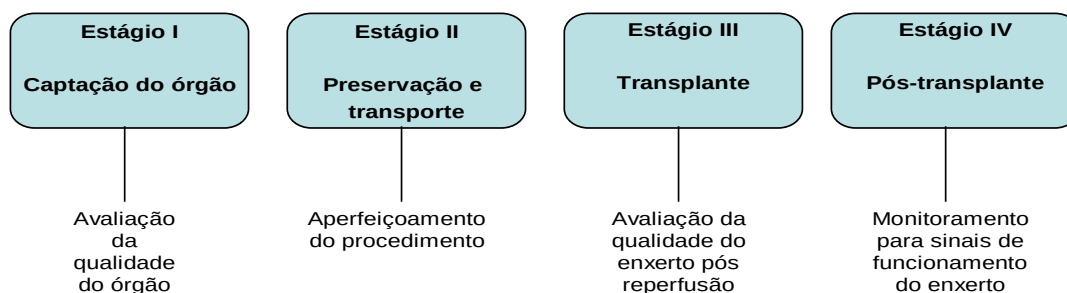


Figura 1.4 – Estágios no transplante e objetivos da avaliação em cada estágio.

A isquemia no transplante pode ser dividida em três fases sequenciais ^(13,14). A primeira fase pode envolver episódios de isquemia quente causada por hipotensão do doador com vasoconstrição, muitas vezes ampliada com uso de drogas vasoativas. Isquemia adicional pode ser produzida durante o isolamento cirúrgico do órgão e a remoção do tecido a ser transplantado. A segunda fase envolve a isquemia fria associada à preservação do órgão e transporte. A terceira envolve um período de isquemia normotérmica, que ocorre durante a revascularização.

O restabelecimento do fluxo sanguíneo ao fígado recém transplantado impõe a ele nova agressão, agravando a lesão causada pelo período de isquemia. Este fenômeno é conhecido como lesão por reperfusão e envolve, como já referido anteriormente, disfunção endotelial, seqüestro de leucócitos, agregação de plaquetas, lesão por radicais livres de oxigênio e distúrbios da micro-circulação hepática.

A avaliação da função tecidual nos vários estágios para o transplante é relevante, particularmente no momento da captação do órgão quando é feita a decisão da utilização do órgão ou não.

c. Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (EFIL)

A EFIL é um método que se baseia na detecção e análise de um feixe de radiação eletromagnética vinda de uma amostra do material.

O fenômeno de fluorescência foi descoberto por Stokes, em 1852, quando notou esse tipo de emissão do fluoreto. Ele verificou que, quando iluminadas com luz ultravioleta (UV), as amostras de fluoreto emitiam radiação em comprimentos de ondas maiores. Mas foi somente no século 20 que o potencial da fluorescência para fins médicos começou a ser investigado. Stubel, em 1911, notou que tecidos de animais emitiam luz fluorescente, quando expostos à radiação UV. A fluorescência era observada a olho nu e classificada de acordo com a coloração da luz emitida ⁽¹⁵⁾.

Técnicas de espectroscopia óptica têm sido investigadas ultimamente em busca de novos métodos minimamente invasivos ou mesmo não-invasivos, para a caracterização de tecidos ou para investigação e análise de diversos parâmetros teciduais. Quando comparado às técnicas de imagem baseadas na radiação ionizante ou técnicas de ressonância magnética, podemos dizer que a fluorescência é uma técnica de inspeção superficial, uma vez que a luz de excitação da fluorescência penetra apenas nas camadas superficiais do tecido biológico. Sistemas que conseguem imagens a partir das superfícies teciduais são importantes, do ponto

de vista diagnóstico, por permitirem analisar rapidamente áreas sem remover tecidos. Essas técnicas desenvolvidas para a caracterização dos tecidos são freqüentemente chamadas de “biópsias” ópticas, um termo contraditório, uma vez que “biópsia” implica em retirada de amostras do tecido, enquanto “óptico” sugere uma avaliação baseada em meios ópticos não invasivos e não destrutivos. A base de todas as técnicas de espectroscopia óptica é que alterações fisiológicas, morfológicas ou bioquímicas associadas com distúrbios físicos, afetam a interação do tecido com a luz. Portanto, o aspecto-chave é encontrar os padrões de sinais ópticos característicos para cada situação clínica.

A EFIL, por exemplo, avalia a relação entre o aporte e o consumo de oxigênio pela medida nas alterações de oxi-hemoglobina, desoxi-hemoglobina e o volume de sangue total tecidual. A luz de excitação é conduzida para o tecido através de uma ou de um conjunto de fibras ópticas. A emissão da luz, junto com a luz retro-espalhada no comprimento de onda de excitação, é transferida para o espectrofotômetro através de outro conjunto de fibras. A quantidade de luz recuperada após a interação dos fótons com o tecido depende da quantidade de luz absorvida pelos cromóforos teciduais, da quantidade de luz dispersada e também do quanto o tecido transforma a luz absorvida em fluorescência. É importante saber que tipo de interação ocorre entre a radiação e a matéria e que tipo de informação pode ser obtido com cada técnica espectroscópica ⁽¹⁶⁾. As alterações medidas pela fluorescência e pelo retro-espalhamento são calculadas em porcentagens como valores relativos com o sinal de calibração sem a luz. O tipo de calibração não é absoluto, mas oferece resultados seguros e reprodutíveis de diferentes animais e entre diferentes laboratórios ^(17,18).

Na espectroscopia da fluorescência, uma amostra é irradiada com luz UV-visível e detecta-se a radiação emitida pela amostra submetida à iluminação. Experimentalmente procura-se determinar a intensidade com que ocorre a emissão em cada comprimento de onda, o desvio na direção de polarização quando a luz incidente é polarizada e o intervalo de tempo no qual a molécula permanece em estado excitado ⁽¹⁶⁾.

Moléculas biológicas são em geral configurações eletrônicas muito complexas. Quando uma molécula em seu estado fundamental absorve energia suficiente, a partir da luz incidente, ela é excitada para um estado eletrônico de maior energia. Essa transição eletrônica das moléculas ocorre tão rápido que o núcleo não muda sua posição relativa no movimento vibracional. Isso leva a uma excitação que não necessariamente é o menor nível vibracional no estado excitado, mas freqüentemente um nível maior. Uma vez que os estados excitados são instáveis, a molécula tende a perder o excesso de energia e retornar ao nível de menor

energia. Segue-se um rápido relaxamento para o menor nível rotacional-vibracional do estado excitado. Esse processo chama-se conversão interna (CI). O tempo de relaxamento é da ordem de pico-segundo (ps). A energia perdida nesse relaxamento pode ser absorvida pelas moléculas vizinhas e convertida em calor, em um processo não radioativo, isto é sem emissão de luz. Após as perdas de energia pela CI no estado excitado, a molécula retorna para o estado fundamental emitindo fótons de menor energia (maior comprimento de onda) quando comparados com a energia dos fótons de excitação. Esse processo chama-se fluorescência e a luz emitida, quando comparada à luz de excitação, é deslocada em direção a região do vermelho (conhecido como deslocamento de Stokes), devido à energia perdida pela CI. O tempo de fluorescência é da ordem de nano-segundo (ns) (1) (Figura 1.5).

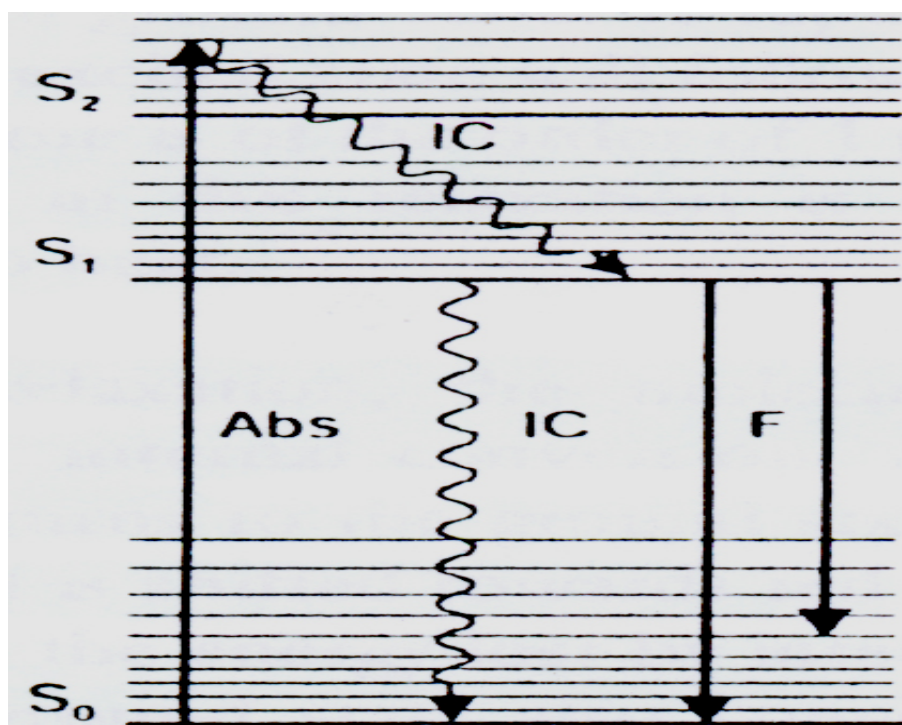


Figura 1.5 - A figura corresponde ao diagrama de Jablonski, que demonstra de forma esquemática a mudança da molécula do estado fundamental ao estado excitado e a ocorrência da conversão interna e fluorescência. Abs – absorção. IC – conversão interna. F – fluorescência. S₀ – estado fundamental. S₁ e S₂ – estados excitados.

Quando expostos à luz UV ou próximos ao UV, os tecidos dos mamíferos emitem luz fluorescente com comprimento de onda próximo à região azul-verde do espectro eletromagnético. Essa fluorescência é freqüentemente chamada de auto-fluorescência tecidual e origina-se dos fluoróforos endógenos dos tecidos, que são biomoléculas capazes de absorver a energia e devolvê-las na forma de luz. Os fluoróforos teciduais mais importantes são

triptofano, colágeno e elastina, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e seu fosfato (NADPH), flavinas e flavoproteínas, beta-caroteno e porfirinas. Na EFIL pode ser analisada a fluorescência dos fluoróforos teciduais endógenos ou dos marcadores fluorescente exógenos, usados para aumentar o contraste entre os tecidos saudáveis dos tumores ⁽¹⁵⁾.

Quando se planeja utilizar a espectroscopia, deve-se levar em consideração a fonte de luz de excitação, o comprimento de onda de excitação, o método de detecção do espectro e, por fim, o método de avaliação do espectro ⁽¹⁵⁾.

As fontes de luz de excitação para estudos de fluorescência podem ser divididas em dois grupos, lâmpadas e laser. A escolha da fonte de luz baseia-se em alguns fatores como, por exemplo, a região do espectro eletromagnético adequado para excitação do tecido-alvo, além da técnica de detecção usada, a portabilidade e a operabilidade. O laser tem várias vantagens como a emissão de alta intensidade numa região de comprimento de onda estreito, além de oferecer um feixe altamente colimado (paralelo), permitindo acoplamento eficiente da luz em fibras ópticas. Nesse sentido a utilização do sistema pode ser realizada em órgãos internos acessíveis à fibra óptica, como esôfago e pulmão (brônquios). No caso das lâmpadas como fontes de excitação, convencionalmente são empregadas aquelas com linhas específicas de emissão, possibilitando a escolha de regiões diferentes do espectro eletromagnético. No campo do fotodiagnóstico em sistemas biológicos, a excitação mais utilizada é na região do UV e violeta ⁽¹⁵⁾.

Entre os aspectos de fluorescência que podem ser analisados estão a intensidade de emissão em função do comprimento de onda, e o tempo de vida do estado excitado. A maioria dos sistemas adaptados para as atividades clínicas examina pelo menos um desses parâmetros. Equipamentos usados para investigação de fluorescência geralmente são divididos em duas categorias: espectroscopia e sistemas de imagem. A espectroscopia de fluorescência oferece toda a informação espectral para cada ponto investigado, enquanto nas técnicas de imagem apenas uma fração de toda informação espectral é normalmente usada, uma vez que se avalia apenas a diferenciação macroscópica de emissão do tecido. Assim, a região do espectro visível com maior intensidade de emissão, será visualizada. A primeira categoria inclui sistemas que são usados para caracterizar a amostra em um único ponto por meio da captação da fluorescência. Geralmente, somente uma pequena área (habitualmente na ordem de 1 mm quadrado) é investigada por vez; no entanto, pode-se coletar informações de diversos pontos, analisando assim, uma grande área da lesão. O sistema de imagem mais simples consiste no uso do olho nu para avaliar a fluorescência emitida. Isso é possível, por exemplo, com

marcadores tumorais fluorescentes baseados em porfirina que podem ser excitados com luz violeta ou verde ⁽¹⁵⁾.

Vários autores têm descrito o método e sua eficácia em variadas linhas de pesquisa. O monitoramento do NADH na superfície de órgãos (cérebro, rins, fígado, testículos e etc.) pode ser realizado com técnica fluorimétrica baseada no artigo original de Chance e Williams ^(17,19). Um método combinado de espectroscopia da fluorescência com correção do espectro de absorção e análise do padrão da curva pode quantificar HbO₂ e Hb no sinusóide hepático ^(20,21). Recentes experimentos têm demonstrado que as propriedades teciduais do fígado têm forte correlação com o espectro da fluorescência ^(15,22). Outros estudos ⁽²³⁻²⁵⁾ já demonstraram a sensibilidade do método para monitoramento da atividade metabólica in vivo. As propriedades de fluorescência de co-enzimas como NADPH e flavinas podem ser captadas gerando informações do estado redox de células e tecidos ⁽²⁶⁾. A contribuição de fluoróforos endógenos, como as proteínas, NADPH, flavinas, vitamina A e ácido aracdônico, foi analisada por espectrofluorometria no tecido hepático e nos hepatócitos isolados ^(27,28).

De acordo com Croce e colaboradores ⁽²²⁾, condições de preservação e isquemia fria induzem a um aumento do sinal da amplitude da espectroscopia, principalmente atribuído ao NADPH e flavinas, as co-enzimas envolvidas no metabolismo energético. Em modelo experimental em ratos no estágio I, o mesmo grupo avaliou a viabilidade da auto-fluorescência no monitoramento in vivo da funcionalidade hepática ⁽²²⁾.

Castro e Silva e colaboradores observaram o mesmo comportamento, na isquemia fria, com luz de excitação de 532 nm, com provável correlação com os mesmos fluoróforos ⁽²⁹⁾.

Análise espectrofluorimétrica foi realizada com fígado de ratos durante isquemia fria (4C), em soluções padrão (Wisconsin) e em solução para dano proposital (Eurocollins, com 20, 43 e 72h). Durante o período de isquemia fria foram observadas aumento da amplitude do sinal, principalmente atribuído ao NADPH, e modificação do formato espectral, como contribuição do NADPH e das flavinas, resultado da acentuada perda de energia pelo tecido. Após reaquecimento e reoxigenação a amplitude do sinal da fluorescência diminuiu, dependendo das condições de preservação. O estudo foi comparado com análise bioquímica e histopatológica. A dosagem de bilirrubina não apresentou alteração significativa tanto na solução de Wisconsin (UW) quanto na solução Eurocollins (EU). Pequenas alterações foram observadas na dosagem de DHL e de peroxidação lipídica na solução UW enquanto que na solução EU os dois parâmetros sofreram alterações importantes. A quantidade de ATP

tecidual permaneceu muito maior em fígados preservados com a solução UW do que nos fígados preservados com a solução EU. Alterações estruturais e enzimáticas (DHL) teciduais foram observadas nos tecidos preservados com solução EU, que se tornaram mais evidentes com o tempo de preservação. ⁽²²⁾.

A auto-fluorescência de co-enzimas como o NADPH e flavinas oferece informações do estado energético de células e tecidos ⁽²³⁾. Uma análise separada de NADPH livre e ligada, com base nas suas propriedades foto-físicas ^(30,31), pode gerar informações úteis do metabolismo energético. Medidas simultâneas de flavinas e NADPH foram propostas para investigação mais completa do estado metabólico estável do hepatócito isolado in vivo ⁽³²⁾. A fluorescência foi considerada método adequado para acesso da atividade metabólica de fígados intactos em diferentes condições experimentais de aerobiose e anaerobiose ⁽³³⁻³⁵⁾.

Croce e colaboradores submeteram os espectros da auto-fluorescência captados, no tecido hepático, à análise de padrão espectral, para avaliar a contribuição relativa de cada fluoróforo envolvido na emissão total da luz ⁽²²⁾ (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 - Análise do padrão espectral em condições basais (auto-fluorescência) por fluoróforos, com área de contribuição espectral.

Fluoróforo	Pico central - Comprimento de Onda (nm)	Largura do espectro (nm)	Área de Contribuição Espectral (%)
NAD(P)H ligado	444	105	15,8
NAD(P)H livre	463	115	39,4
Flavinas	526	81	5,2
Vitamina A	488	102	20,9
Ácido Aracdônico	470	90	13,3
Lipopigmentos	587	80	1,6
Porfirinas	630	22	0,6
Outros fluoróforos	440		3,2
Total	440-700		100

O monitoramento do fígado foi descrito por Mayevsky e colaboradores em quase 30 artigos na proporção de 2 para 1 entre modelos animais e seres humanos, respectivamente. De 19 estudos em animais o rato foi usado em 15, o coelho em 2 e o porco em 2. A Função Mitocondrial foi monitorada em 10 estudos, o fluxo sanguíneo total foi monitorado em 6 e o HbO₂ em 8 ⁽³⁶⁻³⁸⁾. A medida direta da PO₂ foi rara e somente em 3 artigos o oxigênio foi avaliado por gasometria. Os principais artigos publicados referentes ao monitoramento da vitalidade hepática em ratos, durante o transplante, estão listados na Tabela 1.2. Considerando todos os dados listados anteriormente pode-se dizer que a espectroscopia de

fluorescência induzida por laser é um método que esta sendo bastante estudado mas ainda precisa ser validado.

Tabela 1.2 - Principais artigos publicados referentes ao monitoramento da vitalidade hepática durante o transplante.

<i>Autor</i>	<i>Ano de publicação</i>	<i>Parâmetro monitorado</i>	<i>Tecnologia aplicada</i>	<i>Estágio do Transplante</i>
Tokunaga Y	1987 ⁽³⁹⁾	NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo)	Fluorometria	I, II
Okamura R	1991 ⁽⁴⁰⁾	NADH	Fluorometria	II
Post S	1992 ⁽⁴¹⁾	TBF(Fluxo sanguíneo tecidual)	LDF (Dopler-Fluorimetria por Laser)	I, IV
Wheatley AM	1993 ⁽⁴²⁾	TBF	LDF	I, III
Ohdan H	1994 ⁽⁴³⁾	TBF	LDF	IV
Naundorf M	1995 ⁽⁴⁴⁾	NADH	Fluorometria	I
Ohdan H	1995 ⁽⁴⁵⁾	HbO ₂ (saturação de hemoglobina) Citocromo a,a3	Espectroscopia de infravermelho próximo	IV
Thorniley MS	1995 ⁽³⁴⁾	NADH	Fluorometria	I, II, III
Thorniley MS	1995 ⁽⁴⁶⁾	NADH	Fluorometria	III, IV
Thorniley MS	1996 ⁽⁴⁷⁾	NADH	Fluorometria	II, III
Seehofer D	1997 ⁽⁴⁸⁾	Verificação da Micro-circulação	Vídeo-microscopia	II
Thorniley MS	1997 ⁽⁴⁹⁾	HbO ₂	Espectroscopia de infravermelho próximo	I, II, III
Barbiro E	1998 ⁽⁵⁰⁾	NADH TBF	Fluorometria LDF	I, II, III
Fan XH	1999 ⁽⁵¹⁾	TBF	LDF	I, IV
Fan XH	2000 ⁽⁵²⁾	HbO ₂	Espectroscopia de infravermelho próximo	I
Sankarankutty AK	2006 ⁽¹⁵⁾	Padrão de fluorescência	EFIL	I, II, III, IV
Castro-e-Silva O	2008 ⁽²⁹⁾	Padrão de fluorescência	EFIL	I, II, III, IV

d. Métodos Comparativos

i. Avaliação Laboratorial

A avaliação laboratorial se faz necessária para comparação com o método empregado e para avaliar o modelo adotado. Para comparar os grupos que serão estudados serão utilizadas dosagens de bilirrubinas, AST, ALT, DHL e provas para avaliar a função mitocondrial.

A bilirrubina formada no organismo é derivada a partir do radical heme da hemoglobina de hemácias maduras. O radical heme é convertido em biliverdina que se transforma em bilirrubina, um pigmento livre, insolúvel em água, transportado na corrente sanguínea pela albumina. No hepatócito a bilirrubina desprende-se da albumina e no retículo endoplasmático liso do hepatócito a bilirrubina livre conjuga-se com o ácido glicurônico dando origem à bilirrubina conjugada, a qual é solúvel em água. A bilirrubina é facilmente excretada sendo eliminada na bile. Alterações nos seus níveis séricos refletem disfunção do seu metabolismo, na sua maioria ligada a doenças hepáticas ⁽⁵³⁾.

As aminotransferases ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase) são enzimas que catalisam a transferência de um grupo alfa-amínico de um aminoácido para um alfa-cetoácido. São enzimas intracelulares, sendo que a AST é de localização principalmente citoplasmática e está presente em menor concentração nas mitocôndrias. A ALT, por sua vez, tem localização exclusivamente citoplasmática. Os valores séricos absolutos das aminotransferases e/ou relação ALT/AST podem servir como indicadores da integridade hepatocelular. Níveis séricos elevados dessas enzimas estão associados a comprometimento hepatocelular agudo ⁽⁵³⁾.

A desidrogenase láctica (DHL) é uma enzima presente no citosol das células de quase todos os tecidos do organismo. É uma enzima de transferência de hidrogênio. Atua na via glicolítica catalisando a reação de ácido pirúvico em ácido láctico com simultânea oxidação do NADH a NAD. Esta reação ocorre quando a quantidade de oxigênio celular é limitada, como no caso de intensa atividade muscular. Em casos de dano tecidual causado por trauma, isquemia ou infecção, a DHL tem seus níveis aumentados no soro ⁽⁵³⁾.

A maior parte da DHL, presente no soro, origina-se dos eritrócitos e plaquetas e é liberada durante a atividade fisiológica dessas células. A DHL é um tetrâmero (quatro polipeptídios) que pode ser composto de dois tipos de monômeros: o tipo H(coração) e o tipo

M(músculos e fígado). Existem cinco combinações possíveis dessas pequenas moléculas protéicas conhecidas como isoenzimas (DHL1 a DHL5). Um aumento da DHL sérica não é específico. Um diagnóstico mais preciso poderia ser alcançado pela separação de suas isoenzimas ⁽⁵³⁾.

