

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E ANATOMIA

APLICABILIDADE DA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA
INDUZIDA POR LASER NA AVALIAÇÃO DE
ENXERTOS HEPÁTICOS HUMANOS

RODRIGO BORGES CORREA

RIBEIRÃO PRETO
- 2010 -

Correa, Rodrigo Borges

Aplicabilidade da fluorescência induzida por laser na avaliação dos enxertos hepáticos humanos. Ribeirão Preto, 2010.

73 p. il; 30 cm

Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Medicina – Área de Concentração: Clínica Cirúrgica Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, 2010.

Orientador: Prof.Dr. Orlando de Castro e Silva Júnior

1. Laser, 2. Transplante hepático, 3. Fluorescência
4. Espectroscopia

Trabalho apresentado à Área de Clínica Cirúrgica do Depto. de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do **Título de Doutor.**

“Diz-se que, mesmo antes de um rio cair no oceano, ele treme de medo. Olha pra trás, para toda a jornada: os cumes, as montanhas, o longo caminho sinuoso através das florestas, através dos povoados e vê à gente um oceano tão vasto que entrar nele nada mais é que desaparecer para sempre. Porém, não há outra maneira. O rio não pode voltar. Ninguém pode voltar. Voltar é impossível na existência. Você pode apenas ir em frente. O rio precisa se arriscar e entrar no oceano. E, somente quando ele entra no oceano, é que o medo desaparece porque só então o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano, mas tornar-se oceano”.

Autor desconhecido

Aos meus pais, Antônio e Leda,
exemplo de luta, amor e sabedoria.

À minha esposa, Maria Carolina,
dedico meu sucesso, minha força interior,
e minha vida, por seu amor incondicional.

À minha filha, Letícia,
o grande sonho de minha vida.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Ao Prof.Dr. Orlando de Castro e Silva Júnior, pesquisador visionário,
sábio mestre, que me impressiona e me inspira com suas qualidades
de perseverança, caráter e humildade.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de externar minha gratidão e meu carinho às pessoas que participaram de diferentes momentos durante a realização desse trabalho, que hoje concluo com muita satisfação.

Anderson Mateus Santos

Clarice Fleury Fina Franco

Elis Regina Alves

Jose Dirceu Vollet Filho

Juliana Ferreira

Laura e Márcia (Patologia)

Lizandra Ohata

Luciana Da Costa Ziviani

Márcia Aparecida Baratella Fonseca

Maria Aparecida Neves Cardoso Piccinato

Maria Cecília Jordani Gomes

Maria Eliza Jordani de Souza

Marlene Lúcio

Renata Faria

Tania Beatriz Chiari

e

Aos meus irmãos, Christiano e Antonio Augusto

Agradecimento aos Doadores Anônimos

Não chamem o meu falecimento de leito de morte,
mas de leito de vida.

Dêem minha visão ao homem que jamais viu o sol,
o rosto de uma criança ou o amor nos olhos de uma mulher.

Dêem meu coração a uma pessoa cujo coração apenas
experimentou dias infundáveis de dor.

Dêem meu sangue ao jovem que foi retirado dos destroços
de seu carro, para que ele possa viver para ver seus netos
brincarem.

Dêem meus rins às pessoas que precisam de uma máquina
para viver de semana em semana.

Retirem meus ossos, cada músculo,
cada fibra e nervo do meu corpo e encontrem um meio
para fazer uma criança inválida andar.

Explore cada canto do meu cérebro.

Retirem minhas células, se necessário,
e deixem-nas crescerem para que, um dia,
um menino mudo possa gritar em um momento de felicidade
ou uma menina surda possa ouvir o barulho da chuva
de encontro à sua janela.

Queimem o que restar de mim e espalhem as cinzas ao vento,
para ajudarem as flores brotarem.

Se tiverem que enterrar algo, que sejam meus erros,
minhas fraquezas e todo mal que fiz aos meus semelhantes.

Dêem meus pecados ao diabo.

Dêem minha alma a Deus.

Se, por acaso, desejarem lembrar-se de mim,
façam-no com ação ou palavra amiga a alguém
que precise de vocês.

Se fizerem tudo o que pedi, estarei vivo para sempre ...