A disfunção mitocondrial é o primeiro evento que ocorre nos processos isquêmicos do fígado. A mitocôndria processa energia para os eventos metabólicos básicos e a sua disfunção compromete o metabolismo celular levando à diminuição da fosforilação oxidativa, ineficiente transporte de íons, aumento do fluxo oxidante e diminuição da expressão genética, que pode contribuir com alterações na fluidicidade e composição fosfolipídica da membrana mitocondrial. Estas mudanças podem afetar a habilidade da mitocôndria de transportar substratos e para gerar suficiente força motiva protônica para alimentar a necessidade energética celular e manter o potencial de membrana ⁽⁵⁴⁾. A função mitocondrial pode ser avaliada pelo potencial de membrana e pela respiração mitocondrial. A respiração mitocondrial pode ser avaliada pela Taxa de Controle Respiratório (RCR) e pelo ADP/O (quantidade de oxigênio requerida para a fosforilação total de uma quantidade conhecida de ADP). O ADP/O dá idéia da fosforilação e da oxidação biológica na cadeia respiratória ⁽⁵⁵⁾. O RCR é definido como a fração entre o consumo de oxigênio no Estágio III (fase ativa da fosforilação oxidativa com consumo de oxigênio e formação de ATP [adenosina trifosfato] e no Estágio IV (respiração basal depois da fosforilação de ADP [adenosina difosfato] para ATP).

ii. Avaliação Histopatológica e Morfométrica

A avaliação microscópica permite uma análise tecidual que possibilita estabelecer o diagnóstico e promover comparações com a avaliação espectroscópica ⁽⁵⁶⁾. A morfometria foi escolhida como o método comparativo, pois permite “medir estruturas anatômicas”. Esse método tem por função tornar mais objetiva e precisa a coleta, a apresentação e a análise dos resultados obtidos, permitindo ainda se relacionar as diferentes estruturas anatômicas ⁽⁵⁶⁾.

2. Objetivo

Avaliar a Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser (EFIL) como método diagnóstico de lesões isquêmicas, em um modelo de isquemia normotérmica induzida em ratos Wistar, através da:

1. Análise dos espectros obtidos dos tecidos
2. Comparação dos espectros obtidos com os parâmetros bioquímicos e
3. Comparação dos espectros obtidos com os achados histopatológicos.

3. Método

O projeto foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da FMRP-USP sob o Protocolo no. 014/2006 em 29 de maio de 2006. O local de estudo foi a unidade de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto-SP.

a. Animal de Experimentação

Foram utilizados 40 ratos, *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*, machos, com peso corporal entre 250 e 300 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da FMRP-USP, sendo 16 animais utilizados no projeto piloto e 24 animais no experimento. Foram alimentados com dieta padrão de laboratório (Ração para Ratos, Camundongos e Hamsters – Ralston Purina) e água à vontade, mantidos em temperatura ambiente sob um ciclo de 12 horas claro-escuro em gaiolas de polipropileno, com população máxima de cinco animais.

b. Delineamento de Pesquisa

Inicialmente foi realizado um estudo piloto, nos mesmos moldes do procedimento operatório do experimento principal, que determinou o protocolo experimental. Foram estudados 16 animais em três etapas. Na primeira etapa do projeto piloto três animais foram submetidos à isquemia total (o órgão fica privado de sangue totalmente) do fígado por 1 hora. Dois animais foram a óbito durante o tempo de isquemia proposto e o outro animal, apesar de suportar o tempo de isquemia, estava em péssimas condições antes de ser morto. Como a isquemia total proporciona isquemia mesentérica, que aumenta a mortalidade⁽⁵⁷⁾ (Figura 3.1), decidiu-se induzir isquemia de apenas parte do fígado eliminando a isquemia mesentérica como fator complicador. Esta isquemia foi realizada com oclusão do feixe vascular para o lobo mediano e para o lobo lateral esquerdo, permitindo fluxo sanguíneo para o lobo caudado e para o lobo lateral direito, não causando estase venosa mesentérica. Na segunda etapa quatro

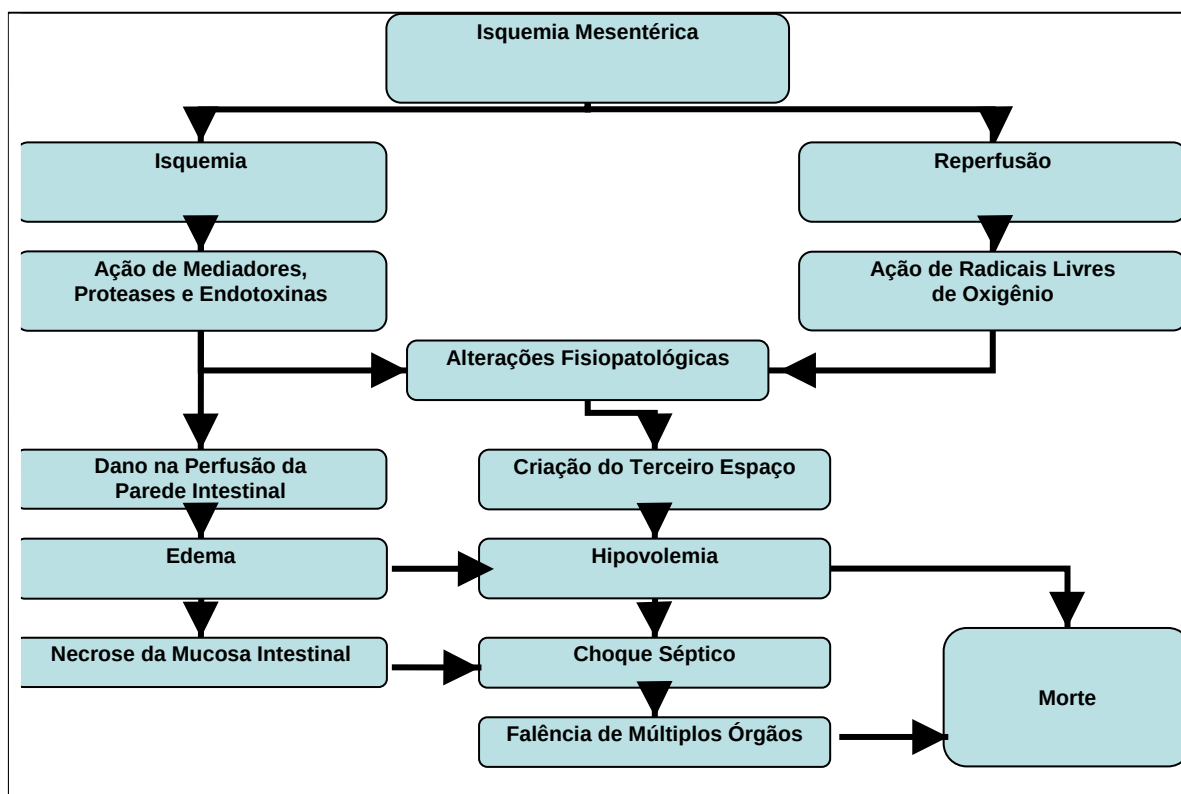


Figura 3.1 – Efeitos da isquemia mesentérica⁽⁵⁷⁾.

animais foram submetidos à isquemia por 4,3,2 e 1 h, com reavaliação 20 minutos após reperusão. Foram observadas alterações no lobo hepático submetido à isquemia, mas não foi observada isquemia mesentérica em nenhum dos animais. Na terceira etapa foram avaliados 8 animais divididos em quatro grupos. O primeiro grupo foi submetido à isquemia do fígado por 4 horas, sendo que um animal seria avaliado 24 h após a reperusão e o outro 48 h após a reperusão, mas os dois evoluíram ao óbito antes de 24 h. O segundo grupo, submetido a 3 horas de isquemia, evoluiu da mesma maneira que o primeiro grupo. O terceiro grupo foi submetido à isquemia por 2 horas e o animal reavaliado, 24 horas após a reperusão, estava inapetente e com a frequência respiratória elevada antes de ser anestesiado. O fígado apresentava-se esbranquiçado, endurecido e com fibrina no local de contato entre os segmentos isquêmicos. O animal que seria reavaliado 48 horas após a reperusão evoluiu a óbito antes disso. O quarto grupo foi submetido à isquemia por 1 hora. Foram reavaliados 24 e 48 horas após a reperusão, sendo que os animais estavam bem, com a frequência respiratória normal e aceitando alimentação antes de serem anestesiados. Os fígados apresentavam-se praticamente normais, com poucas áreas esbranquiçadas. Ficou definido o modelo com isquemia hepática parcial de 1 e 2 horas com avaliação 24 horas após a reperusão, considerando que o animal submetido a 2 horas de isquemia evolui para o óbito no período de 24 a 48 horas.

c.Procedimento Operatório

O jejum pré-operatório foi de 12 horas ⁽⁵⁸⁾. Os animais foram anestesiados com Thionembutal, na dose de 50 mg/Kg de peso, por via intraperitoneal. A manutenção da anestesia foi realizada com Thionembutal na veia da cauda do animal, conforme a necessidade, na dose de 25 mg/Kg de peso. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal. As patas foram presas com fitas de esparadrapo. A via de acesso de escolha em todos os animais foi por incisão mediana, a partir do processo xifóide, com aproximadamente 3 cm de comprimento ⁽⁵⁹⁾.

Os animais foram divididos em dois grupos: G1(isquemia de 1 hora), com 12 animais, e G2(isquemia de 2 horas), também com 12 animais. A isquemia foi realizada com oclusão, com pinça vascular, do feixe vascular para o lobo mediano e para o lobo lateral esquerdo, permitindo fluxo sanguíneo para o lobo caudado e para o lobo lateral direito, não causando estase venosa mesentérica ⁽⁶⁰⁾ (Figuras 3.2 e 3.3).

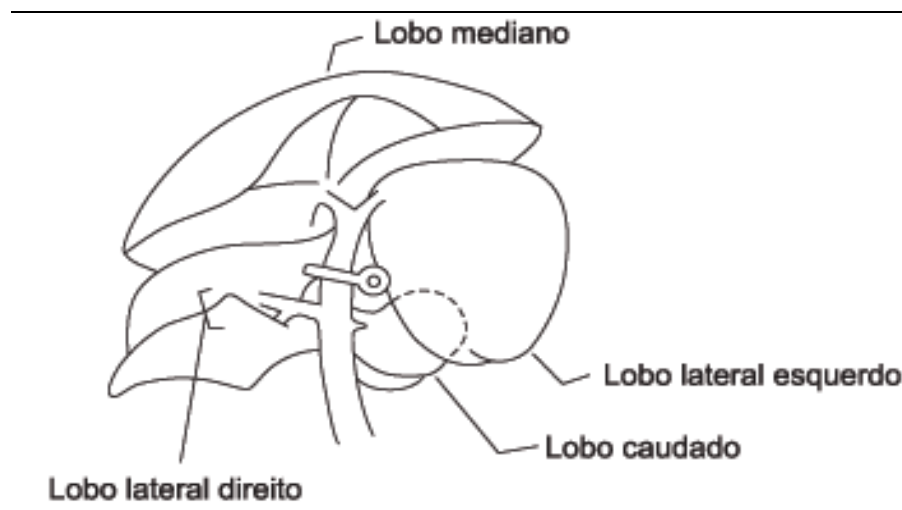


Figura 3.2 - A isquemia parcial foi realizada com oclusão do feixe vascular para o lobo mediano e para o lobo lateral esquerdo, permitindo fluxo sanguíneo para o lobo caudado e para o lobo lateral direito.



Figura 3.3 – Pinça vascular ocluindo o suprimento sanguíneo para os lobos mediano e lateral esquerdo.

A oclusão parcial foi confirmada no transoperatório pela presença de palidez importante nos lobos mediano e lateral esquerdo, ao mesmo tempo em que os lobos inferiores não sujeitos à isquemia (caudado e lateral direito) preservaram a coloração habitual. Durante o período de isquemia a parede abdominal foi suturada, com pontos separados, em plano único, a fim de manter a temperatura da cavidade abdominal do animal. Durante o período de isquemia as patas dos animais ficaram soltas. Para finalizar o período de isquemia as patas dos animais foram presas novamente e o abdome reaberto, após liberação dos pontos totais. A pinça vascular foi removida, observando-se a reperfusão dos lobos isquêmicos, e o abdome foi suturado em 2 planos, com sutura contínua. Vinte e quatro horas após a reperfusão o animal foi submetido a novo procedimento anestésico com reabertura da cavidade abdominal.

Nos grupos G1 e G2 foram realizadas, antes da isquemia, após o período de isquemia e 24 horas após a reperfusão, as leituras da espectroscopia de fluorescência e, imediatamente após, as coletas de sangue para avaliação laboratorial, para dosagem das bilirrubinas, AST, ALT e DHL. As coletas de sangue foram realizadas na veia cava inferior, na quantidade de 1,5 ml por retirada (figura 3.4). Em animais de pequeno porte, pressupondo volemia inicial equivalente a 5% do peso corporal, o volume a ser sangrado para reduzir o hematócrito a 20, 25 e 30% é respectivamente, de 3,0, 2,25 e 1,5% do peso corpóreo ⁽⁵³⁾. Em animais com peso de 250 a 350g, com volemia inicial de 12,5 ml a 17,5 ml, a retirada de 1,5ml significa 0,6 a 0,43% do peso corpóreo. Portanto a retirada total de 4,5 ml significa 1,8 a 1,29% do peso corpóreo, reduzindo o hematócrito, no máximo, a 26,67%.

Após a última coleta de sangue o tecido hepático, do lobo submetido à isquemia, foi retirado e encaminhado parte para o exame histopatológico e parte para avaliação da função mitocondrial, neste caso, com a necessidade e comparação com o tecido hepático de um animal não submetido ao experimento (controle). Os animais foram sacrificados por exsanguinação.



Figura 3.4 - Visualização da veia cava inferior do rato, de onde foram realizadas as coletas de sangue.

d. Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser

O equipamento utilizado para a leitura por autofluorescência foi o protótipo do Instituto de Física da USP – São Carlos – Grupo de Óptica (figuras 3.5 e 3.6). O aparato experimental é composto por um laser de excitação em 532nm (Nd:YAG dobrado) , espectrômetro USB 2000(Ocean Optics, USA), que permite avaliação do espectro no intervalo entre 350 nm e 1000 nm, computador portátil acoplado com o programa “base32” (Figura 3.7) utilizado para realizar as leituras e salvar os dados, e uma sonda de aplicação do tipo Y(Ocean Optics, USA). A sonda Y é composta por duas fibras ópticas de 600 μm , uma fibra, que leva a luz de excitação, e outra fibra coletora da luz emitida pelo tecido avaliado. O laser de excitação, acoplado à sonda, é entregue à superfície do tecido a ser analisada. A sonda deve ser mantida em leve contato com o tecido e o mais perpendicularmente possível.

A outra extremidade da sonda é conectada ao espectrofotômetro, levando a luz coletada do tecido. A potência do laser na extremidade de investigação é de 8 mW, insuficiente para causar uma reação térmica no tecido alvo. Um filtro (OGG550, Schott, USA) foi usado para remover o retro-espalhamento e possibilitar a análise somente da fluorescência. Para proteção contra contaminação da fibra, utilizou-se um filme de plástico transparente, flexível, entre a ponta da fibra e o tecido hepático. Uma leitura foi realizada, inicialmente, com a luz desligada, para calibração e, depois, foi realizada a leitura (Figuras 3.8 - 3.10), na superfície do lobo submetido à isquemia, com leitura em nove pontos. Como o procedimento é manual, as leituras foram realizadas pela mesma pessoa, procurando empregar a mesma pressão.



Figura 3.5 - Protótipo do Instituto de Física – Grupo de Óptica – USP/São Carlos.



Figura 3.6 - Protótipo do Instituto de Física – Grupo de Óptica – USP/São Carlos.

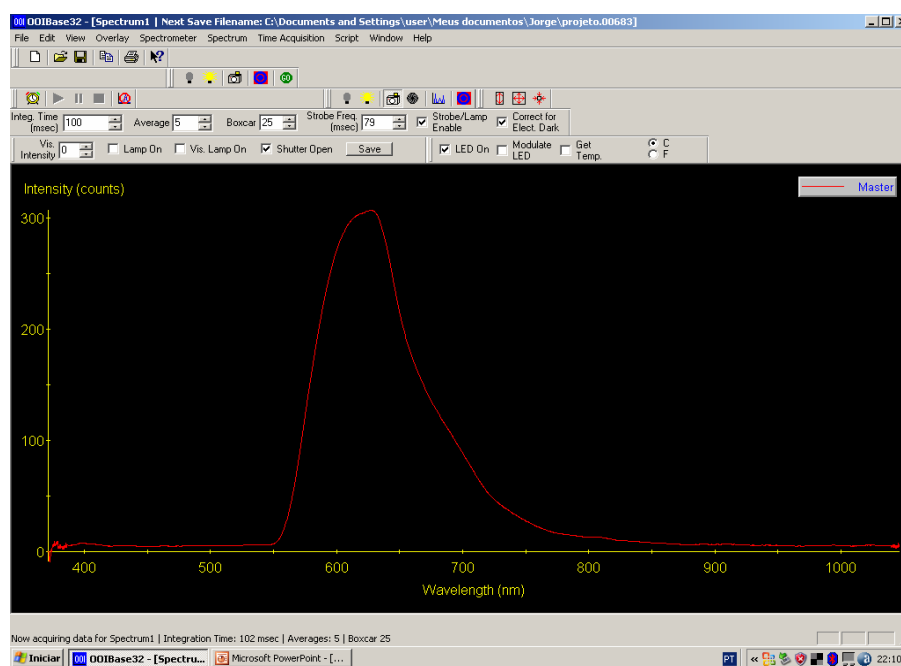


Figura 3.7 - Interface do programa “base32”.



Figura 3.8 - Pontos das leituras espectroscópicas.

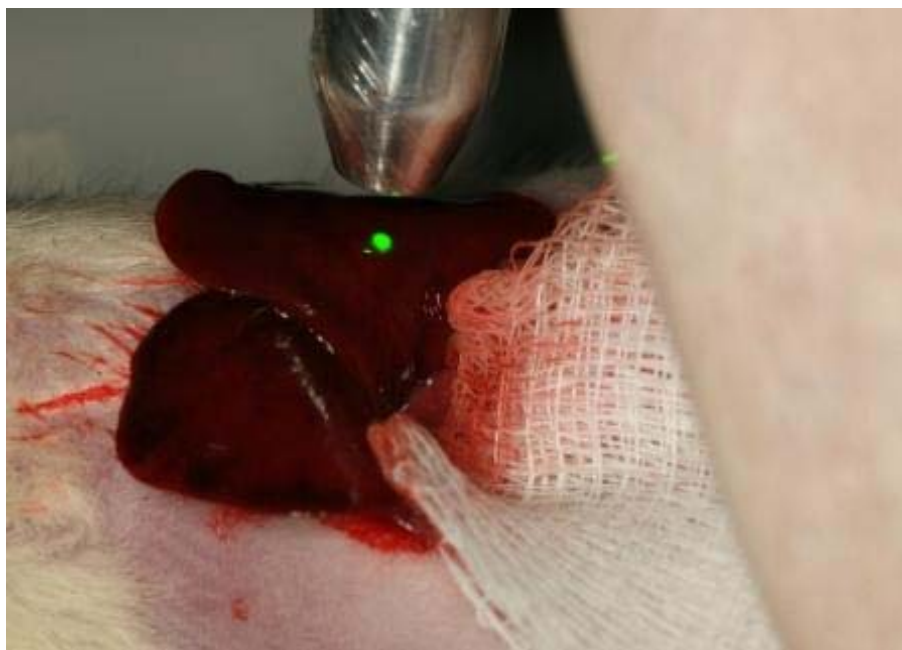


Figura 3.9 - Visualização do feixe de luz antes do contato com o fígado.



Figura 3.10 - Momento da leitura por espectroscopia de fluorescência.

e. Análise das componentes principais (PCA)⁽⁶¹⁾

Os dados obtidos neste experimento, observados em uma curva, foram armazenados em uma matriz, em particular, nesse caso, dos espectros de fluorescência, onde cada espectro é composto por um conjunto de pontos de intensidade em função do comprimento de onda.

O que se busca, neste caso, é um método para analisar a variação da forma do espectro em função da necrose do tecido hepático devido à isquemia. A variação que pode ocorrer em um espectro nada mais é que uma mudança no valor da intensidade para determinados comprimentos de onda. Dessa forma, cada comprimento de onda é uma variável que assume valores que dependem do momento e do tecido em que o espectro foi obtido. Nesse equipamento utilizado para obtenção dos espectros temos um total de 638 pontos, e, portanto 638 variáveis. As mudanças dessas 638 variáveis estão correlacionadas com as alterações no tecido hepático submetido à isquemia. O conjunto de todas as medidas realizadas forma então uma matriz de dados. Quando calculamos as componentes principais desse sistema podemos representar em torno de 90% das informações do sistema, isto é, do espectro obtido, em apenas duas componentes dessa nova base. Portanto o gráfico das componentes principais (PC1 versus PC2) nos fornece um ponto de vista muito privilegiado para a análise dos dados do que nas 638 dimensões que tínhamos anteriormente. Em outras palavras, temos uma redução bastante significativa do número de variáveis analisadas, neste caso específico, os comprimentos de onda que trazem a mesma informação são considerados

uma única vez e aqueles que não apresentam nenhuma correlação podem ser descartados. Cada ponto representa um conjunto de espectros de fluorescência coletados para um animal em um determinado período do experimento.

As medidas realizadas para cada animal, com determinada alteração tecidual, se agrupam, como era de se esperar, pois os espectros de fluorescência obtidos no tecido com as mesmas características são mais semelhantes entre si que os espectros obtidos em tecidos com características distintas. A partir desses conjuntos de pontos, que caracterizam cada fase do experimento comparado com a necrose tecidual, podemos utilizar vários métodos matemáticos para a determinação da viabilidade tecidual. O conjunto de componentes principais foi obtido a partir de um pacote matemático disponível no software científico The Unscrambler®, cujos cálculos explícitos das matrizes de covariância não estão disponíveis aos usuários.

f. Estudo Laboratorial

O material para avaliação da função mitocondrial assim como o sangue para análise laboratorial foi encaminhado para o Laboratório de Cirurgia Experimental da FMRP/USP.

i. Função Mitocondrial

As mitocôndrias são isoladas por centrifugação diferencial ⁽⁶²⁾. O fígado é removido e lavado em solução salina a 0,9% e depois novamente lavado e picotado em 10 ml de Meio 1 (Sacarose 250 mmol 42,8g, EGTA 1 mmol 190,17 mg e Hepes-KOH 10 mmol, pH 7,2 1,1915 g) 500 ml e, então, homogeneizado em Potter-Elvehjem através de 3 ciclos com 1 minuto de intervalo. O homogeneizado é centrifugado a 750g (2500 rpm) por 5 minutos. O sobrenadante resultante é centrifugado a 1200g (10000 rpm) por 10 minutos. O sedimento obtido é suspenso em 10 ml de Meio 2 (Sacarose 250 mmol 42,8g, EGTA 0,3 mmol 57,025 mg e Hepes-KOH 10 mmol, pH 7,2 1,1915 g) e centrifugado a 4320g (6000 rpm) por 15 minutos. O sedimento final é suspenso em aproximadamente 0,5 ml de Meio 3 (Sacarose 250 mmol 42,8g, e Hepes-KOH 10 mmol, pH 7,2 1,1915 g). Todas as etapas de isolamento são conduzidas a 4 °C. A quantidade de proteína mitocondrial foi determinada por reação biurética. A respiração mitocondrial foi monitorada por polarografia com oxígrafo equipado

com eletródio de oxigênio tipo Clark (Gilson Medical Electronics, Middlenton, WI, USA). O experimento foi realizado a 30 °C usando mitocôndria energizada por 5 mmol de succinato de potássio. O experimento foi realizado em meio com Sacarose 125 mmol, 0,1 mmol EGTA, MgCl₂ 1 mmol, NaH₂PO₄ 2 µmol e Hepes-KOH 10 mmol, pH 7,4. O Estágio 3 da respiração mitocondrial foi determinado com adição de 400 nmoléculas de ADP enquanto que o Estágio 4 da respiração foi determinado após a fosforilação do ADP adicionado. Os parâmetros mitocondriais foram expressos em átomos de o/min/mg de proteína. A diferença do potencial de membrana foi monitorada espectroscopicamente usando 5 µmol de óxido de safranina, como um indicador, e um SLM-Aminco, Bowman, espectrômetro de luminescência, série 2, a um comprimento de onda de excitação/emissão de 495/586 nm. O experimento foi realizado em meio com Sacarose 200 mmol, MgCl₂ 1 mmol, NaH₂PO₄ 2,5 µmol e Hepes-KOH 10 mmol, pH 7,4. A mitocôndria foi energizada por 5 mmol de succinato de sódio. O potencial de membrana foi expresso em mv⁽⁶³⁾.

ii. Bioquímica

Para dosagem de ALT e AST foram utilizados, respectivamente, o kit ALT/GPT Liquiform (cat.74) e AST/GOT Liquiform (cat.75) da Labtest Diagnóstica S.A. A metodologia empregada foi a Cinética UV-IFCC. A metodologia cinética para medição da atividade de ALT e AST foi introduzida por Karmen ⁽⁶⁴⁾, sendo posteriormente otimizada por Henry e colaboradores ⁽⁶⁵⁾. Foi utilizado um fotômetro com cubeta termostatizada capaz de medir com exatidão a absorbância em 340 ou 365 nm. No caso da ALT adicionou-se o reagente 1(Tampão Tris 100mmol/l, L-alanina 625 mmol/l e azida sódica 0,095%) com o reagente 2(NADH 900 µmol/l, cetoglutarato 75 mmol/l e azida sódica 0,095%), com homogeneização suave, obteve-se o reagente de trabalho (Tampão 80 mmol/l pH 7,8, L-alanina 500 mmol/l, 2-cetoglutarato 15 mmol/l, NADH 180 µmol/l, mais de 1000 U/l de DHL e azida sódica 0,095%). Para a AST foi adicionado o reagente 1(Tampão Tris 80mmol/l, L-aspartato 300 mmol/l, mais de 750 U/l de Malato Desidrogenase (MDH), mais de 1125 U/l de DHL e azida sódica 0,095%) com o reagente 2(NADH 900 µmol/l, α-cetoglutarato 60 mmol/l e azida sódica 0,095%), com homogeneização suave, obteve-se o reagente de trabalho (Tampão Tris 64 mmol/l pH 7,8, L-aspartato 240 mmol/l, α-cetoglutarato 12 mmol/l, NADH 180 µmol/l, mais de 900 U/l de DHL, mais de 600 U/l de MDH e azida sódica 0,095%). Homogeneizando 1,0 ml do reagente de trabalho com 0,1 ml de amostra (sangue) e

transferindo imediatamente para a cubeta a 37 °C, após 1 minuto, foi realizada a leitura da absorbância inicial. A leitura foi repetida após 2 minutos. Foram realizados, então, os cálculos onde a atividade de ALT ou ALT (em U/l) é igual à diferença da absorbância $(A_1 - A_2)/2$ multiplicado pelo fator 1746 para medição em 340 nm e pelo fator 3333 para medição em 365 nm.

A Desidrogenase Láctica (DHL) foi determinada com o kit LDH Liquiform (cat.86) da Labtest Diagnóstica S.A., em soro, por método cinético (Piruvato-Lactato). Foi utilizado um fotômetro com cubeta termostatzada capaz de medir com exatidão a absorbância em 340 nm. O soro foi separado até 1 hora após a colheita. O conjunto de um frasco do Reagente 1(NADH 360 $\mu\text{mol/l}$ e azida sódica 0,095%) e um frasco do Reagente 2(Tampão 250 mmol/l pH 7,5, piruvato de sódio 6 mmol/l e azida sódica 0,095%) permite preparar o Reagente de Trabalho (Tampão pH 7,5, piruvato de sódio 1,2 mmol/l, NADH 300 $\mu\text{mol/l}$ e azida sódica) por homogeneização por inversão. Homogeneizando 1,0 ml do reagente de trabalho com 0,02 ml de amostra (soro) e transferindo imediatamente para a cubeta a 37 °C, após 1 minuto, foi realizada a leitura da absorbância inicial. A leitura foi repetida após 2 minutos. Foram realizados, então, os cálculos onde a atividade de DHL (em U/l) é igual à diferença da absorbância $(A_1 - A_2)/2$ multiplicado pelo fator 8095 para medição em 340 nm.

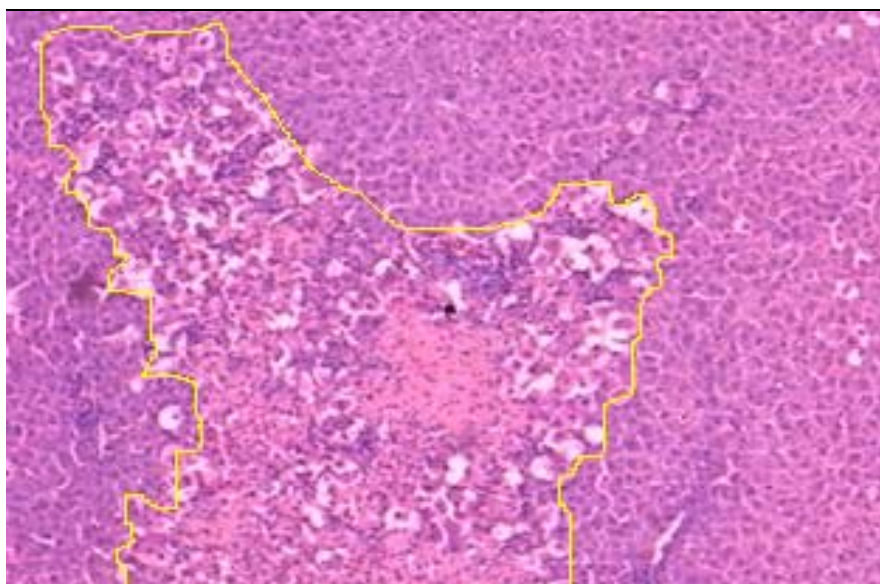
As bilirrubinas foram dosadas por sistema para a determinação das bilirrubinas direta e total, kit Bilirrubina (cat.31) da Labtest Diagnóstica S.A., em amostras de sangue, por reação de ponto final, pela metodologia Sims-Hom. A bilirrubina é dosada por diazotização e formação de azobilirrubina vermelha com absorção máxima de 525 nm. A bilirrubina direta (diglicurônide) é dosada em meio aquoso, enquanto a total (direta e indireta) é dosada por ação de potente solubilizador de água catalisadora. Foi utilizado um fotômetro capaz de medir, com exatidão, a absorbância entre 500 e 540 nm. Foi utilizado um Produto Padrão Bilirrubina Labtest (cat.32) para a calibração. O procedimento usado para a calibração e teste foi idêntico. Foi preparado o Diazo Reagente adicionando 0,01 ml de Nitrito de Sódio (Nitrito de Sódio 72,5 mmol/l e estabilizador) a 0,3 mL de Ácido Sulfanílico (Ácido Sulfanílico 5,75 mmol/l e estabilizador). No tubo de ensaio Branco foram adicionados Água destilada 1,0 ml, Ácido Sulfanílico 0,1 ml e a amostra 0,05ml. No tubo de ensaio para Bilirrubina Direta foram adicionados Água destilada 1,0 ml, Diazo Reagente 0,1 ml e a amostra 0,05 ml. No tubo de ensaio da Bilirrubina Total foram adicionados o Acelerador (caféina 130 mmol/l, benzoato de sódio 260 mmol/l, acetato de sódio 460 mmol/l e surfactante), que promove rápida solubilização e diazotização da bilirrubina indireta possibilitando obter soluções coradas

totalmente livres de turvação, o Diazo Reagente 0,1 ml e a amostra 0,05 ml. Após 5 minutos foram determinadas as absorbâncias das bilirrubinas direta e total em 525 nm ou filtro verde (500 a 540), acertando o zero com o branco. A bilirrubina foi calculada (mg/dl) pela Absorbância do Teste/ Absorbância Padrão multiplicado por 10. A bilirrubina indireta foi obtida pela diferença entre as bilirrubinas total e direta.

g. Estudo Histopatológico e Morfométrico

O material para avaliação foi encaminhado para o laboratório de patologia da FMRP/USP, onde foram realizados dois cortes de cada amostra de cerca de 1,0 cm cada e posteriormente fixados em formol tamponado. As amostras foram processadas e emblocadas em parafina e posteriormente realizados cortes de 5 micras e coradas pela hematoxilina-eosina.

Figura 3.11 - Exemplificação da seleção da área de necrose com o programa “ImageJ” (Coloração pela hematoxilina-eosina com aumento de 40X).



A avaliação morfométrica foi realizada no Instituto de Anatomia Patológica (IAP) em São Carlos/SP, utilizando-se microscópio Nikon eclipse 50i, com câmera digital Samsung acoplada e de programa de laudo de imagem calibrado em 1,0mm em aumento de 4X através da régua de Breslow. Foram realizadas 20 fotos de cada amostra, representando um campo

total de 2,0 cm da amostra. Após a realização das fotos, estas foram inseridas no programa “ImageJ” e através de ferramenta de seleção, foi calculada a porcentagem de áreas necróticas em relação a áreas de tecido hepático viável (Figura 3.11).

h.Análise Estatística - Objetivo e Metodologia

Inicialmente a avaliação estatística verifica se existem evidências de associação de algumas variáveis respostas da espectroscopia de fluorescência com relação à Morfometria e também a sua concordância⁽⁶⁶⁻⁶⁹⁾.

Para verificar a associação, foi utilizado o teste exato de Fisher. Este teste tem como hipótese nula, que não existem evidências de associação entre as variáveis, ou seja, as mesmas são independentes.

Para verificar a concordância foi utilizado o coeficiente de concordância kappa, introduzido por Cohen (1960). Este mede o grau de concordância quando as variáveis são categóricas. Quando este coeficiente assume seu valor máximo (1,00) corresponde a uma perfeita concordância. Um coeficiente kappa igual a zero indica que a concordância é igual àquela esperada pelo acaso. Valores negativos ocorrem quando a concordância é mais fraca do que a esperada pelo acaso, mas segundo Agresti (1990), isto raramente ocorre.

Landis e Koch (1977) fornecem as seguintes categorizações para o coeficiente kappa:

Coeficiente kappa	Força da concordância
Menor que zero	Pobre
0,00 – 0,20	Desprezível
0,21 – 0,40	Suave
0,41 – 0,60	Moderada
0,61 – 0,80	Substancial (grande)
0,81 – 1,00	Quase perfeita

Para comparar se houveram evidências de diferença na distribuição das variáveis respostas da Função Mitochondrial segundo níveis de morfometria foi utilizado o teste não-paramétrico para duas amostras independentes de Wilcoxon. Este teste tem como hipótese

nula, que dois grupos foram extraídos da mesma população. Um pressuposto é que os dados apresentados sejam representados por uma variável contínua ou que atinja, pelo menos, um grau de mensuração ordinal. (Siegel, 1988)

Pelo fato do tamanho amostral ser pequeno, quando não houve empates entre as respostas, foi utilizada a versão exata do teste de Wilcoxon. Os resultados foram obtidos através do Software R^(70,71).

Com o objetivo de comparar as variáveis dependentes (ALT/AST, bilirrubinas e DHL) nos níveis das variáveis independentes (grupo e tempo), foi proposto um modelo linear de efeitos mistos⁽⁷²⁾.

Os modelos lineares de efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos) são utilizados na análise de dados onde às respostas de um mesmo indivíduo estão agrupadas e a suposição de independência entre observações num mesmo grupo não é adequada.

No modelo de efeitos mistos utilizado, foram considerados como efeito aleatório os indivíduos e, como efeitos fixos, o grupo, o tempo e a interação entre eles.

Tal modelo, tem como pressuposto, que o resíduo obtido através da diferença entre os valores preditos pelo modelo e os valores observados tenha distribuição normal com média 0 e variância constante. Nas situações em que tal pressuposto não foi observado, transformações na variável resposta foram utilizadas. O ajuste do modelo foi feito através do software SAS versão 9^(73,74).

i. Metodologia para a Apresentação

A metodologia adotada para a elaboração da dissertação de mestrado seguiu as “Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso”⁽⁷⁵⁾.

4. RESULTADOS

Seis animais vieram a óbito antes da última etapa da pesquisa e, portanto, foram descartados. Os resultados espectroscópicos estão representados pelos gráficos com comparação das curvas espectrais na pré-isquemia, na pós-isquemia e 24 horas após a reperfusão. A análise dos componentes principais foi realizada na pré-isquemia, na pós-isquemia e 24 horas após a reperfusão, de acordo com a área de necrose.

Todos os resultados laboratoriais estão apresentados em tabelas e separados por grupos de animais e por tipo de exame.

A análise morfométrica (para área necrótica) é apresentada em tabela. Os padrões microscópicos encontrados são apresentados nas figuras.

a. Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser

As leituras espectroscópicas permitiram a confecção de gráficos por animal, nas três fases do experimento: pré-isquemia (autofluorescência), pós-isquemia e 24 horas após a reperfusão (Gráficos 4.1 – 4.18). É possível comparar os padrões espectrais com a área de necrose, avaliada por morfometria 24 horas após a reperfusão.

Gráfico 4.1 – Padrão espectral do animal 1 comparado com a área de necrose avaliada por morfometria.

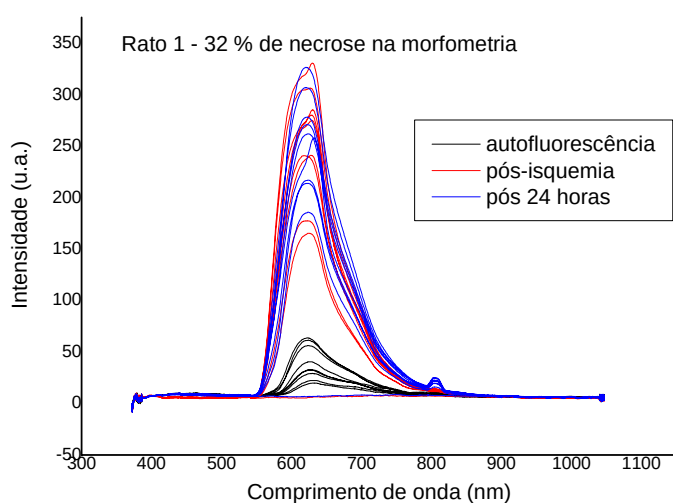


Gráfico 4.2 - Padrão espectral do animal 2 comparado com a área de necrose avaliada por morfometria.

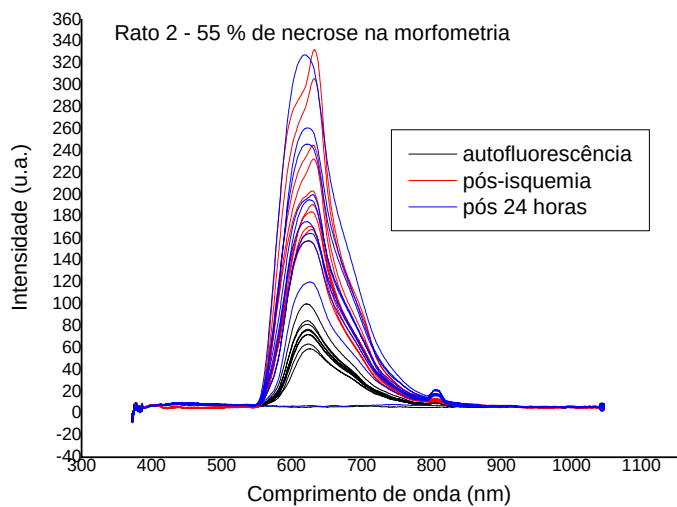


Gráfico 4.3 - Padrão espectral do animal 3 comparado com a área de necrose avaliada por morfometria.

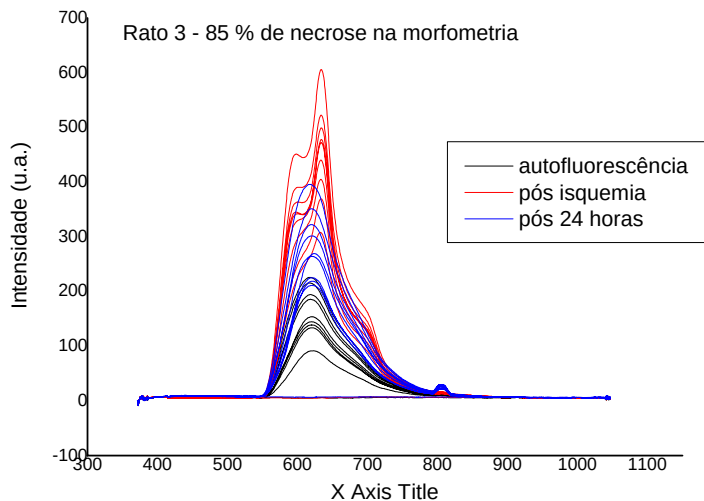


Gráfico 4.4 - Padrão espectral do animal 4 comparado com a área de necrose avaliada por morfometria.

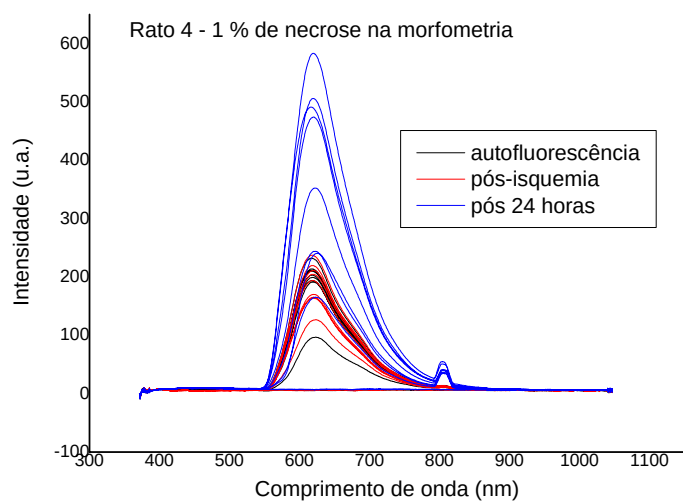


Gráfico 4.5 - Padrão espectral do animal 5 comparado com a área de necrose avaliada por morfometria.

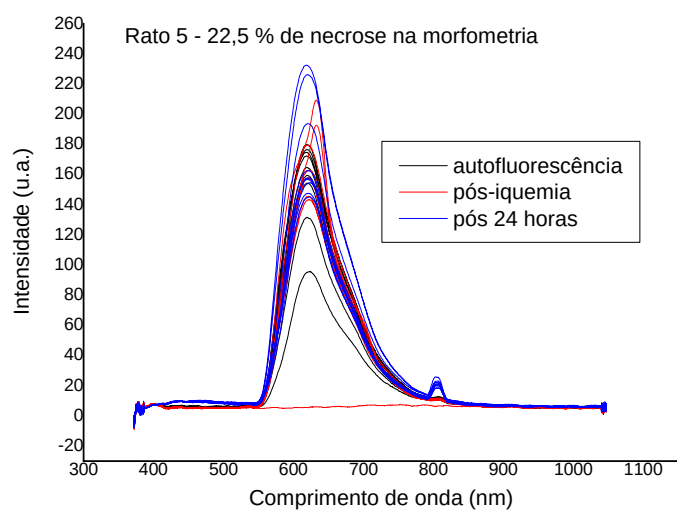


Gráfico 4.6 - Padrão espectral do animal 6 comparado com a área de necrose avaliada por morfometria.

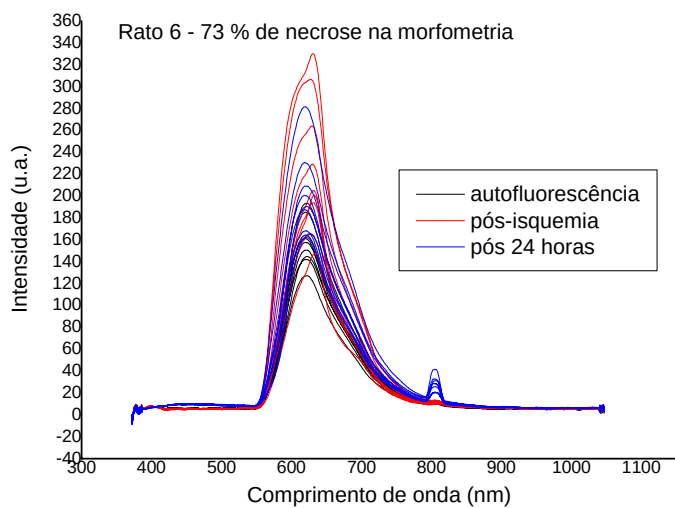


Gráfico 4.7 - Padrão espectral do animal 7 comparado com a área de necrose avaliada por morfometria.

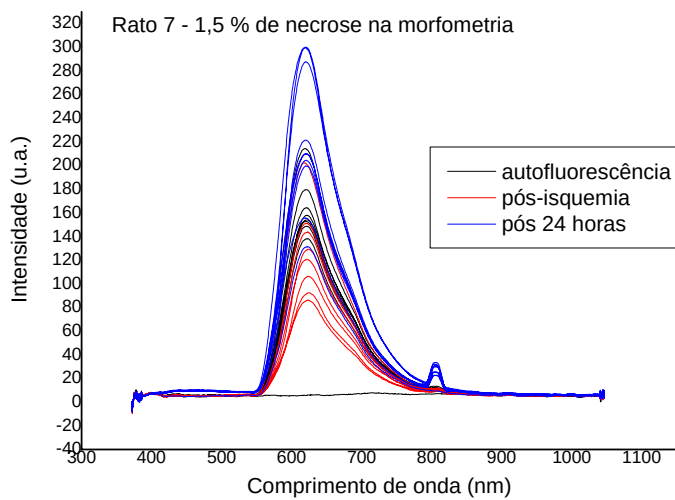


Gráfico 4.8 - Padrão espectral do animal 8 comparado com a área de necrose avaliada por morfometria.