RESUMO

CORREA, R. B. **Aplicabilidade da fluorescência induzida por laser na avaliação dos enxertos hepáticos humanos.** 2010. 73p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

A avaliação da função do enxerto nas várias etapas do transplante é importante, particularmente no momento da captação, quando a decisão deve ser feita rapidamente na utilização do órgão. A espectroscopia de autofluorescência é uma técnica não invasiva utilizada para monitorar as condições metabólicas do fígado durante a realização do transplante, na avaliação inicial no doador, na isquemia fria durante o transporte e na reperfusão e reoxigenação no receptor. Resultados são apresentados em 31 transplantes desde a captação até o implante. O espectro de fluorescência induzida pelo laser na excitação de 532 nm foi investigada antes da perfusão fria (autofluorescência), após a perfusão fria, no *back-table*, e após 5 minutos e 1 hora após a reperfusão. Os resultados mostraram que a análise da fluorescência apresentou sensibilidade para detectar as mudanças no órgão durante todo o procedimento do transplante. A espectroscopia de autofluorescência tem o potencial de fornecer informações sobre o enxerto em tempo real, sendo uma técnica não invasiva para monitorar a função do enxerto hepático. Essas informações podem ser potencialmente valiosas nas decisões cirúrgicas e no sucesso do transplante.

Palavras-chave: Laser, Transplante hepático, Fluorescência, Espectroscopia

ABSTRACT

CORREA, R. B. **Applicability of laser-induced fluorescence to the assessment of human liver grafts.** 2010. 73p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

The assessment of graft function in the various stages of transplant is important, especially at the time of retrieval when a rapid decision must be made to use the organ. Autofluorescence spectroscopy is a noninvasive technique used to monitor the metabolic conditions of the liver during the transplant procedure, at the time of initial donor assessment, in cold ischemia during transportation, and during reperfusion and reoxygenation in the recipient. The results of 31 transplants from retrieval to implantation are reported. The spectrum of laser-induced fluorescence at 532 nm excitation was investigated before cold perfusion (time 1 – T1), after cold perfusion (T-2), on the back-table (T-3), and 5 minutes (T-4) and 1 hour (T-5) after reperfusion. Analysis of the results showed that fluorescence was sensitive in detecting the changes occurring in the organ throughout the transplant procedure. Autofluorescence spectroscopy had the potential to provide information about the graft in real time, representing a noninvasive technique for the monitoring of liver graft function. This information is potentially valuable for surgical decisions and for a successful transplant.

Key words: Laser, Liver transplantation, Fluorescence, Spectroscopy

ABREVIATURAS

| | |
|----------------------|---|
| AST | Aspartato aminotransferase |
| ALT | Alanina aminotransferase |
| ATP | Adenosina 5' trifosfato |
| AgHBS + | Antígeno da hepatite B |
| Anti-HCV | Anticorpo contra hepatite C |
| Bb | Bilirrubinas |
| BbD | Bilirrubina direta |
| CI | Conversão interna |
| DHL | Desidrogenase láctica |
| ET | Endotelinas |
| EV | Endovenoso |
| F | Fluorescência |
| FIL | Fluorescência induzida por laser |
| FMRP-USP | Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade São Paulo |
| Fr | French |
| HC-RP | Hospital Clínicas de Ribeirão Preto |
| HIV | Vírus da síndrome imunodeficiência humana |
| IL-1 | Interleucina 1 |
| IMC | Índice massa corporal |
| INR | International Normalized Ratio |
| I/R | Isquemia/reperfusão |
| KC | Célula de Kuppfer |
| mw | Megawatt |
| mg/dl | Miligrama por decilitro |
| MELD | Model for End-Stage Liver Diseases |
| mEq/L | Miliequivalente por litro |
| Na + | Sódio |
| Na+/K+ ATPase | Bomba de sódio e potássio |
| nm | Nanômetro |
| NO | Óxido nítrico |