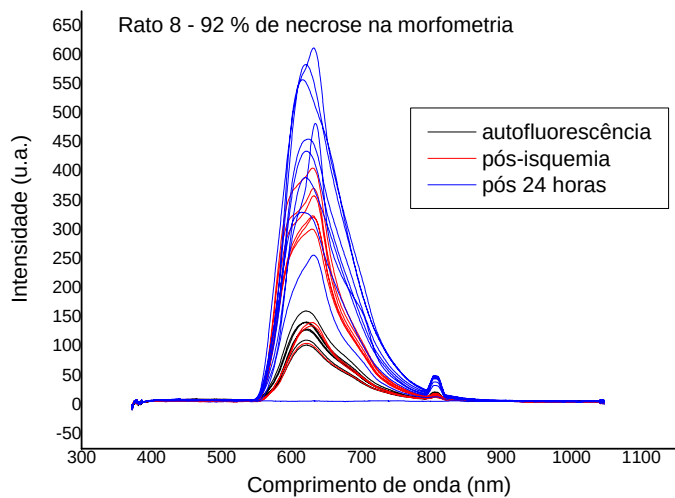


Gráfico 4.9 - Padrão espectral do animal 9 comparado com a área de necrose avaliada por morfometria.

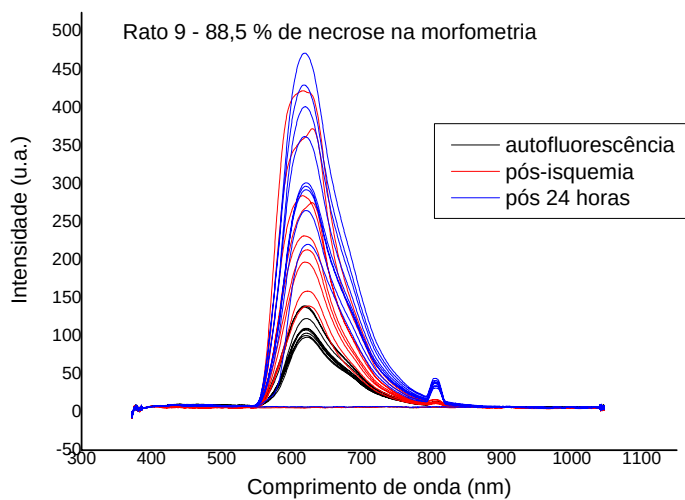


Gráfico 4.10 - Padrão espectral do animal 10 comparado com a área de necrose avaliada por morfometria.

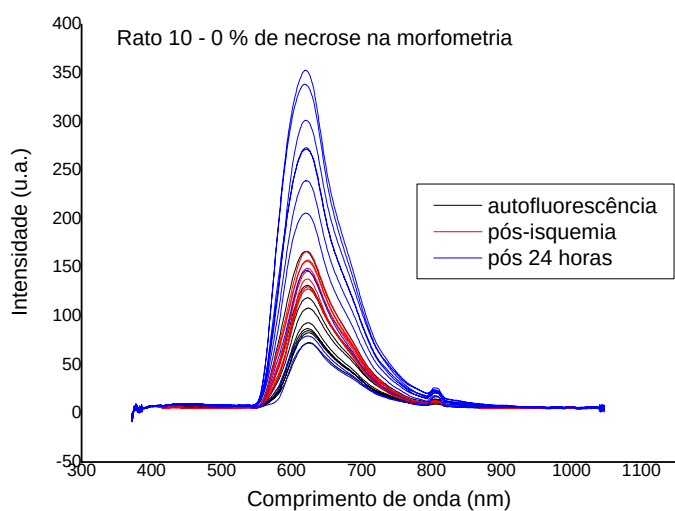


Gráfico 4.11 - Padrão espectral do animal 11 comparado com a área de necrose avaliada por morfometria.

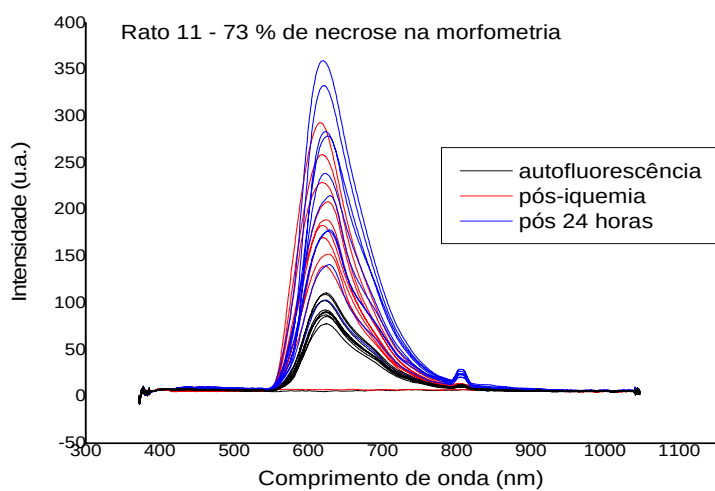


Gráfico 4.12 - Padrão espectral do animal 12 comparado com a área de necrose avaliada por morfometria.

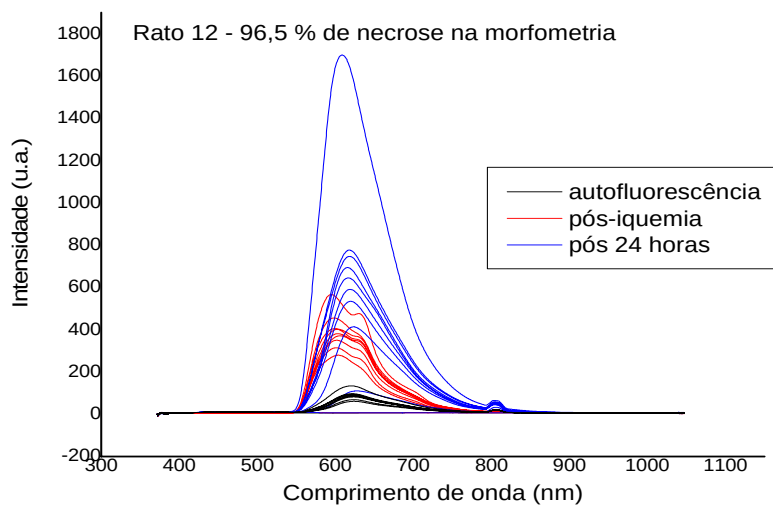


Gráfico 4.13 - Padrão espectral do animal 13 comparado com a área de necrose avaliada por morfometria.

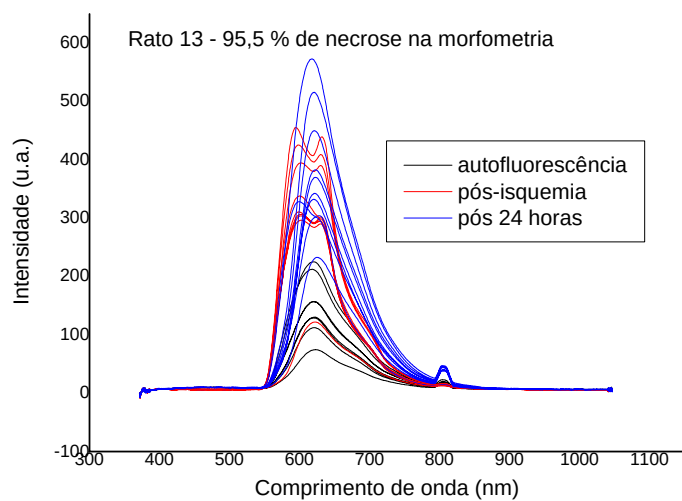


Gráfico 4.14 - Padrão espectral do animal 14 comparado com a área de necrose avaliada por morfometria.

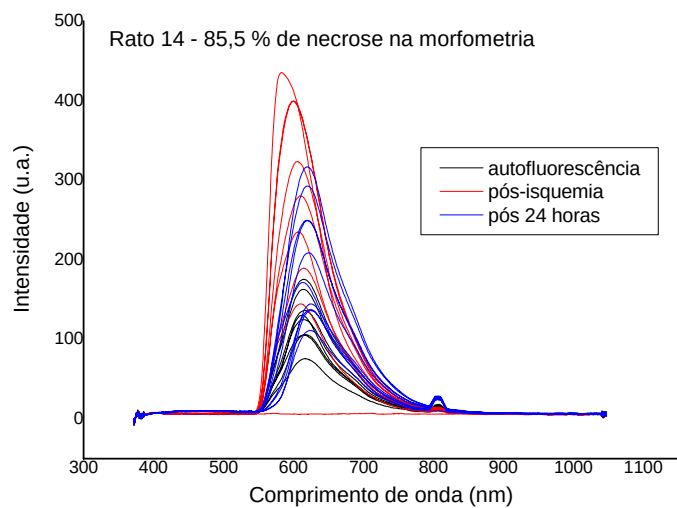


Gráfico 4.15 - Padrão espectral do animal 15 comparado com a área de necrose avaliada por morfometria.

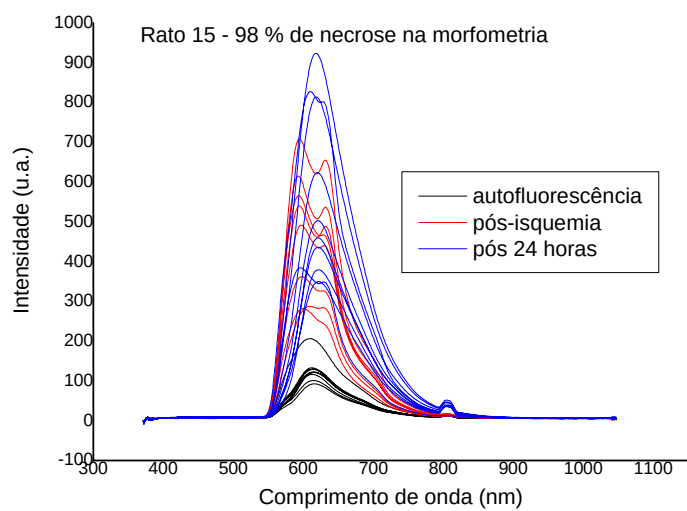


Gráfico 4.16 - Padrão espectral do animal 16 comparado com a área de necrose avaliada por morfometria.

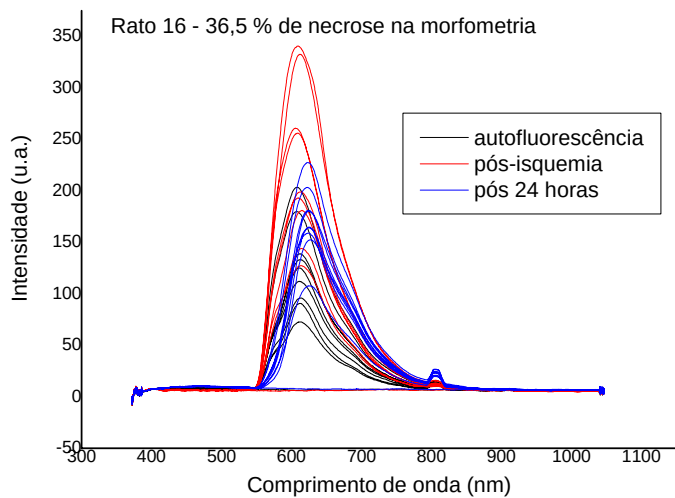


Gráfico 4.17 - Padrão espectral do animal 17 comparado com a área de necrose avaliada por morfometria.

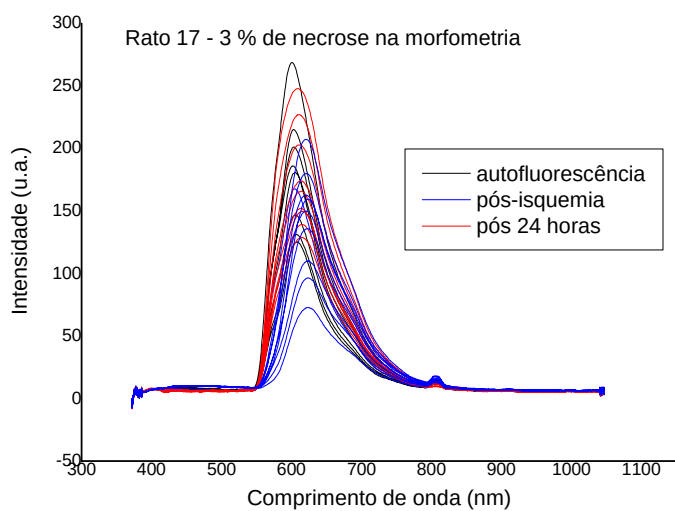
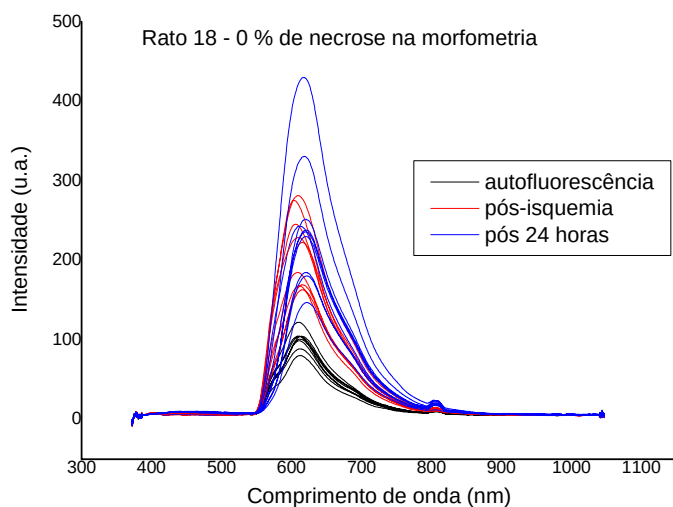


Gráfico 4.18 - Padrão espectral do animal 18 comparado com a área de necrose avaliada por morfometria.



Os padrões espectrais foram distintos nas 3 fases sendo possível avaliar bem o padrão no período pós isquemia em animal onde o tecido sofreu necrose intensa (exemplo – rato 15) (Gráfico 4.19) e em animal onde o tecido não sofreu necrose (exemplo – rato 10) (Gráfico 4.20).

Gráfico 4.19 - Padrões espectrais do animal 15, que sofreu necrose hepática intensa, nos período pré-isquemia, pós-isquemia e 24 horas após a reperfunção, onde o eixo Y representa a intensidade (u.a.) e X representa o comprimento de onda (nm).

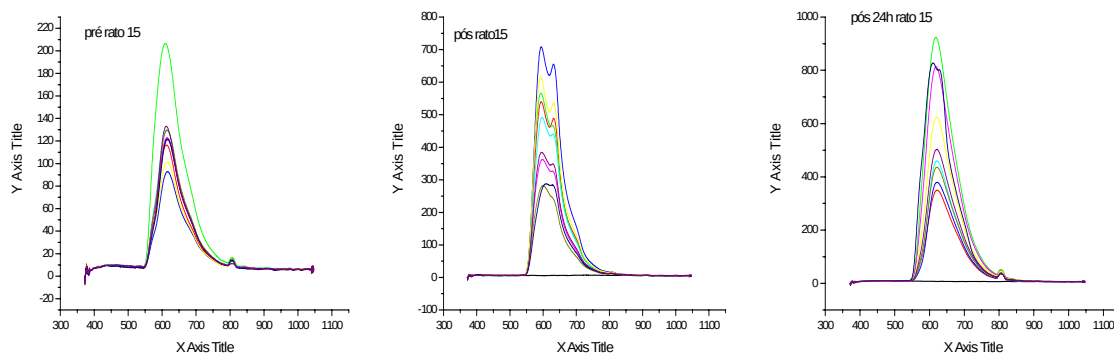
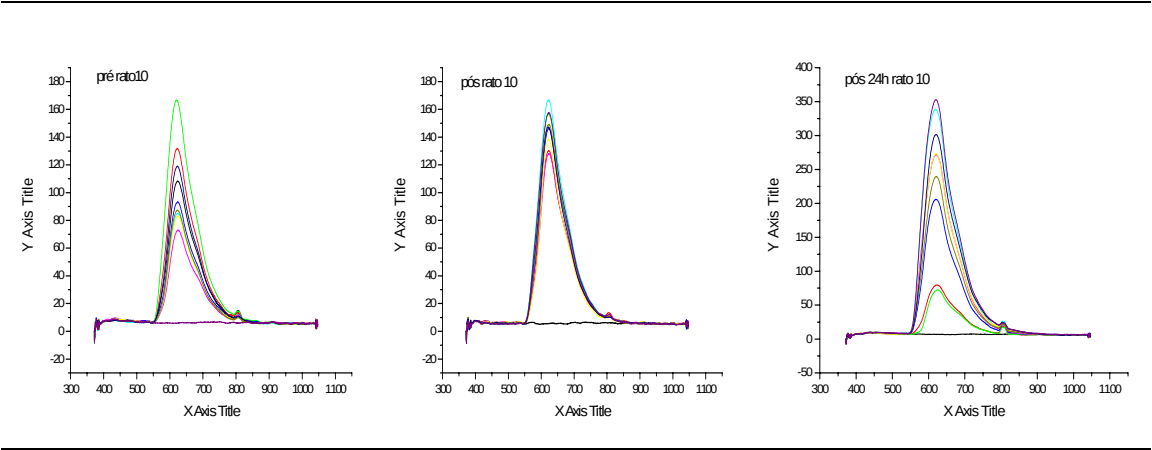


Gráfico 4.20 - Padrões espectrais do animal 10, sem alterações no tecido hepático, nos período pré-isquemia, pós-isquemia e 24 horas após a reperfusão, onde o eixo Y representa a intensidade (u.a.) e X representa o comprimento de onda (nm).



b. Análise das Componentes Principais (PCA)

Os resultados obtidos quando as componentes principais são calculadas a partir dos espectros de fluorescência, utilizando apenas as duas maiores componentes, uma vez que representam mais de 90% dos dados (gráficos 4.21 – 4.32).

Gráfico 4.21 – Distribuição dos animais no período pré-isquemia após análise das componentes principais. O comparativo PC1 X PC2 não tem padrão significativo.

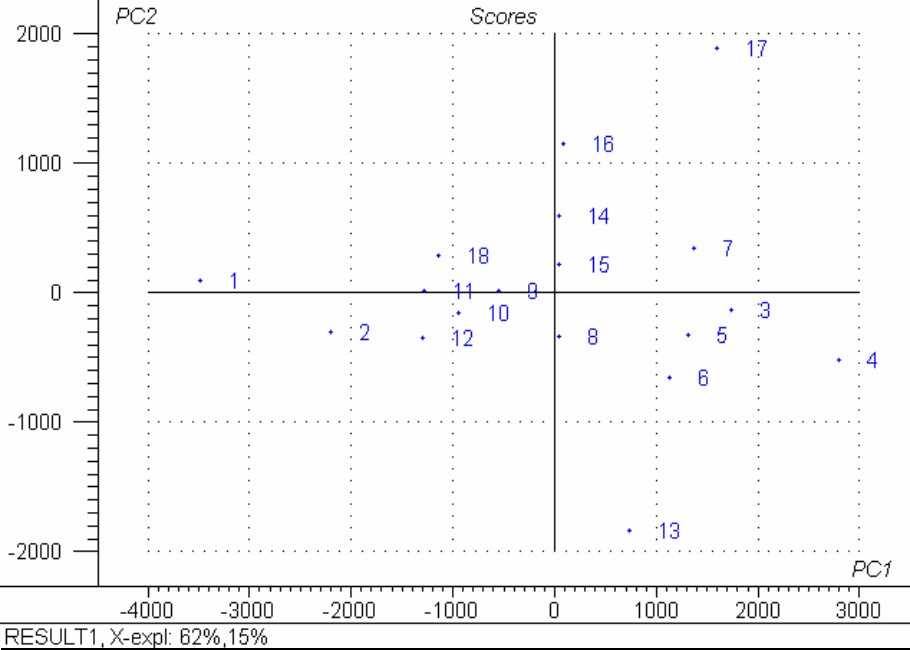


Gráfico 4.22 - Distribuição dos animais no período pré-isquemia após análise das componentes principais, onde as letras A indicam animais que evoluíram com necrose menor que 50% e as letras B indicam animais que evoluíram com necrose maior que 50%.

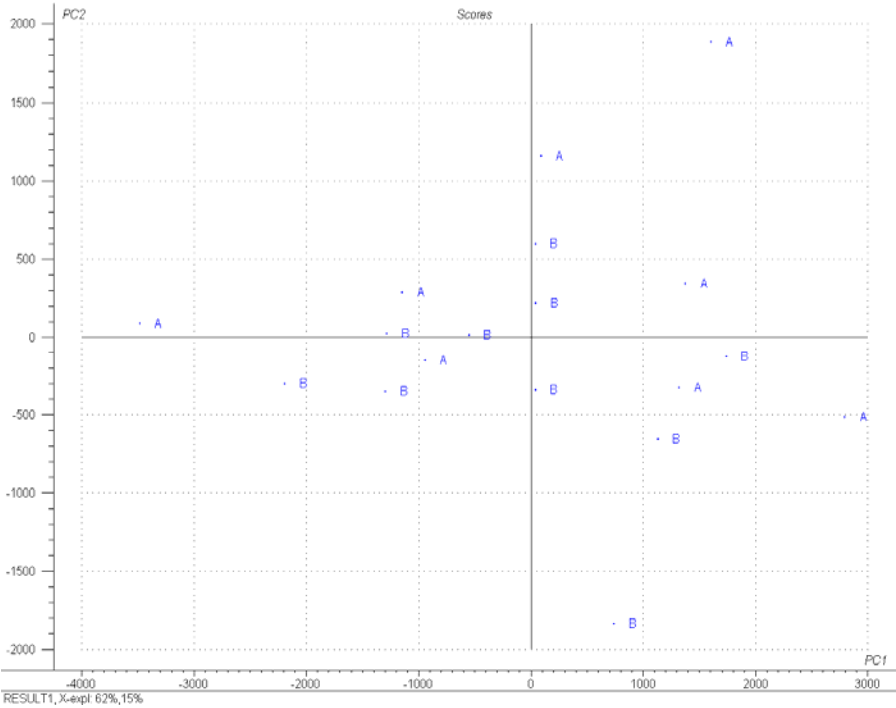


Gráfico 4.23 - Distribuição dos animais no período pré-isquemia após análise das componentes principais, onde as letras A indicam animais que evoluíram com necrose menor que 70% e as letras B indicam animais que evoluíram com necrose maior que 70%.

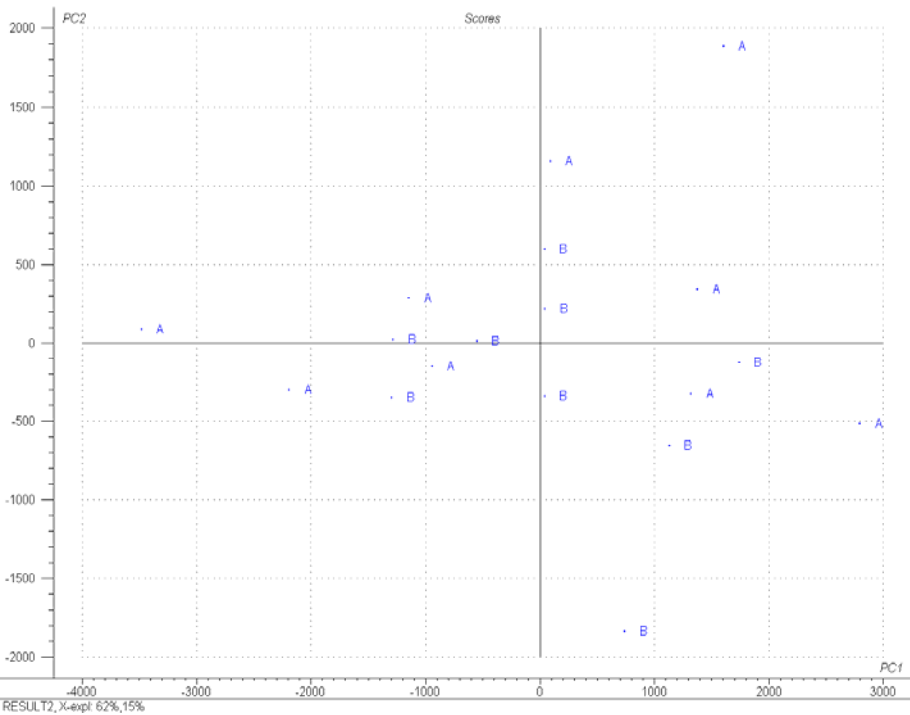


Gráfico 4.24 - Distribuição dos animais no período pré-isquemia após análise das componentes principais, onde as letras A indicam animais que evoluíram com necrose menor que 85% e as letras B indicam animais que evoluíram com necrose maior que 85%.

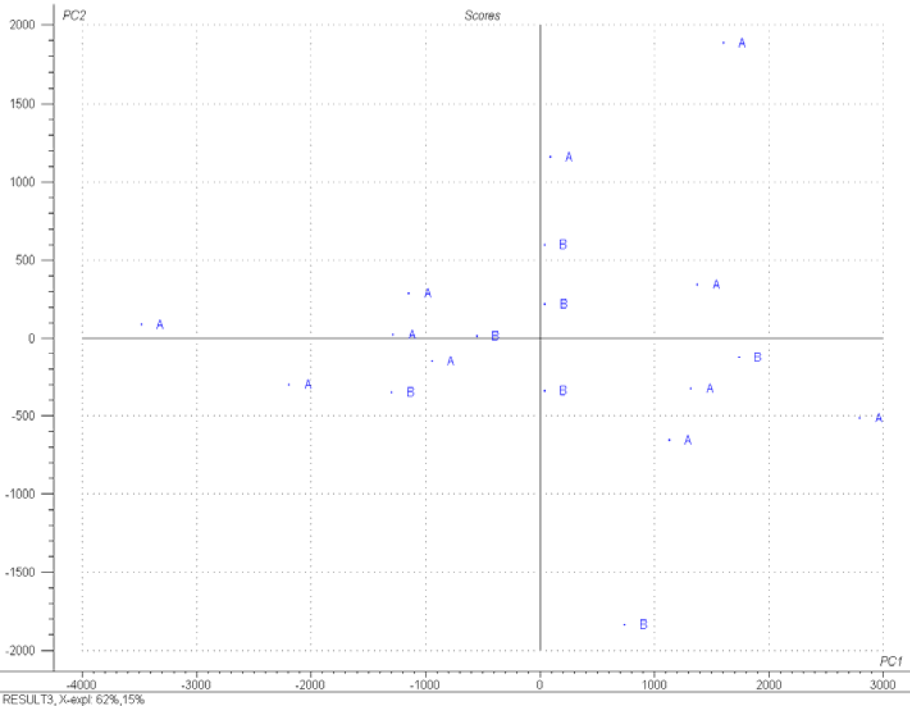


Gráfico 4.25 - Distribuição dos animais no período pós-isquemia após análise das componentes principais. O comparativo PC1 X PC2 tem padrão significativo, sendo que em PC1 estão os animais que apresentaram dissociação espectral.

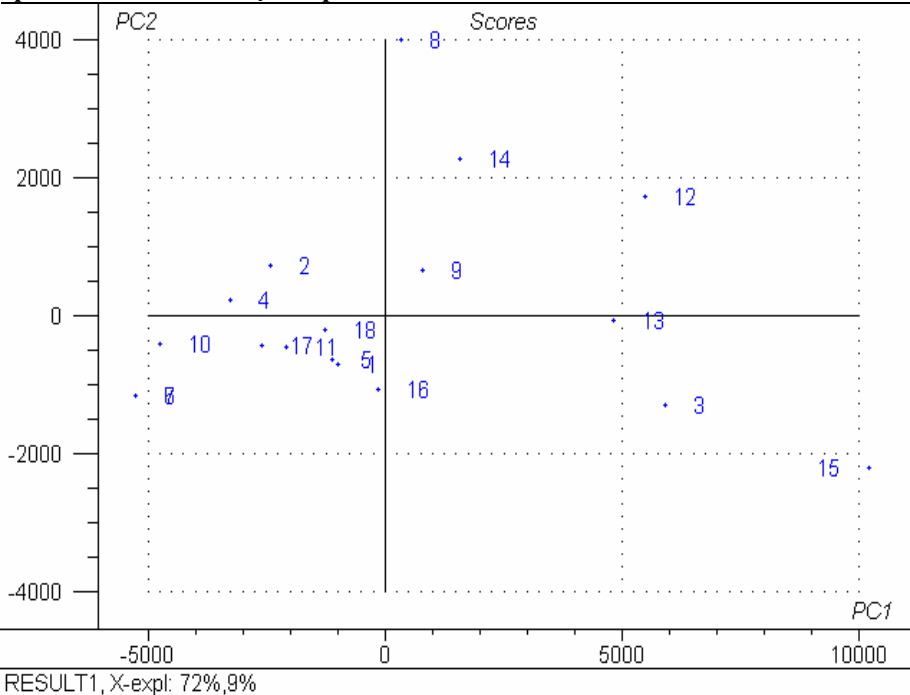


Gráfico 1.26 - Distribuição dos animais no período pós-isquemia após análise das componentes principais, onde as letras A indicam animais que evoluíram com necrose menor que 50% e as letras B indicam animais que evoluíram com necrose maior que 50%.

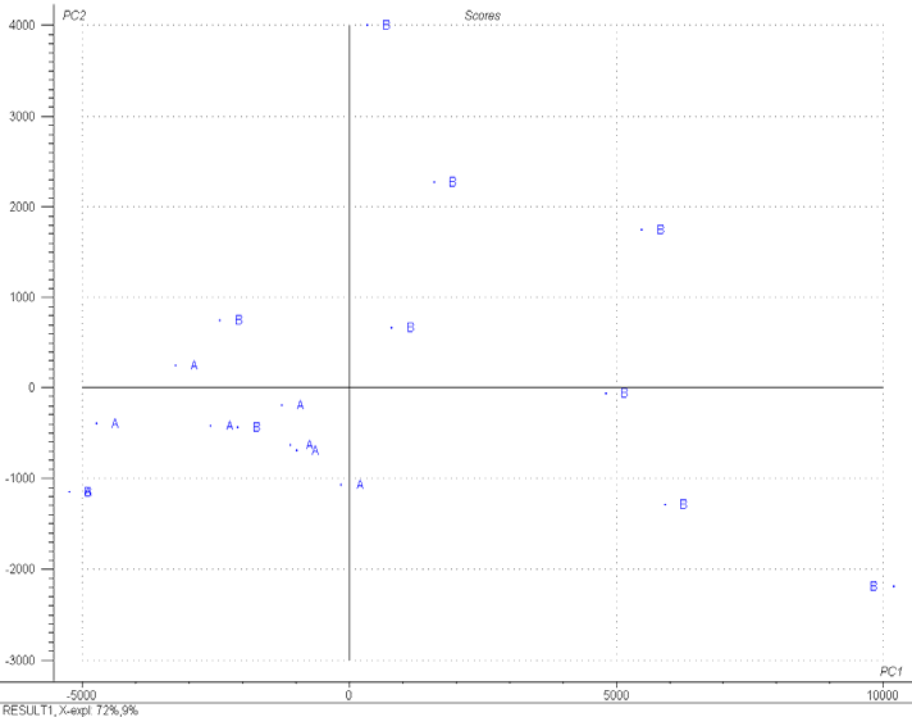


Gráfico 4.27 - Distribuição dos animais no período pós-isquemia após análise das componentes principais, onde as letras A indicam animais que evoluíram com necrose menor que 70% e as letras B indicam animais que evoluíram com necrose maior que 70%.

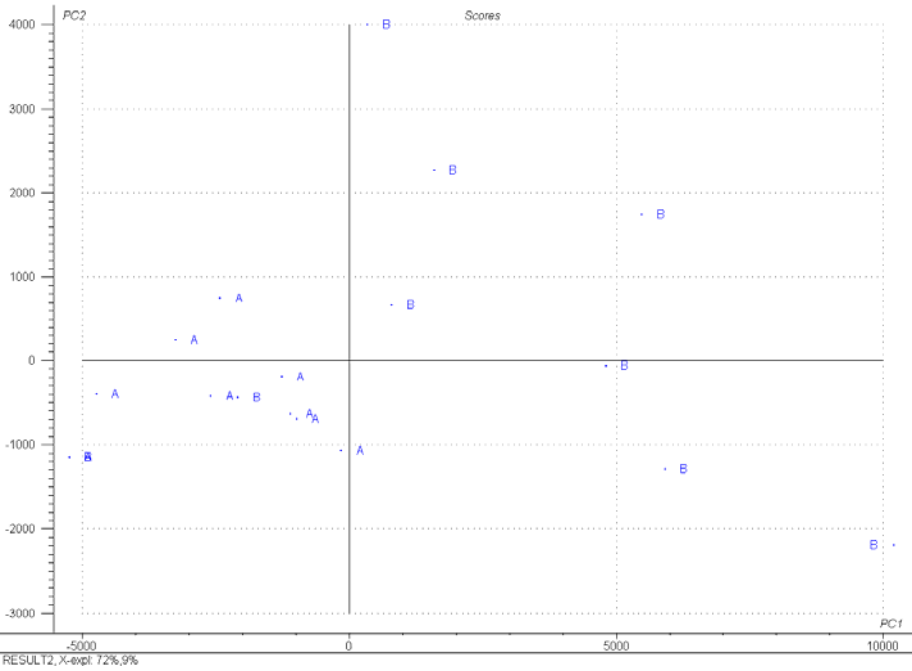


Gráfico 4.28 - Distribuição dos animais no período pós-isquemia após análise das componentes principais, onde as letras A indicam animais que evoluíram com necrose menor que 85% e as letras B indicam animais que evoluíram com necrose maior que 85%.

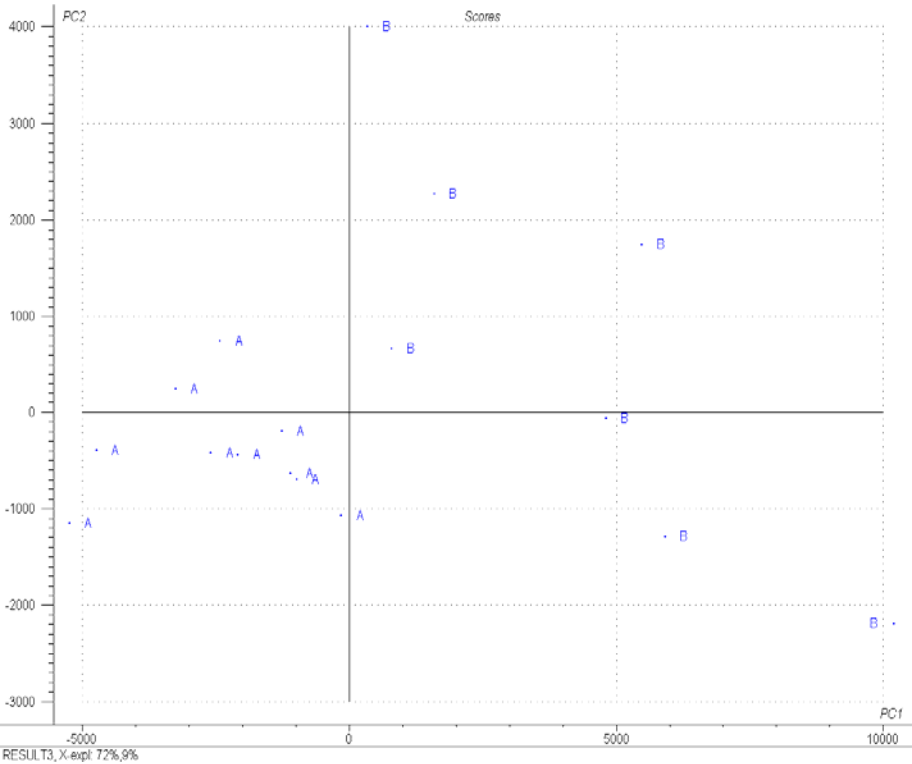


Gráfico 4.29 - Distribuição dos animais no período 24 horas após a reperfusão após análise das componentes principais. O comparativo PC1 X PC2 tem padrão significativo, sendo que em PC1 estão os animais que apresentaram dissociação espectral.

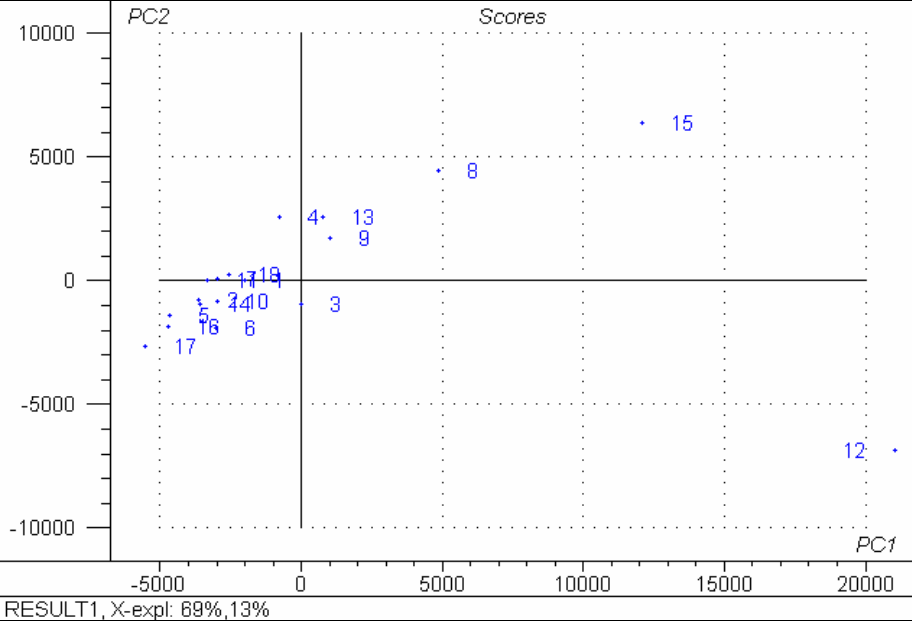


Gráfico 4.30 - Distribuição dos animais no período 24 horas após a reperusão após análise das componentes principais, onde as letras A indicam animais que evoluíram com necrose menor que 50% e as letras B indicam animais que evoluíram com necrose maior que 50%.

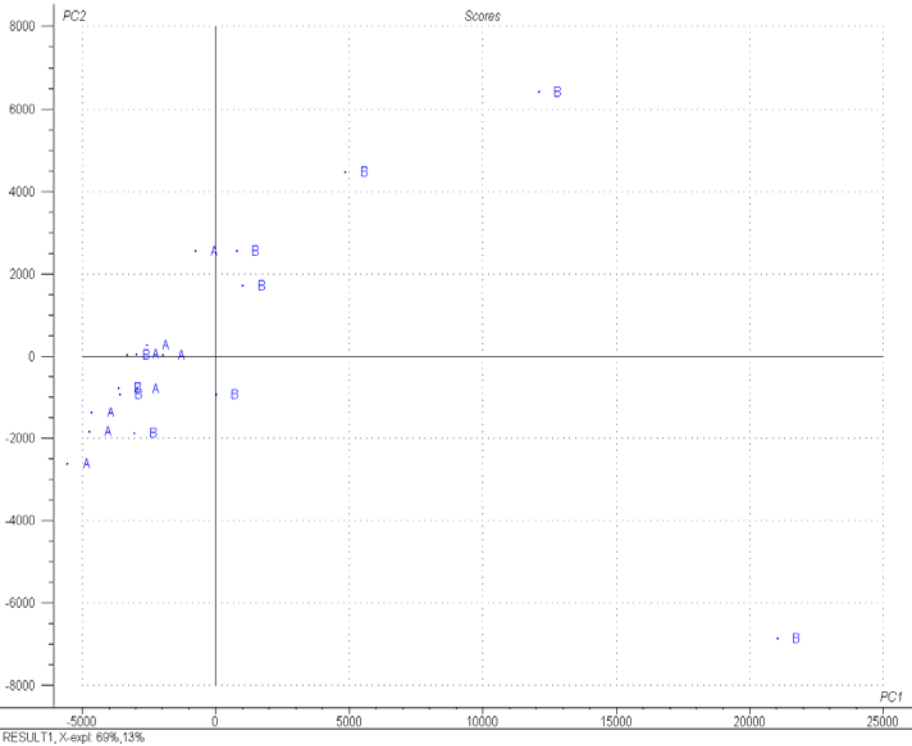


Gráfico 4.31 - Distribuição dos animais no período pré-isquemia após análise das componentes principais, onde as letras A indicam animais que evoluíram com necrose menor que 70% e as letras B indicam animais que evoluíram com necrose maior que 70%.

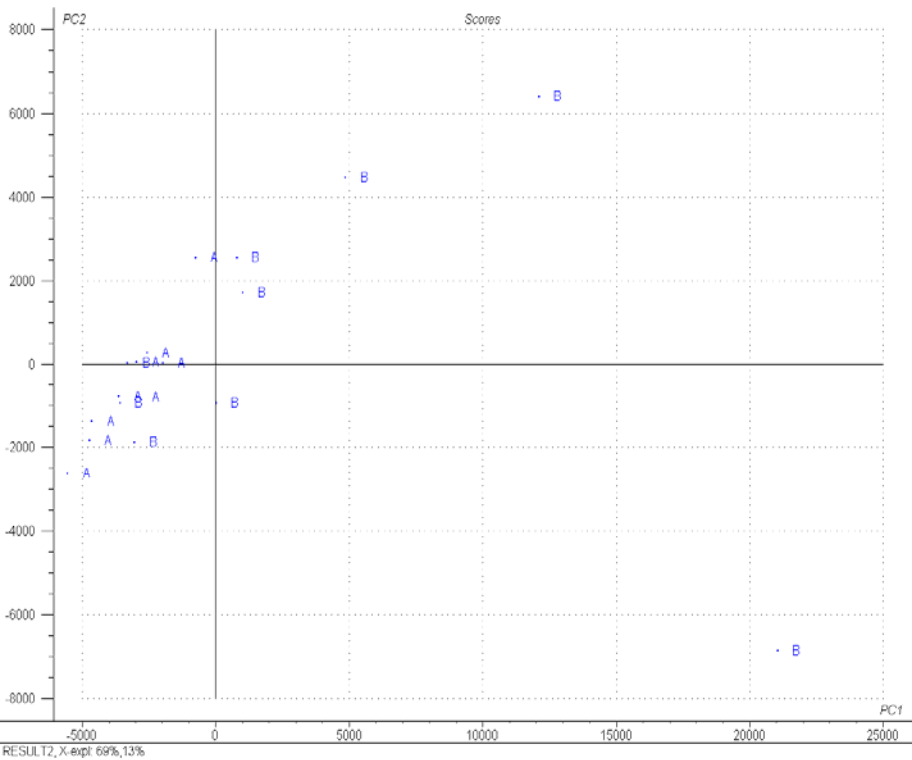
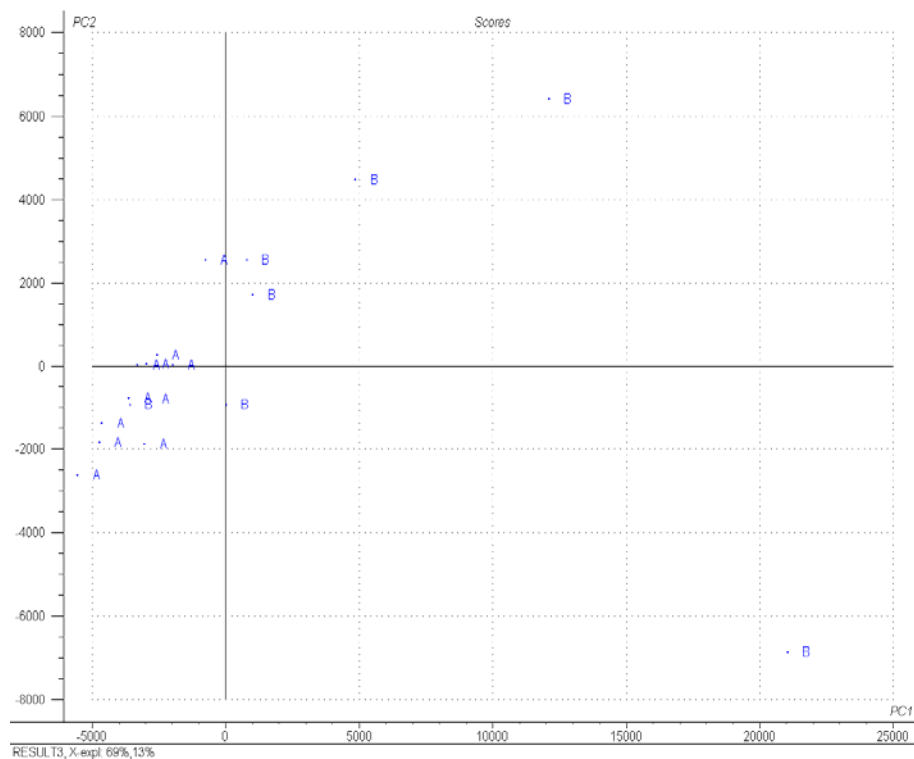


Gráfico 4.32 - Distribuição dos animais no período pré-isquemia após análise das componentes principais, onde as letras A indicam animais que evoluíram com necrose menor que 85% e as letras B indicam animais que evoluíram com necrose maior que 85%.



É possível ver que as medidas relativas à mesma extensão de necrose se agrupam em torno de uma região, o que é uma das características que se espera obter de uma análise em componentes principais, onde amostras semelhantes se agrupem numa mesma região e amostras distintas se mantenham espaçadas nesse espaço de PC1 versus PC2.

c. Resultados Laboratoriais

Para AST, ALT, Bilirrubinas e DHL os dados pré-isquemia são os dados controle. Na Função Mitocondrial (Potencial de Membrana, ADP/O, RCR, Estágio 3 e Estágio 4) cada animal tem o seu controle. A seguir seguem os resultados laboratoriais (Tabelas 4.1 – 4.9).

Tabela 4.1 – AST (U/L) por animal, por tempo de isquemia e nos períodos pré-isquemia, pós-isquemia e 24 horas após a reperfusão.