| | |
|--------------------------------|--------------------------------------|
| ns | Nanossegundos |
| os | Picossegundos |
| O2 | Oxigênio |
| PAF | Polineuropatia Amilóidótica Familiar |
| PAS | Pressão arterial sistólica |
| PMN | Polimorfonucleares |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio |
| SEC | Célula endotelial sinusoidal |
| So | Estado fundamental |
| S2 | Estado excitado |
| TH | Transplante hepático |
| TIF | Tempo isquemia fria |
| TIN | Tempo isquemia normotérmica |
| TIQ | Tempo isquemia quente |
| TNF-α | Fator necrose tumoral alfa |
| UA | Unidade arbitrária |
| UTI | Unidade terapia intensiva |
| UW | Solução Belzer |
| U/L | Unidade por litro |
| Um | Micrômetro |
| VHB | Vírus da hepatite B |
| VO | Via oral |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. ASPECTOS HISTÓRICOS DO TRANSPLANTE DE FÍGADO..... | 2 |
| 1.2. FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER E TRANSPLANTE DE FÍGADO | 3 |
| 1.2.1. Introdução | 3 |
| 1.2.2. Autofluorescência tecidual..... | 4 |
| 1.2.3. Princípios básicos | 5 |
| 1.2.4. Princípios de detecção ótica..... | 6 |
| 1.3. LESÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO DO FÍGADO..... | 9 |
| 1.3.1. Introdução | 9 |
| 1.3.2. Falência da microcirculação na injúria de I/R | 11 |
| 1.4. ESTEATOSE HEPÁTICA E FALÊNCIA DO ENXERTO | 13 |
| 1.5. O DOADOR MARGINAL | 14 |
| 2. OBJETIVO | 16 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 18 |
| 3.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS..... | 19 |
| 3.2. INCLUSÃO DO PACIENTE | 19 |
| 3.3. INDICAÇÃO DO TRANSPLANTE..... | 19 |
| 3.4. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO | 22 |
| 3.5. FASES DO TRANSPLANTE..... | 23 |
| 3.5.1. Do doador..... | 23 |
| 3.5.2. Do receptor..... | 24 |
| 3.6. DELINEAMENTO DO TRABALHO | 26 |
| 3.7. DOSAGENS BIOQUÍMICAS..... | 28 |
| 3.8. ANÁLISE HISTOLÓGICA | 28 |
| 3.9. ANÁLISE ÓTICA | 29 |
| 3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 30 |
| 4. RESULTADOS | 31 |
| 5. DISCUSSÃO | 53 |
| 6. CONCLUSÃO | 64 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 66 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS HISTÓRICOS DO TRANSPLANTE DE FÍGADO

Entre os notáveis avanços do século passado, inclui-se a possibilidade de tratamento da falência de alguns órgãos pela sua substituição, o transplante. Apesar das tentativas anteriores de transplante de tecidos, a era moderna de estudos científicos na área iniciou-se no começo do século passado com o autotransplante bem-sucedido de rim, em 1902, por Emerich Ullmann. Alexis Carrel, pouco tempo depois, verificou que auto-enxertos de rins, em cães, permaneciam sem problemas por tempo indeterminado. Por outro lado, aloenxertos renais rapidamente param de funcionar (apud TURKA, 2001). Somente com a compressão das funções do sistema imune e o desenvolvimento dos medicamentos imunossuppressores modernos é que se chegou ao estado atual de transplante de órgãos.

O primeiro transplante de fígado foi experimentalmente realizado por Welch, em 1955 com Welch, e sua aplicação clínica deu-se em 1963 com Starzl em Denver nos Estados Unidos, mas com resultados insatisfatórios. Só em 1967, Starzl realizou o primeiro transplante clínico com sucesso em uma criança, que morreu aproximadamente doze meses após o transplante, de recidiva tumoral (STARZL, 1988). No Brasil o 1º transplante de fígado foi realizado em 1968, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela equipe do Prof. Marcel Cerqueira César Machado, mas à semelhança do que ocorrera com Starzl, em sua primeira série, em 1963, os pacientes morreram no pós-operatório imediato, com alterações hidroeletrólíticas e hiperosmolares mal compreendidas na época.

Em 1978, ocorreu um fato importante para o desenvolvimento dos programas de transplantes, que foi o aparecimento de uma nova droga imunossupressora, a ciclosporina.

Outro marco no desenvolvimento do transplante de fígado ocorreu em 1983, quando o Ministério da Saúde dos Estados Unidos promoveu uma reunião em Washington, envolvendo especialistas de diversas áreas, onde definiram-se as principais indicações, contra-indicações, as necessidades institucionais e, mais do que isso, talvez o aspecto mais importante do encontro, o posicionamento de que o transplante de fígado deixava de ser um procedimento experimental para ser um procedimento terapêutico (National Institutes of Health, 1984).