	Pré-isquemia	Pós-isquemia	24h pós reperfusão
1h isquemia			
rato 1	122	272	1942
rato 2	112	129	3707
rato 3	113	82	3940
rato 4	120	461	166
rato 5	127	150	883
rato 6	108	176	3012
rato 7	138	166	157
rato 18	127	225	155
2h isquemia			
rato 8	178	171	3836
rato 9	190	164	4044
rato 10	159	339	2724
rato 11	182	691	2198
rato 12	92	174	8168
rato 13	93	178	6656
rato 14	89	206	3193
rato 15	103	161	7428
rato 16	115	141	2174
rato 17	112	155	155

Tabela 4.2 - ALT (U/L) por animal, por tempo de isquemia e nos períodos pré-isquemia, pós-isquemia e 24 horas após a reperfusão.

	Pré-isquemia	Pós-isquemia	24h pós reperfusão
1h isquemia			
rato 1	30	100	1589
rato 2	40	72	3090
rato 3	33	37	3800
rato 4	35	171	176
rato 5	23	49	1140
rato 6	30	72	1774
rato 7	31	49	72
rato 18	61	131	77
2h isquemia			
rato 8	12	49	3476
rato 9	28	56	3088
rato 10	30	110	112
rato 11	35	202	719
rato 12	26	791	7036
rato 13	40	1013	5150
rato 14	28	1013	3172
rato 15	38	98	7120
rato 16	26	49	2031
rato 17	23	79	110

Tabela 4.3 - DHL (U/L) por animal, por tempo de isquemia e nos períodos pré-isquemia, pós-isquemia e 24 horas após a reperfusão.

	Pré-isquemia	Pós-isquemia	24h pós reperfusão
1h isquemia			
rato 1	2222	2189	1011
rato 2	2478	1733	1200
rato 3	3189	1189	1186
rato 4	2422	2244	1578
rato 5	3277	2511	1000
rato 6	2378	1744	733
rato 7	3611	2389	1355
rato 18	1355	1878	1200
2h isquemia			
rato 8	4588	433	4566
rato 9	5033	2322	1199
rato 10	3922	3133	2444
rato 11	2633	2400	1489
rato 12	1133	1255	16665
rato 13	878	2433	1444
rato 14	989	1922	567
rato 15	1178	2733	7000
rato 16	1378	1433	744
rato 17	1555	1511	833

Tabela 4.4 – Bilirrubina Total (mg/dL) por animal, por tempo de isquemia e nos períodos pré-isquemia, pós-isquemia e 24 horas após a reperfusão.

	Pré-isquemia	Pós-isquemia	24h pós reperfusão
1h isquemia			
rato 1	0,2	0,1	0,1
rato 2	0,7	0,1	0,15
rato 3	0,1	0,1	0,1
rato 4	0,1	0,1	0,1
rato 5	0,5	0,1	0,1
rato 6	0,1	0,1	0,1
rato 7	1,1	0,2	0,2
rato 18	0,2	0,7	0,4
2h isquemia			
rato 8	0,1	0,3	0,7
rato 9	0,4	0,4	0,3
rato 10	0,1	0,4	0,2
rato 11	0,15	0,1	0,1
rato 12	1	0,5	1,2
rato 13	0,1	0,3	0,4
rato 14	0,3	0,5	0,3
rato 15	0,15	0,6	0,2
rato 16	0,3	0,3	0,2
rato 17	0,4	0,6	0,3

Tabela 4.5 – Potencial de Membrana Mitocondrial (mv), por animal e por período de isquemia, comparado com o animal controle.

	Potencial de Membrana	Controle
1h isquemia		
rato 1	125	127
rato 2	125	127
rato 3	12	127
rato 4	126	127
rato 5	126	127
rato 6	122	127
rato 7	126	127
rato 18	131	126
2h isquemia		
rato 8	16	128
rato 9	10	128
rato 10	126	128
rato 11	126	128
rato 12	0	126
rato 13	33	126
rato 14	125	126
rato 15	0	126
rato 16	127	126
rato 17	128	126

Tabela 4.6 – ADP/O (átomos de O/min/mg de proteínas) , por animal e por período de isquemia, comparado com o animal controle.

	ADP/O	Controle
1h isquemia		
rato 1	1,8	1,3
rato 2	1,5	1,3
rato 3	2,2	1,3
rato 4	1,6	1,3
rato 5	1,2	1,3
rato 6	1,1	1,3
rato 7	1,2	1,3
rato 18	0	1,2
2h isquemia		
rato 8	2,2	1,4
rato 9	2	1,4
rato 10	1,4	1,4
rato 11	1,6	1,4
rato 12	1,1	1,2
rato 13	1,1	1,2
rato 14	1,9	1,2
rato 15	0	1,2
rato 16	1,5	1,2
rato 17	1,8	1,2

Tabela 4.7 – RCR (átomos de O/min/mg de proteínas), por animal e por período de isquemia, comparado com o animal controle.

	RCR	Controle
1h isquemia		
rato 1	2,3	5,4
rato 2	2,8	5,4
rato 3	1,2	5,4
rato 4	2	5,4
rato 5	3,6	5,4
rato 6	2	5,4
rato 7	3,3	5,4
rato 18	3,4	4,1
2h isquemia		
rato 8	2,8	3,5
rato 9	1,1	3,5
rato 10	2,7	3,5
rato 11	3,8	3,5
rato 12	1,3	4,1
rato 13	1,4	4,1
rato 14	3,5	4,1
rato 15	1,9	4,1
rato 16	2,7	4,1
rato 17	6,3	4,1

Tabela 4.8 – Estágio 4 (átomos de O/min/mg de proteínas), por animal e por período de isquemia, comparado com o animal controle.

	Estágio 4	Controle
1h isquemia		
rato 1	32,14	11,17
rato 2	22,97	11,17
rato 3	21,93	11,17
rato 4	26,16	11,17
rato 5	22,59	11,17
rato 6	37,27	11,17
rato 7	21,9	11,17
rato 18	9,73	23,01
2h isquemia		
rato 8	3,86	14,09
rato 9	24,51	14,09
rato 10	27,02	14,09
rato 11	17,28	14,09
rato 12	21,92	23,01
rato 13	10,39	23,01
rato 14	25,9	23,01
rato 15	9,24	23,01
rato 16	26,26	23,01
rato 17	20,22	23,01

Tabela 4.9 – Estágio 3 (átomos de O/min/mg de proteínas), por animal e por período de isquemia, comparado com o animal controle.

	Estágio 3	Controle
1h isquemia		
rato 1	73,3	60,48
rato 2	64,8	60,48
rato 3	26,13	60,48
rato 4	51,79	60,48
rato 5	81,19	60,48
rato 6	75,02	60,48
rato 7	71,35	60,48
rato 18	74	94,38
2h isquemia		
rato 8	10,84	49,65
rato 9	26,61	49,65
rato 10	67,08	49,65
rato 11	66,32	49,65
rato 12	12,37	94,38
rato 13	29,32	94,38
rato 14	93,17	94,38
rato 15	17,97	94,38
rato 16	70,42	94,38
rato 17	65,46	94,38

d. Resultados Histopatológicos e Morfométricos

O tipo de necrose encontrada foi coagulativa, sendo que nas amostras submetidas a 1 hora de isquemia (Figuras 4.1 – 4.3) há predomínio de necrose nas áreas peri-vênula hepática terminal com acometimento de zona 3 (total) e zona 2 (parcial). A maior parte do tecido hepático peri-espaco-porta apresenta-se preservado. Este fato seria o esperado já que, com a diminuição do fluxo sanguíneo local, os hepatócitos da zona 1 e parcialmente da zona 2 estão mais próximos dos vasos penetrantes, responsáveis pelo suprimento sanguíneo local.

Nas amostras submetidas a 2 horas de isquemia (Figuras 4.4 – 4.7) a extensão do processo de necrose para a zona 1, com necrose lobular total na maior parte dos recortes e preservação de algumas raras áreas peri-espaco porta, formando verdadeiras “ilhas” de tecido hepático “viável” peri-portal em meio a extensas áreas de necrose coagulativa.

Estudo microscópico no tecido hepático submetido à isquemia parcial de 1 hora.

Figura 4.1 - Tecido de animal submetido à isquemia por 1 hora. Apresenta extensão da necrose do tecido a partir da veia hepática terminal, em direção ao espaço porta (Coloração pela hematoxilina-eosina, com aumento de 100X).

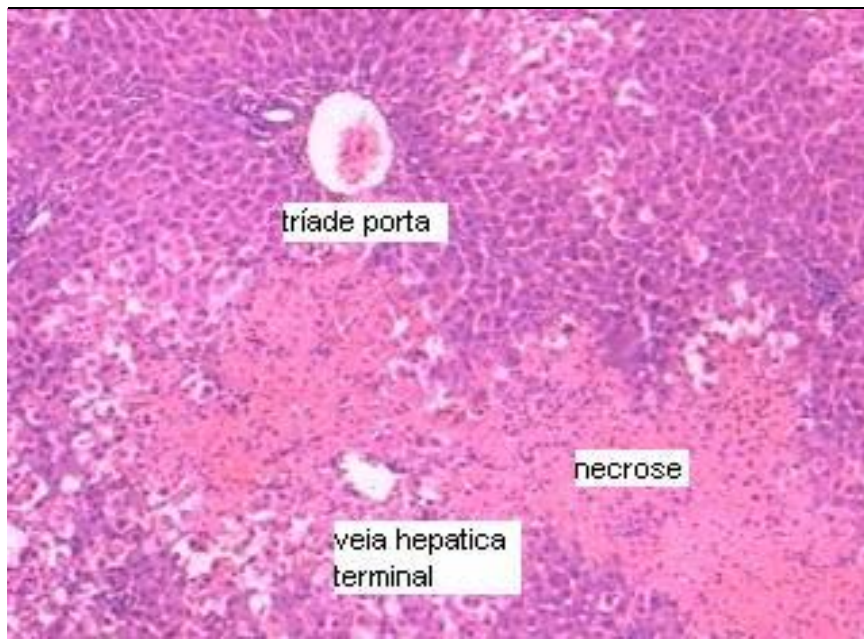
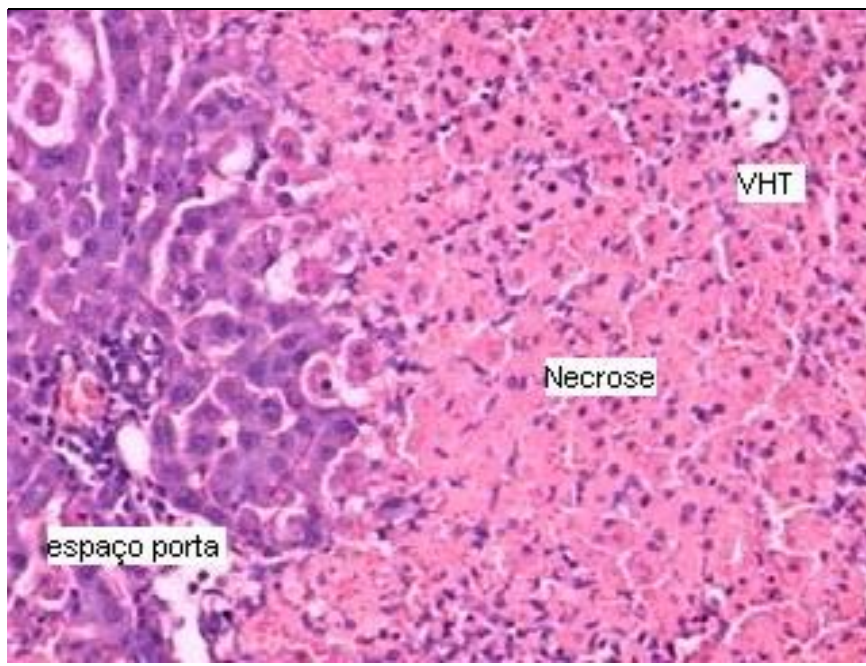


Figura 4.2 - Tecido de animal submetido à isquemia por 1 hora. Apresenta necrose em torno da veia hepática terminal (Coloração pela hematoxilina-eosina, com aumento de 200X).



Figura 4.3 - Tecido de animal submetido à isquemia por 1 hora. Relação da área de necrose com a tríade porta e veia hepática terminal (Coloração pela hematoxilina-eosina, com aumento de 200X).



Estudo microscópico no tecido hepático submetido à isquemia parcial de 2 horas.

Figura 4.4 - Tecido de animal submetido à isquemia por 2 horas. Apresenta avanço do processo de necrose em direção ao espaço porta (Coloração pela hematoxilina-eosina, com aumento de 200X).

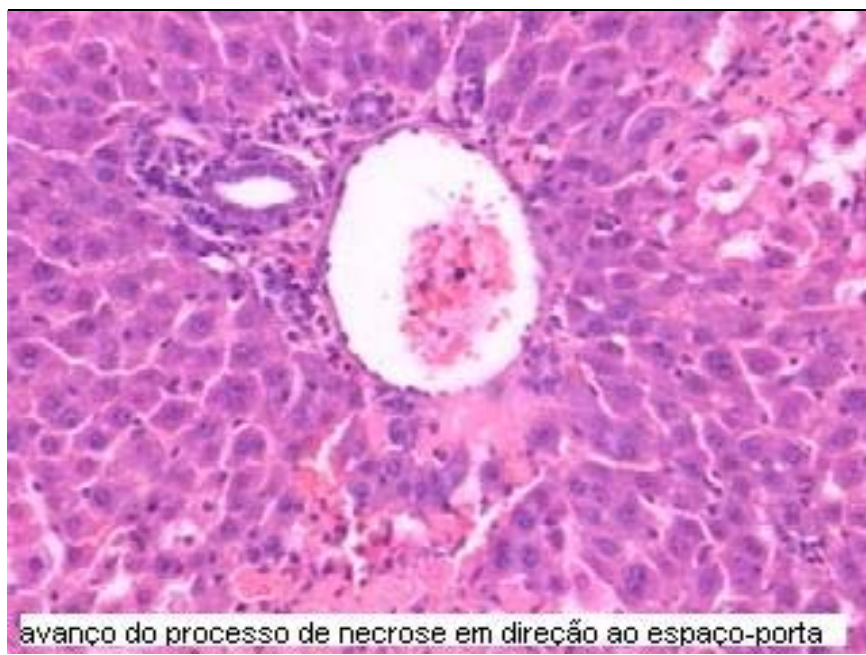


Figura 4.5 - Tecido de animal submetido à isquemia por 2 horas. Apresenta extensa área de necrose (Coloração pela hematoxilina-eosina, com aumento de 40X).

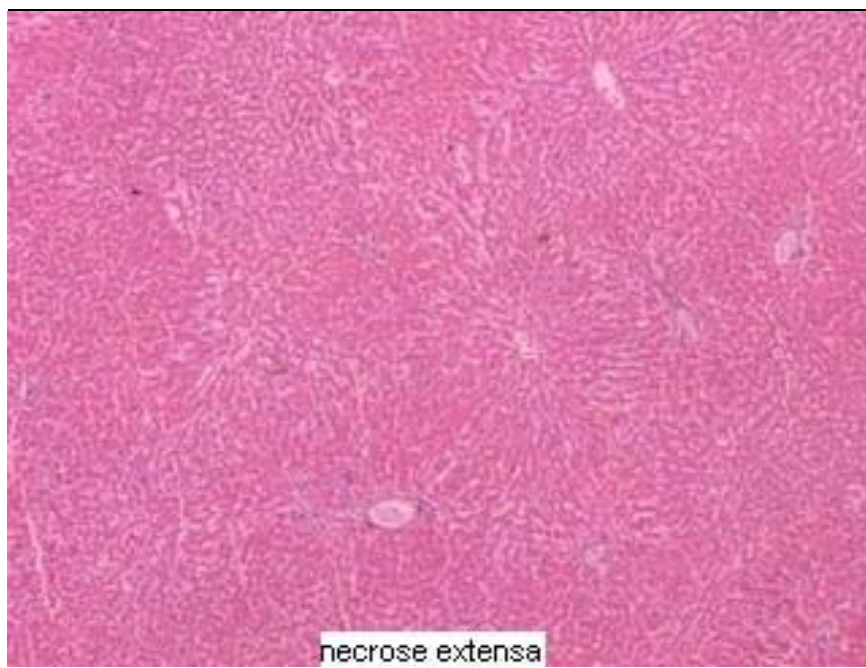
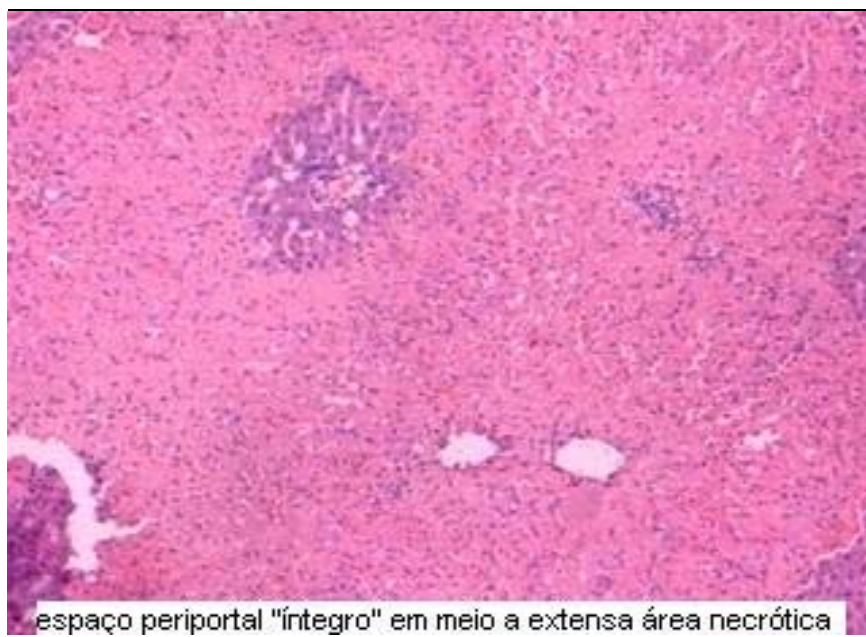


Figura 4.6 - Tecido de animal submetido à isquemia por 2 horas. Apresenta extensa necrose com acometimento do espaço porta (Coloração pela hematoxilina-eosina, com aumento de 400X).



Figura 4.7 - Tecido de animal submetido à isquemia por 2 horas. Apresenta “ilha” de tecido hepático periportal viável em meio a extensa necrose (Coloração pela hematoxilina-eosina, com aumento de 40X).



A área de necrose foi avaliada pela morfometria, pelo tempo de isquemia, pelo Programa “ImageJ” (Tabela 4.10).

Tabela 4.10 – Área de necrose avaliada pelo Programa “ImageJ”, por animal e por tempo de isquemia.

Amostra nº	Tempo de Isquemia(h)	% necrose
1	1	32
2	1	55
3	1	85
4	1	1
5	1	22,5
6	1	73
7	1	1,5
8	2	92
9	2	88,5
10	2	0
11	2	73
12	2	96,5
13	2	95,5
14	2	85,5
15	2	98
16	2	36,5
17	2	3
18	1	0

e. Resultados Estatísticos

Os resultados da morfometria são comparados com os resultados da EFIL pelo teste exato de Fisher e coeficiente kappa (Tabelas 4.11 – 4.13).

Coeficiente kappa	Força da concordância
menor que zero	<i>poor</i> (pobre)
0,00 – 0,20	<i>slight</i> (desprezível)
0,21 – 0,40	<i>fair</i> (suave)
0,41 – 0,60	<i>moderate</i> (moderada)
0,61 – 0,80	<i>substantial</i> (substancial, grande)
0,81 – 1,00	<i>almost perfect</i> (quase perfeita)

Tabela 4.11 - Contagem das variáveis segundo morfometria (animais que evoluíram com necrose <50% e ≥50%) e resultados do teste exato de Fisher e coeficiente kappa.

Variável	Morfometria		p-valor	kappa (IC 95%)
	< 50 [n (%)]	≥50 [n (%)]		
Pós Isquemia				
PC2	8	3	<0,01	0,67 (0,36;0,99)
PC1	0	7		
Pós Reperusão				
PC2	8	4	<0,01	0,57 (0,24;0,91)
PC1	0	6		

Tabela 4.12 - Contagem das variáveis segundo morfometria (animais que evoluíram com necrose <70% e ≥70%) e resultados do teste exato de Fisher e coeficiente kappa.

Variável	Morfometria		p-valor	kappa (IC 95%)
	< 70 [n (%)]	≥ 70 [n (%)]		
<i>Pós Isquemia</i>				
PC2	9	2	< 0,01	0,78 (0,49;1,00)
PC1	0	7		
<i>Pós Reperusão</i>				
PC2	9	3	< 0,01	0,67 (0,34;0,99)
PC1	0	6		

Tabela 4.13 - Contagem das variáveis segundo morfometria (animais que evoluíram com necrose <85% e ≥85%) e resultados do teste exato de Fisher e coeficiente kappa.

≥65 %) e Resultados do teste exato de Fisher e coeficiente kappa.				
Variável	Morfometria		p-valor	kappa (IC 95%)
	< 85 [n (%)]	≥85 [n (%)]		
<i>Pós Isquemia</i>				
PC2	11	0	< 0,01	1,00 (1,00;1,00)
PC1	0	7		
<i>Pós Reperfusão</i>				
PC2	11	1	< 0,01	0,88 (0,65;1,00)
PC1	0	6		

Para comparar a função mitocondrial com a morfometria foi utilizado o teste não-paramétrico para duas amostras independentes de Wilcoxon. Quando não houve empates entre as respostas, foi utilizada a versão exata do teste de Wilcoxon (Tabela 4.14 e gráficos 4.24 – 4.28).

Tabela 4.14 – Função mitocondrial

Variável	Grupo	Mediana	Q1	Q3	Grupo	Mediana	Q1	Q3	p-valor
Estágio 3	<85	70,42	65,89	73,65	≥85	26,13	15,17	27,96	0,01
	<70	70,42	65,46	73,3	≥70	26,61	17,97	66,32	0,08
	<50	70,88	66,68	73,48	≥50	27,96	20,01	65,94	0,06
Estágio 4	<85	22,97	21,06	26,64	≥85	21,92	9,82	23,22	0,13
	<70	22,97	21,9	26,26	≥70	21,92	10,39	24,51	0,26
	<50	24,38	21,48	26,45	≥50	21,92	12,11	24,12	0,32
RCR	<85	2,8	2,5	3,5	≥85	1,4	1,25	2,35	0,03
	<70	2,8	2,7	3,4	≥70	1,9	1,3	2,8	0,08
	<50	3	2,6	3,45	≥50	1,95	1,32	2,8	0,11
ADP/O	<85	1,5	1,2	1,60	≥85	1,9	1,1	2,1	0,44
	<70	1,5	1,2	1,6	≥70	1,6	1,1	2	0,66
	<50	1,45	1,2	1,65	≥50	1,55	1,1	1,98	0,66
PM	<85	126	125,5	126,5	≥85	12	5	24,5	< 0,01
	<70	126	126	127	≥70	16	10	122	< 0,01
	<50	126	126	127,25	≥50	24,5	10,5	124,25	< 0,01

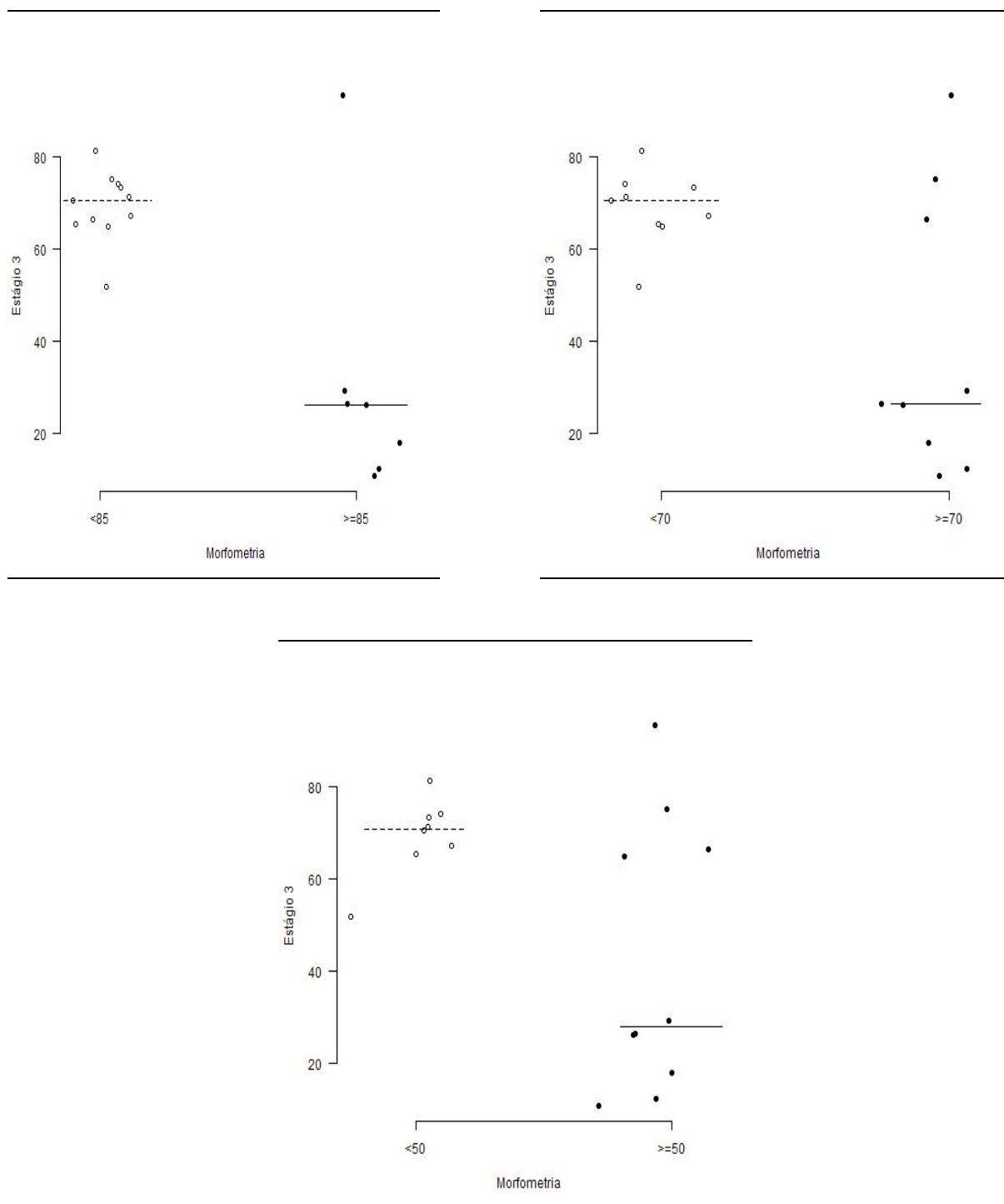


Gráfico 4.24 - Gráficos de dispersão para o Estágio 3 segundo Morfometria.

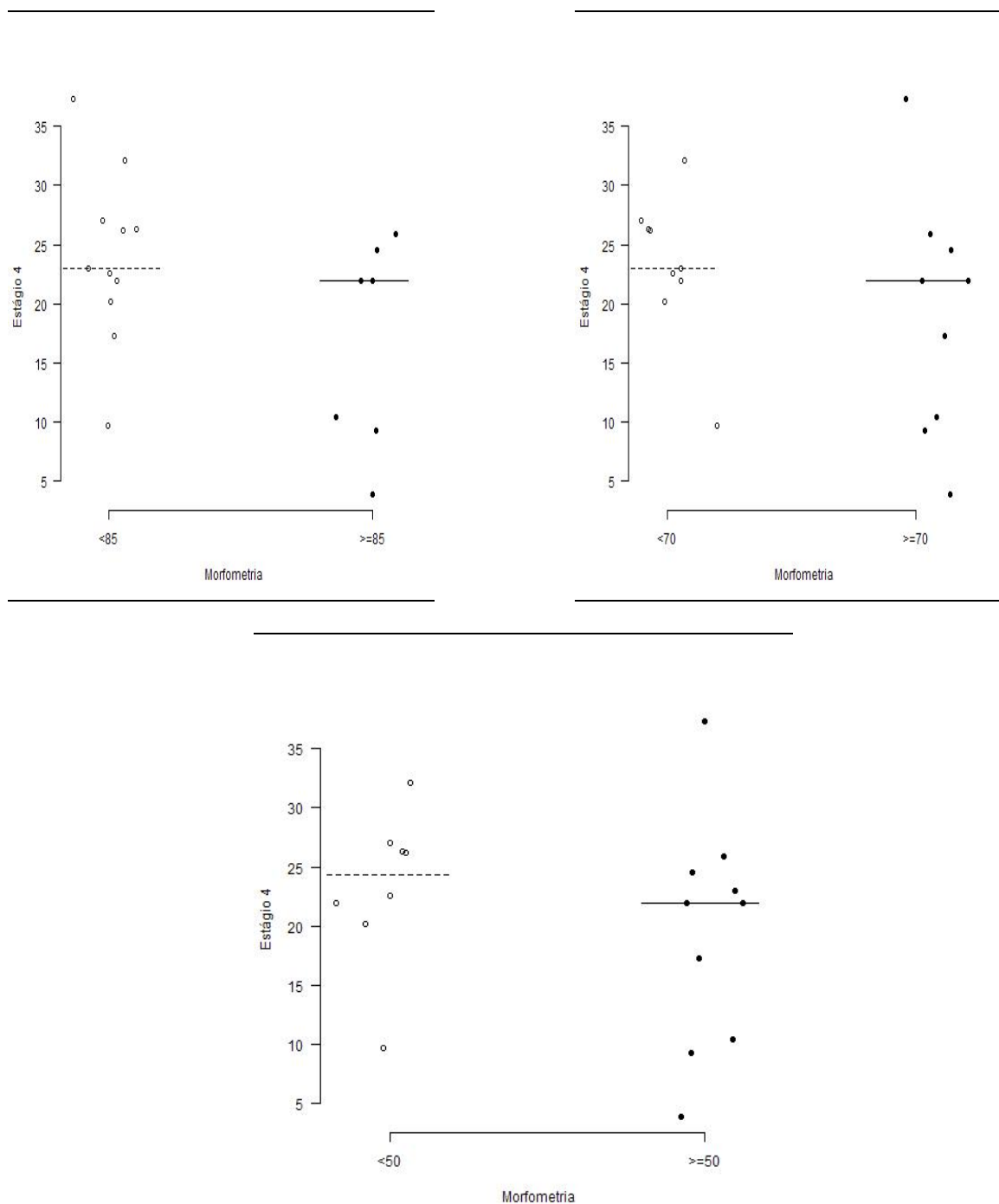


Gráfico 4.25 - Gráfico de dispersão para o Estágio 4 segundo Morfometria.

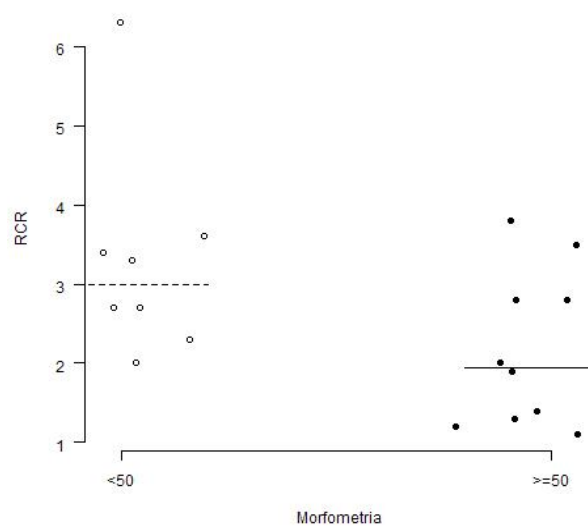
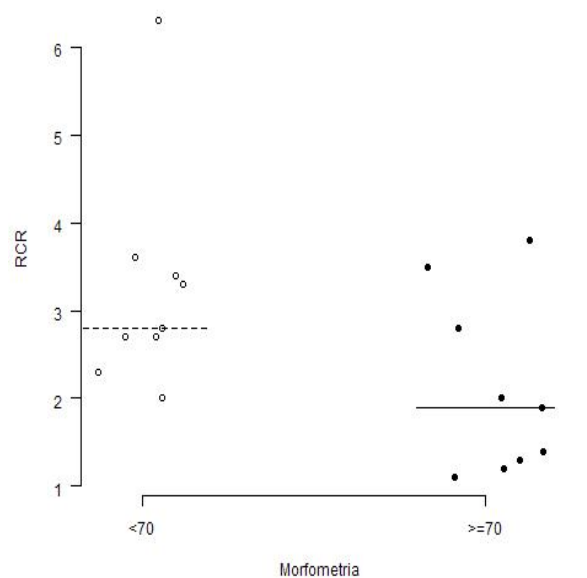
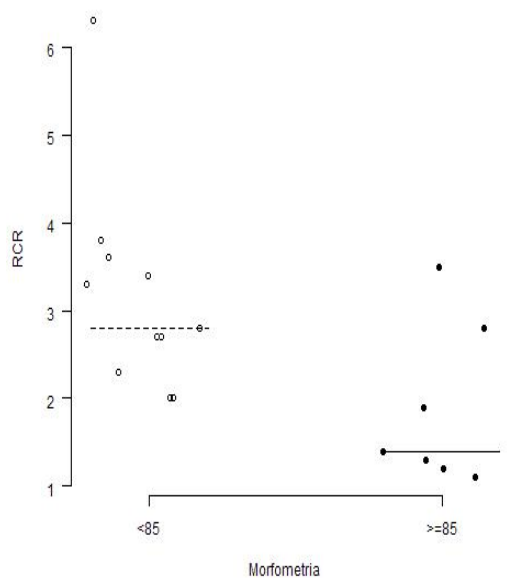


Gráfico 4.26 - Gráfico de dispersão para RCR segundo Morfometria.

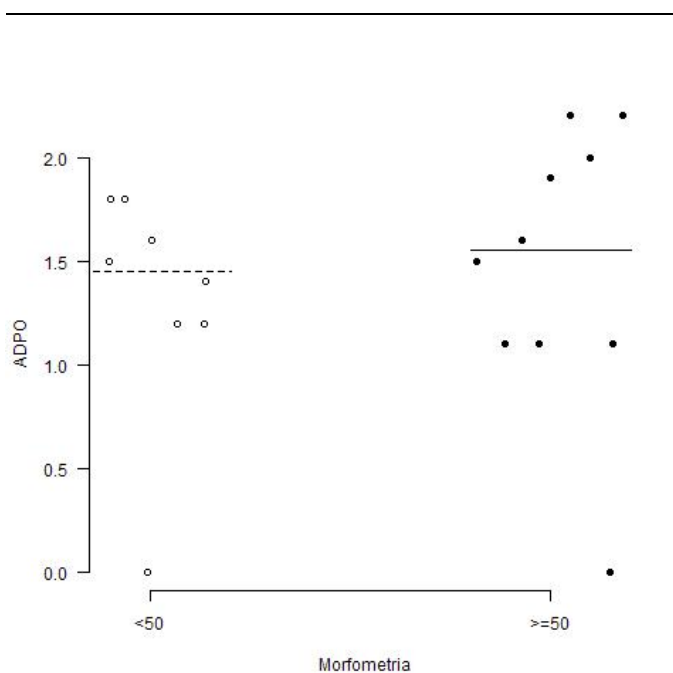
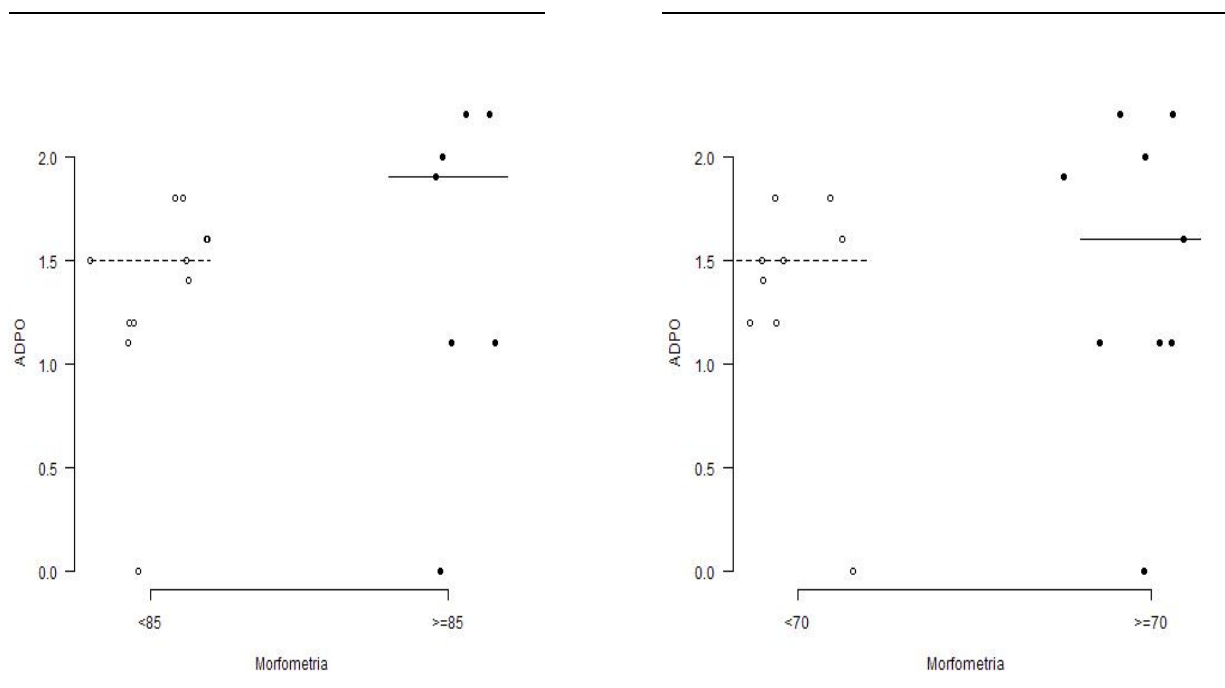


Gráfico 4.27 - Gráfico de dispersão para ADP/O segundo Morfometria.

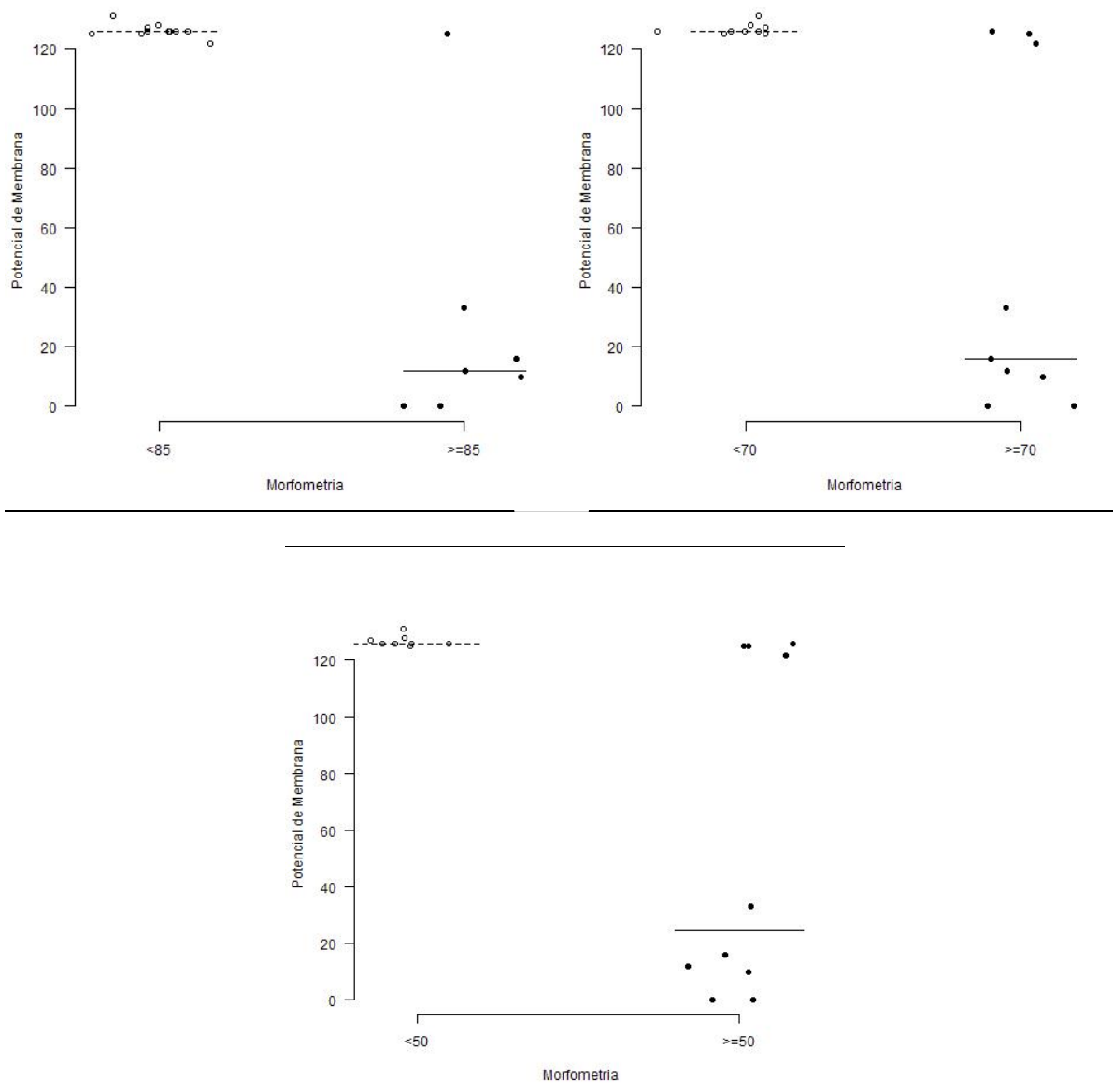


Gráfico 4.27 - Gráfico de dispersão para Potencial de Membrana segundo Morfometria.

Modelo linear de efeitos mistos com comparação das variáveis dependentes (ALT/AST, bilirrubinas e DHL). Foram considerados como efeito aleatório os indivíduos e, como efeitos fixos, o grupo, o tempo e a interação entre eles. Quando foram observadas evidências de significâncias para os fatores ao nível de 0,05 de significância (Tabela 4.15), contrastes ortogonais foram utilizados para verificar quais os pares de médias eram diferentes (Tabelas 4.16 – 4.18).

Tabela 4.15 - Resultados do modelo linear de efeitos mistos para os fatores considerados.

Variável	Corte da Morfometria	Fator	p-valor
DHL (log.)	85	tempo	0,57
		morfometria	0,61
		tempo*morfometria	0,03
	70	tempo	0,34
		morfometria	0,72
		tempo*morfometria	0,14
	50	tempo	0,27
		morfometria	0,78
		tempo*morfometria	0,20
Bilirrubina	85	tempo	0,83
		morfometria	0,17
		tempo*morfometria	0,03
	70	tempo	0,87
		morfometria	0,93
		tempo*morfometria	0,08
	50	tempo	0,83
		morfometria	0,97
		tempo*morfometria	0,40
ALT/AST	85	tempo	<0,01
		morfometria	0,06
		tempo*morfometria	0,054
	70	tempo	<0,01
		morfometria	0,22
		tempo*morfometria	0,18
	50	tempo	<0,01
		morfometria	0,15
		tempo*morfometria	0,26

Tabela 4.16 - Comparações entre grupos fixando o tempo para as variáveis dependentes.

Variável	Tempo	Grupo	Média	D. P.	Grupo	Média	D. P.	p-value
DHL(log.)	1	<85	7,76	0,37	≥85	7,54	0,77	0,48
	2		7,63	0,24		7,33	0,64	0,32
	3		7,06	0,36		7,83	1,20	0,01
Bilirrubina	1	<85	0,35	0,31	≥85	0,31	0,33	0,57
	2		0,25	0,22		0,39	0,17	0,08
	3		0,18	0,10		0,46	0,38	0,04

Tabela 4.17 - Comparações entre tempos fixando o grupo para as variáveis dependentes.

Variável	Grupo	Tempo	Média	D. P.	p-value
DHL (log.)	<85	1	7,76	0,37	0,62
		2	7,63	0,24	0,01
		3	7,06	0,36	0,04
	≥85	1	7,54	0,77	0,52
		2	7,33	0,64	0,39
		3	7,83	1,20	0,14
Bilirrubina	<85	1	0,35	0,31	0,19
		2	0,25	0,22	0,06
		3	0,18	0,10	0,56
	≥85	1	0,31	0,33	0,08
		2	0,39	0,17	0,09
		2	0,46	0,38	0,94

Tabela 4.18 Comparações entre tempos independente de grupo.

Variável	Tempo	Média	D. P.	p-value
ALT/AST	1	0,26	0,10	< 0,01
	2	1,17	1,78	< 0,01
	3	0,76	0,30	0,81

5. Discussão

A EFIL foi comparada, inicialmente, com a morfometria, que avaliou a taxa de necrose, após indução da isquemia e da reperfusão. A morfometria, apesar de ser um procedimento demorado, tem grande sensibilidade e especificidade. Seria esperado que os animais submetidos à isquemia por 2 horas teriam maior acometimento tecidual, com maior área de necrose, o que ocorreu na maior parte dos animais. Entretanto, alguns animais deste grupo não apresentaram a necrose esperada, provavelmente pelo clampeamento insuficiente. O fato é que a EFIL detectou, após a isquemia e 24 horas após a reperfusão, as mesmas alterações detectadas pela morfometria, de modo significativo. Tomando como exemplo o padrão espectral, nas 3 fases, em animais que os resultados foram distintos, por exemplo, animal no.15 com necrose de 98%, na avaliação morfométrica, e animal no.10 com necrose de 0%, pode-se observar que, no animal com maior necrose, surgem diferenças entre o período pré-isquemia e o período 24 horas após a reperfusão, porém não tão evidente quanto a diferença do período pós-isquemia onde a alteração espectral é muito grande em todos os espectros. Quando não há necrose ou a necrose é baixa a alteração espectral não é evidente. Quanto maior a necrose mais o espectro se deforma. A EFIL permitiu avaliar o tecido hepático e, após as leituras espectroscópicas e inserção das leituras nos programas computacionais, com análise de dados multivariados, pode-se dizer se o tecido suportará a isquemia imposta e mesmo após um período de reperfusão, se por rejeição ou outro motivo, ainda continua viável.