O primeiro transplante bem sucedido da América latina, com sobrevida a longo prazo, ocorreu apenas em 1985, no mesmo Hospital, realizado pelo Prof. Silvano Raia e sua equipe (MIES, 1998).

Outro evento importante na história do transplante de fígado ocorreu em Pittsburg, em setembro de 1987. Nessa época, realizou-se um simpósio internacional para homenagear Starzl pelos seus 25 anos de dedicação aos transplantes. Nesse simpósio, Folker Belzer, da Universidade de Wisconsin, apresentou uma nova solução de preservação de órgãos, chamada de solução de UW-Belzer, posteriormente comercializada sob o nome de Viaspan. Essa solução permite preservar o fígado por um tempo muito maior que as soluções anteriores. Com o tempo de isquemia fria de até 24 horas, o transplante de fígado passou a ser realizado de forma semi-eletiva, facilitando enormemente a logística do procedimento e a programação do centro cirúrgico (JAMIESON, 1987).

No Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), o Prof. Orlando de Castro e Silva e equipe realizaram o primeiro transplante de fígado no dia dois de maio de 2001, consolidando o programa de transplante hepático no interior do estado de São Paulo (CASTRO E SILVA, 2001).

O transplante hepático tornou-se, definitivamente, a terapia de escolha para os pacientes portadores de doença hepática crônica ou aguda, nos quais os tratamentos conservadores não se mostraram efetivos. Objetiva-se assim, a melhora da sobrevida bem como da qualidade de vida dos pacientes.

1.2. FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER E TRANSPLANTE DE FÍGADO

1.2.1. Introdução

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 comparadas com técnicas de imagem baseadas na radiação ionizante ou técnicas de ressonância magnética, o diagnóstico por fluorescência é uma técnica de inspeção da superfície, uma vez que a luz de excitação da fluorescência penetra apenas nas camadas superficiais dos tecidos biológicos. Sistemas que conseguem imagens a partir das superfícies teciduais são importantes, do ponto de

vista diagnóstico, por permitirem analisar grandes áreas sem remover tecidos. Outra vantagem das técnicas ópticas é a possibilidade de resposta rápida, a informação é coletada *in situ*. O diagnóstico histopatológico das biópsias não pode ser realizado localmente, estando a resposta, dependente do processamento do tecido removido, da sua fixação, desidratação e coloração, podendo o resultado demorar alguns dias. A base comum de todas as técnicas ópticas é que alterações fisiológicas, morfológicas ou mesmo bioquímicas, associadas às lesões, afetam a interação da luz com o tecido e conseqüentemente a fluorescência emitida. Portanto o aspecto-chave é encontrar os padrões de sinais ópticos característicos para cada situação clínica. Esses métodos têm sido desenvolvidos principalmente na área de oncologia, onde o diagnóstico precoce é essencial para um bom prognóstico do paciente, mas sua aplicação tem sido ampliada para outras áreas (CHEONG, PRAHL, WELCH, 1990).

O fenômeno da fluorescência foi descoberto por Stokes, em 1852, quando notou esse tipo de emissão de fluoreto. Ele verificou que, quando iluminadas com luz ultravioleta (UV), as amostras de fluoreto emitiam radiação em comprimentos de onda 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 com a coloração da luz emitida (WANG, 1999).

1.2.2. Autofluorescência tecidual

Os tecidos biológicos são compostos por diversas biomoléculas e estruturas que interagem com os fótons (cromóforos), dependendo do tipo de interação observada, elas podem ser denominadas como absorvedores (grupos químicos que absorvem a luz e não produzem fluorescência), espalhadores (estruturas que alteram a direção do fóton incidente, mas conservam sua energia) e fluoróforos (grupos químicos que podem converter a luz absorvida em fluorescência). As propriedades ópticas de cada cromóforo dependerão do comprimento de onda de excitação e do tipo de tecido, uma vez que a maioria dos cromóforos é sensível ao ambiente em que se encontra e, em particular, ao estado metabólico tecidual (RAMANUJAM et al, 2000; GEORGAKOUDI et al, 2003; Da COSTA et al, 2003). O espalhamento da luz nos sistemas biológicos é em decorrência das heterogeneidades dos índices de refração das estruturas celulares e teciduais. A autofluorescência tecidual, a fluorescência decorrente dos fluoróforos

endógenos, é alterada por fenômenos de absorção e espalhamento que ocorrem antes da coleta (medida). Os principais fluoróforos envolvidos na fotodeteção estão presentes em células ou na matriz tecidual como colágeno, elastina, queratina, NADH e porfirinas (RAMANUJAM, 2000). Modificações teciduais decorrentes do desenvolvimento de patologias, como processo inflamatório, alteração metabólica, mudanças bioquímicas e estruturais induzirão alterações das quantidades totais e relativas dos fluoróforos, absorvedores e espalhadores, modificando o comportamento da interação luz/ tecido normal.