Quando foi realizada a análise das componentes principais os pontos relativos ao grau de necrose tecidual se separaram muito bem entre si, portanto foi possível distinguir esses grupos, o que não ocorre com os grupos sem alterações teciduais ou alterações não significativas, onde existe uma sobreposição de pontos que faz com que haja uma incerteza maior nos resultados. A partir dessas regiões definidas podemos determinar uma probabilidade de uma medida realizada em um animal, cujo período de isquemia e evolução para necrose é desconhecido, pertencer a um desses determinados grupos. A idéia se baseia em primeiramente fazer um conjunto de medidas de espectros de fluorescência, que quando representados nessa base já determinada pelo banco de dados, será representado por um ponto. A seguir é realizada uma contagem do total de pontos que incide dentro de uma região qualquer, e posteriormente é calculada a razão entre o número de pontos no interior de cada

região individual e esse número total, fornecendo a proporção de pontos de cada região, que pode ser interpretada como a probabilidade de o animal pertencer a cada um desses grupos.

O resultado pela contagem das variáveis, segundo a morfometria, foi altamente significativo ($p < 0,01$). Apesar disto é necessário avaliar a “força da concordância pelo coeficiente kappa” para cada grupo. Conforme descrito anteriormente, a força de concordância pode ser pobre, desprezível, suave, moderada, substancial ou grande e quase perfeita. No grupo com morfometria com necrose $<50\%$ e $\geq 50\%$ a força da concordância foi substancial no período pós isquemia e moderada no período 24 horas após a reperfusão. Nos grupos com área com necrose $<70\%$ e $\geq 70\%$, nos períodos pós-isquemia e 24 horas pós reperfusão, a força de concordância foi substancial. No grupo com morfometria com área com necrose $<85\%$ e $\geq 85\%$ a força da concordância foi perfeita no período pós-isquemia e quase perfeita no período 24 horas após a reperfusão.

O fato é que nos casos em que é necessário avaliar, o mais precocemente possível, o grau de tecido comprometido pela isquemia, como nos casos de transplante, seja no doador ou após o transplante, como método controle, a espectroscopia de fluorescência induzida por laser com a análise das componentes principais é substancial para áreas de acometimento de necrose de até 70%, considerando 25 a 30% de área viável tolerável para o funcionamento hepático.

A mitocôndria, que é afetada mais precocemente em relação às outras estruturas, com depleção energética, foi avaliada pela análise da Função Mitocondrial e dosagem da AST.

A Função Mitocondrial é um método mais demorado e mais invasivo. Os resultados, pelo teste não-paramétrico para duas amostras independentes de Wilcoxon e com a utilização da versão exata do teste de Wilcoxon, mostraram que existe uma tendência em ser um método analítico adequado (p entre 0,051 e 0,10) para o Estágio 3 nos grupos com avaliação morfométrica para necrose $<50\%$ e $\geq 50\%$ e $<70\%$ e $\geq 70\%$ e para o RCR no grupo com morfometria com necrose $<70\%$ e $\geq 70\%$. É significativo (p entre 0,01 e 0,05) para o Estágio 3 e RCR, no grupo com avaliação morfométrica para necrose $<85\%$ e $\geq 85\%$, e altamente significativo para avaliação pelo Potencial de Membrana nos 3 grupos avaliados.

A AST, que presença citoplasmática e, em menor concentração, na mitocôndria, sendo que sua dosagem sérica, apesar de não ser invasiva, é mais demorada que a EFIL. A ALT é uma enzima específica do fígado, mas tem presença citoplasmática. A relação ALT/AST é altamente significativa, em comparações entre tempos independentes de grupo, no período pós-isquemia. Quando esta relação foi avaliada pelos resultados de modo linear de efeitos

mistos foi altamente significativa em relação ao tempo, para os 3 grupos, e apresentou tendência em significância em relação à morfometria.

A DHL, que catalisa o piruvato, produto da ação da ALT sobre a L-alanina, em L-lactato, necessita de tanto tempo para ser analisada quanto a ALT e a AST. A dosagem da DHL se mostrou significativa, quando comparada entre tempos e fixando o grupo para as variáveis dependentes, nos períodos pós-isquemia e 24 horas pós reperfusão, para o grupo com avaliação morfométrica para necrose $<85\%$ e $\geq 85\%$. Quando comparada entre grupos fixando o tempo para variáveis dependentes teve resultado significativo para o grupo com avaliação morfométrica para necrose $<85\%$ e $\geq 85\%$.

A bilirrubina avalia o hepatócito na conjugação e na excreção e avalia as vias biliares extra-hepáticas na excreção da bile. Considerando os resultados do modelo linear de efeitos mistos, a bilirrubina apresenta resultado significativo para o grupo com avaliação morfométrica para necrose $<85\%$ e $\geq 85\%$, no período pós-isquemia e apresenta tendência em ser eficaz na avaliação no mesmo grupo e no mesmo período. A dosagem da bilirrubina poderia estar mais alterada se o modelo de isquemia hepática utilizado fosse o total. Como o modelo utilizado foi o parcial a dosagem de bilirrubina foi útil para mostrar que a excreção não estava interrompida.

Considerando todos os métodos comparativos é possível dizer que a EFIL é um método rápido, pouco invasivo e potencialmente útil na avaliação da isquemia hepática normotérmica em ratos.

6. Conclusão

A Espectroscopia de Fluorescência Induzida por Laser é um método adequado para o diagnóstico de lesões isquêmicas através da análise dos espectros obtidos dos tecidos, comparados com os espectros obtidos com os parâmetros bioquímicos e com os achados histopatológicos.

7. Referências Bibliográficas

1. DELVA E, CAMUS Y, NORDLINGER B, HANNOUN L, PARC R, DERIAZ H, LIENHART A, UGUET C; *Vascular occlusions for liver resections: operative management and tolerance to hepatic ischemia*; Ann Surg 1989; 209:211-8.
2. HUGUET C, NORDLINGER B, BLOCH P, CONARD J; *Tolerance of the human liver to prolonged normothermic ischemia*; Arch Surg 1978; 113:1448-51.
3. WILHELM MJ, PRATSCHKE J, LASKOWSKI I, TILNEY NL; *Ischemia and Reperfusion Injury*; Transplantation Reviews, Vol 17, No 3 (July), 2003: pp 140-157.
4. LAND W, MESSMER K; *The impact of ischemia/reperfusion injury on specific and non-specific early and late chronic events after organ transplantation*; Transplant Rev 1996, 10:108.
5. MELDRUM DR; *Tumor necrosis factor in the heart*; Am J Physiol 1998, 274:R577.
6. PALLER MS, HOIDAL JR, FERRIS TF; *Oxygen free radical ischemic acute renal failure in the rat*; J Clin Invest 1984, 74:1156.
7. ROSSI F; *The O₂-forming NADPH oxidase of the phagocytes: Nature, mechanisms of activation and function*; Biochim Biophys Acta 1986, 853:65.
8. MIRANDA LCC, VIARO F, CENEVIVA R, ÉVORA PRB; *As bases experimentais da lesão por isquemia e reperfusão do fígado: Revisão*; Acta Cir. Bras. v.19 n.1 São Paulo jan./fev. 2004.
9. MAYEVSKY A, SONN J, LUGER-HAMER M, NAKACHE R; *Real-Time Assessment of Organ Vitality During the Transplantation*; Procedure Transplantation Reviews, Vol 17, No 2 (April), 2003: pp 96-116.
10. FARMER DG, AMERSI F, KUPIEC-WEGLINSKI JW, e COLS.; *Current status of ischemia and reperfusion injury in the liver*; Transplant Rev 14:106, 2000.
11. FONDEVILA C, BUSUTTLIL RW, KUPIEC-WEGLINSKI JW; *Hepatic ischemia/reperfusion injury—a fresh look*; Exp Mol Pathol 74:86, 2003.
12. JASSEM W, ROAKE J; *The molecular and cellular basis of reperfusion injury following organ transplantation*; Transplant Rev 1998, 12:14.
13. DAEMEN J-WHC, DEWIT RJ, HEINEMAN E, e COLS.; *Kidney transplantation from non-heart-beating donors*; Transplant Rev 1995, 9:159.
14. LASKOWSKI IA, PRATSCHKE J, WILHELM MJ, e COLS.; *Non-heart beating kidney donors*; Clin Transplant 1999, 13:281.

15. SANKARANKUTTY, AK; SILVA JÚNIOR, OC ; FERREIRA, J ; SOUZA, MEJ; GOMES, MCJ ; KURACHI, C ; BAGNATO, VS ; *Use of Laser Auto-Fluorescence for Evaluating Liver Grafts*; Laser Physics Letters, v. 11, p. 539-545, 2006.
16. ITO, JA; *Técnicas Espectroscópicas em Biofísica*; Caderno de Física da UEFS, 03 (01): 21-29, 2004.
17. MAYEVSKY A; *Brain NADH redox state monitored in vivo by fiber optic surface fluorometry*; Brain Res 1984, 319:49.
18. MAYEVSKY A, CHANCE B; *Intracellular oxidation-reduction state measured in situ by a multichannel fiber-optic surface fluorometer*; Science 1982, 217:537.
19. CHANCE B, WILLIAMS GR; *Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization*; J Biol Chem 1955, 217:383.
20. TANAKA A, KITAI T, IWATA S, E COLS.; *Delayed oxidation of intramitochondrial pyridine nucleotide oxidoreduction state as compared with tissue oxygenation in human liver transplantation*; Biochim Biophys Acta 1993, 1182:250.
21. KITAI T, TANAKA A, TOKUKA A, e COLS.; *Quantitative detection of hemoglobin saturation in the liver with near-infrared spectroscopy*; Hepatology 1993, 18:926.
22. CROCE AC, FERRIGNO A, VAIRETTI M, e COLS.; *Autofluorescence spectroscopy of rat liver during experimental transplantation procedure. An approach for hepatic metabolism assessment*; Photochem Photobiol Sci 4:583, 2005.
23. CROCE A, BOTTIROLI G; *Autofluorescence spectroscopy of cells and tissues as a tool for biomedical diagnosis*; Laser and Current Optical Techniques in Biology, Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences. Royal Society of Chemistry, Vol. IV. 2004, p 189.
24. CHANCE B, LEGALLAIS V; *Differential microfluorimeter for the localization of reduced pyridine nucleotide in living cells*; Rev Sci Instrum 30:732, 1959.
25. CHANCE B, THORELL B; *Localization and kinetics of reduced pyridine nucleotide in living cells by microfluorometry*; J Biol Chem 234:3044, 1959.
26. CHANCE BNS, WARREN W, YURTSEVER G; *Mitochondrial NADH as the bellwether of tissue O₂ delivery*; Adv Exp Med Biol 566:231, 2005.
27. CROCE AC, FERRIGNO A, VAIRETTI M, e COLS.; *Autofluorescence properties of isolated rat hepatocytes under different metabolic conditions*; Photochem Photobiol Sci 3:920, 2004.

28. OBI-TABOT ET, HANRAHAN LM, CACHECHO R, e COLS.; *Change in hepatocyte NADH fluorescence during prolonged hypoxia*; J Surg Res 6:575, 1993.
29. CASTRO-E-SILVA O, SANKARANKUTTY AK, CORREA RB, FERREIRA J, VOLLET FILHO JD, KURACHI C, BAGNATO VS; *Autofluorescence Spectroscopy in Liver Transplantation: Preliminary Results From a Pilot Clinical Study*; Transplantation Proceedings, 40, 722–725 (2008).
30. SALMON JM, KOHEN E, VIALLET P, HIRSCHEBERG JG, WOUTERS AW, KOHEN C, THORELL B; *Microspectrofluorometric approach to the study of free/bound NAD(P)H ratio as metabolic indicator in various cell types*; Photochem. Photobiol., 1982, 36, 585–593.
31. SCHNECKENBURGER H, WAGNER M, WEBER P, STRAUSS WSL, SAILER R; *Autofluorescence lifetime imaging of cultivated cells using a UV picosecond laser diode*; J. Fluoresc., 2004, 14, 649–654.
32. THORELL B; *Flow-cytometric monitoring of intracellular flavins simultaneously with NAD(P)H levels*; Cytometry, 1983, 4, 61–65.
33. THORNILEY MS, SIMPKIN S, FULLER B, JENABZADEH MZ, GREE CJ; *Monitoring of surface mitochondrial NADH levels as an indication of ischemia during liver isograft transplantation*; Hepatology, 1995, 21, 1602–1609.
34. VOLLMAR B, BURKHARDT M, MINOR T, KLAUKE H, MENDER MD; *High resolution microscopic determination of hepatic NADH fluorescence for in vivo monitoring of tissue oxygenation during hemorrhagic shock and resuscitation*; Microvasc. Res., 1997, 54, 164–173.
35. KLAUKE H, MINOR T, VOLLMAR B, ISSELHARD W, MENDER MD; *Microscopic analysis of NADH fluorescence during aerobic and anaerobic liver preservation conditions: A noninvasive technique for assessment of hepatic metabolism*; Cryobiology, 1998, 36, 108–114.
36. STELTZER H, HIESMAYR M, TUCHY G, e COLS.; *The relation of oxygen delivery to utilization during liver transplantation: Is there a critical value?* Adv Exp Med Biol 1992, 317:503.
37. STELTZER H, HIESMAYR M, TUCHY G, e COLS.; *Anesthesia-relevant changes in metabolic parameters with different circulatory and liver functions*; Anaesthesist 1992, 41:457.

38. STELTZER H, TUCHY G, HIESMAYR M, e COLS.; *Peri-operative liver graft function: monitoring using the relationship between blood glucose and oxygen consumption during anaesthesia*; Anaesthesia 1992, 47:955.
39. TOKUNAGA Y, OZAKI N, WAKASHIRO S, e COLS.; *Fluorometric study for the noninvasive determination of cellular viability in perfused rat liver*; Transplantation 1987, 44:701.
40. OKAMURA R, MURASE N, KIM DG, e COLS.; *Fluorometric study of the viability of rat liver grafts after simple cold storage with UW solution versus Euro-Collins solution*; Transplant Proc 1991, 23:1877.
41. POST S, MENDER MD, RENTSCH M, e COLS.; *The impact of arterializations on hepatic microcirculation and leukocyte accumulation after liver transplantation in the rat*; Transplantation 1992, 54:789.
42. WHEATLEY AM, ZHAO D; *Intraoperative assessment by laser Doppler flowmetry of hepatic perfusion during orthotopic liver transplantation in the rat*; Transplantation 1993, 56: 1315.
43. OHDAN H, SUZUKI S, AMEMIYA H, e COLS.; *Laser-Doppler flowmetry for serial monitoring of graft blood flow after liver transplantation in rats*; Transplantation 1994, 58:969.
44. NAUNDORF M, SCHRAMM W, RUDOLPH B e COLS.; *Measurement of the metabolic state of liver tissue by laser induced surface fluorescence on acute liver ischaemia with radical scavenger protection*; Presented at the International Symposium on Ischemia-Reperfusion Syndrome, Trend and Concepts, Session 5, Liege, Belgium, March 10-11, 1995.
45. OHDAN H, FUKUDA Y, SUZUKI S, e COLS.; *Diagnostic value of near-infrared spectroscopy for monitoring the rejection response following rat liver transplantation*; Transplant Proc 1995, 27:516.
46. THORNILEY MS, FULLER B, SIMPKIN S e COLS.; *Surface fluorescence measurements of liver metabolism during ischaemia and transplantation*; Presented at the International Symposium on Ischemia-Reperfusion Syndrome, Trend and Concepts, Session 8, Liege, Belgium, March 10-11, 1995.
47. THORNILEY MS, LANE N, SIMPKIN S, e COLS.; *Monitoring of mitochondrial NADH levels by surface fluorimetry as an indication of ischaemia during hepatic and renal transplantation*; Adv Exp Med Biol 1996, 388:431.

48. SEEHOFER D, BAATZ H, THIERY J, e COLS.; *Fluorescence videomicroscopic assessment of xenogeneic microcirculation and impact of antibody removal by immunoadsorption*; Transplantation 1997, 63:460.
49. THORNILEY MS, SIMPKIN S, BARNETT NJ, e COLS.; *Applications of NIRS for measurements of tissue oxygenation and haemodynamics during surgery*; Adv Exp Med Biol 1997, 411:481.
50. BARBIRO E, ZUROVSKY Y, MAYEVSKY A; *Real time monitoring of rat liver energy state during ischemia*; Microvasc Res 1998, 56:253.
51. FAN XH, ASAHARA T, MIYATA Y, e COLS.; *Diagnostic value of noninvasive near-infrared spectroscopy to assess liver viability of brain-dead donors*; Transplant Proc 1999, 31:2922.
52. FAN XH, ASAHARA T, OHDAN H, e COLS.; *Nondestructive and real-time evaluation of liver viability in brain dead donor for liver transplantation using near-infrared spectroscopy*; Transpl Int 2000, 13 (Suppl 1):S272.
53. SILVA Jr. OC, ZUCOLOTO S, BEER Jr. A; *Modelos Experimentais de Pesquisa em Cirurgia*; Robe Editorial; 1998.
54. HAGEN TM, YOWE DL, BARTHOLOMEW JC, WEHR CM, DO KL, PARK JY, AMES BN; *Mitochondrial Decay in Hepatocytes from Old Rats: Membrane Potential Declines, Heterogeneity and Oxidants Increase*; Proc Natl Acad Sci; U S A; 1997 Apr; 94(7): 3064-3069.
55. RODRIGUES AJ, SADER AA, VICENTE WVA, BASSETTO S; *Intermittent Anterograde Normothermic Blood Cardioplegia: Experimental Study in Rabbits*; the Heart Surgery Forum; 1999.
56. TEIXEIRA VPA, PEREIRA SAL, RODRIGUES DBR, LINO Jr. RS, OLIVEIRA FA, CASTRO ECC, REIS MA; *Princípios Básicos e Aplicações da Morfometria*; Disciplina de Patologia Geral da UFTM; 2001.
57. GUIRÓ FF, SALAS JV, URBANO C; *The role of SMS 201-995 as an experimental model in the intestinal ischemia-revascularisation syndrome*; Arch Gastroenterohepatol; 2001; 20.
58. FUNES HLX, SILVA RCMA, SILVA RF, LEITE APM, SEGANTINI FL, CALVI S; *Comportamento do Fator de Necrose Tumoral e da Proteína C Reativa em Hepatectomia Simultânea com Colectomia em Ratos*; Rev.Col.Bras.Cir.32(2): 2005; 94-99.

59. NEVES JS, NASCIMENTO JEA, SILVA MHGG, BICUDO AS, NASCIMENTO M, NOCHI Jr. R; *Influência da Glutamina na Mucosa do Intestino Delgado de Ratos Submetidos à Enterectomia Extensa*; Rev.Col.Bras.Cir.30(6): 2005; 406-415.
60. GARCIA JHP, COELHO GR, SOUSA IT, SIQUEIRA RP, VASCONCELOS PRL; *Alterações metabólicas induzidas por isquemia hepática normotérmica experimental e o efeito hepatoprotetor da ciclosporina*; Arq. Gastroenterol. vol.41 no.1 São Paulo Jan./Mar. 2004.
61. ESTRACANHOLLI ES, MENEZES PFC, VICENTE JR, COSTA MM, BAGNATO VS; *Determinação do intervalo pós-morte por espectroscopia de fluorescência*; 2007
62. PEDERSEN PL, GREENAWALT JW, REYNAFARJE B, HULLIHEN J, DECCKER GL, SOPER JW, BUSTAMENTE E; *Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver-derived tissues*; Meth Cell Biol 1978;20: 411-81.
63. VERCESI A, BERNARDES C, HOFFMANN M, GADELHA F, DOCAMPO R; *Digitonin Permeabilization Does Not Affect Mitochondrial Function And Allows The Determination Of The Mitochondrial Membrane Potential Of Trypanosoma Cruzi In Situ*; J. Biol. Chem. 266, 14431 (1991).
64. KARMEN A; *Transaminase Activity in Human Blood*; J Clin Invest 1955; 34:131.
65. HENRY RJ, CHIAMORI N, GOLUB O, BERKMAN S; *IFCC Method for Aspartate Aminotransferase*; Amer J Clin Path 1960; 34:381.
66. FLEISS JL, LEVIN B, PAIK MC; *Statistical Methods for Rates and Proportions*; New York, John Wiley & Sons, 2003.
67. LANDIS RJ, KOCH GG; *The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data*; Biometrics; 33, 159-174, 1977.
68. PAGANO M, GAUVREAU K; *Princípios de Bioestatística*, Editora Thomson, São Paulo, 2004.
69. SAS/STAT® *User's Guide, Version 9*, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1999.
70. SIEGEL SE, CASTELLAN NJ; *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*, 2^a edição; McGraw-Hill College; 1988.
71. R Development Core Team; *R: A language and environment for statistical computing*; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>; 2005.

72. MCLEAN RA, SANDERS WL, STROUP WWA; *Unified Approach to Mixed linear Models*; The American Statistician, v. 45, p. 54-64, 1991.
73. LITTELL RC, MILLIKEN GA, STROUP WW, WOLFINGER RD; *SAS System for Mixed Models*, Cary, NC: SAS Institute Inc, 1996.
74. *SAS/STAT® User's Guide, Version 9*, Cary, NC, USA: SAS Institute Inc., 2002-2003.
75. FUNARO VMBO e COLS.; *Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP*: documento eletrônico e impresso; São Paulo; SIBi-USP; 2004.

8. Abreviaturas

μm - micrometro

μmol - micromole

ADP - adenosina difosfato

ADP/O - quantidade de oxigênio requerida para a fosforilação total de uma quantidade conhecida de ADP

ALT - alanina aminotransferase

AMP - adenosina monofosfato

AST - aspartato aminotransferase

ATP - adenosina trifosfato

Ca⁺⁺ - cálcio

CI - conversão interna

DHL - desidrogenase láctica

dl - decilitro

EFIL - espectroscopia de fluorescência induzida por laser

EGTA - ácido tetra-acético etileno glicol

EU - Solução Eurocollins

g - grama

h - hora

H₂O - água

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

Hb - hemoglobina

HbO₂ - saturação de hemoglobina

Kg - kilograma

KOH - Hidróxido de potássio

l - litro

LDF - Dopler-Fluorimetria por Laser

MDH - malato desidrogenase

mg - miligrama

MgCl₂ - cloreto de magnésio

min - minuto

ml - mililitro

mmol - milimole
mv - milivolt
mW - miliwatt
NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH - NADP reduzido
NaH₂PO₄ - fosfato diácido de sódio
nm - nanômetro
ns - nano-segundo
O₂ - superóxido
°C - graus Celsius
OH - radical livre de oxigênio
PCA - análise das componentes principais
pH - potencial hidrogeniônico; indicador de solução ácido-base
PO₂ - pressão de oxigênio
ps - pico-segundo
RCR - Taxa de Controle Respiratório
rpm - rotações por minuto
TBF - Fluxo sanguíneo tecidual
u.a. - unidade arbitrária
UV - luz ultravioleta
UW - Solução de Wisconsin