A discriminação tecidual a ser alcançada dependerá das alterações associadas à patologia investigada e pode ser realizada em três níveis: molecular, celular e tecidual.

1.2.3. Princípios básicos

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 suas posições relativas no movimento vibracional. Isso leva a uma excitação que não necessariamente é o menor nível vibracional no estado excitado, mas frequentemente um nível maior. Uma vez que os estados excitados são instáveis, a molécula tende a perder o excesso de energia e a 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 um picossegundo (ps). A energia perdida nesse relaxamento pode ser absorvida pelas moléculas vizinhas e convertidas 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 tende a retornar para o estado fundamental e esse processo pode ocasionar a emissão de fótons. Esse processo chama-se fluorescência e a luz emitida, quando comparada à luz de excitação, se move em direção ao espectro vermelho (conhecido como deslocamento de Stokes), devido à energia perdida pela CI (Figura 1) (REDMOND, 2003). O tempo de fluorescência é da ordem de nanossegundos (ns) (KLINTERBERG, 1999; WANG, 1999).

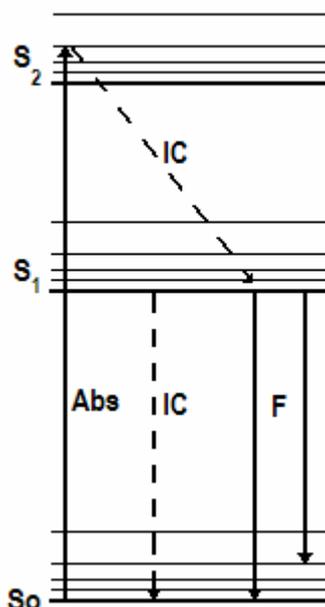


Figura 1: Diagrama de Jablonski, representando esquematicamente a transição de uma molécula do estado fundamental (S_0) para um estado excitado (S_2) e o retorno para o estado fundamental por fluorescência (F) ou conversão interna (CI).

1.2.4. Princípios de detecção ótica

A detecção ótica foi chamada por vários autores como “biópsia ótica” na hipótese de substituição da biópsia convencional e histopatologia por métodos óticos. Basicamente, a avaliação é feita iluminando e coletando a luz re-emitida pelo tecido alvo. A informação coletada através das técnicas óticas será decorrente da resposta de um tecido biológico após as interações com uma luz incidente. Tipos distintos de interação resultam em técnicas diferentes de investigação. A forma dominante de interação luz/tecido biológico é o retro-espelhamento elástico, ou seja, a luz reemitida pelo tecido e coletada para análise, apresenta comprimento de onda semelhante ao da luz incidente (excitação). Esse tipo de medida traz informação das características de absorção e espalhamento do tecido alvo. Existem diversos componentes biológicos que são absorvedores e/ou espalhadores. Cada biomolécula, em função de sua estrutura química, absorve fótons de determinados comprimentos de onda. Ao utilizar uma luz incidente correspondendo a uma das bandas de absorção de uma biomolécula, é possível identificá-la por ausência de luz re-emitida na área iluminada. Em uma imagem, por exemplo, áreas com alta absorção poderão ser identificadas como regiões escuras. Nos tecidos existem também biomoléculas que funcionam como centros

espalhadores de luz; o caminho dos fótons é alterado, a direção de propagação é modificada, mas o fóton não é absorvido. Maior espalhamento difuso resulta em uma menor quantidade de luz coletada em uma única direção e assim pode levar à determinação de uma maior quantidade relativa de estruturas espalhadoras.

Quando um tecido é iluminado, parte da luz é refletida pela superfície (reflexão especular), parte é espalhada no interior do tecido (espalhamento difuso), parte transmitida (os fótons não têm seu caminho alterado), e parte é absorvida (absorção). Parte da luz espalhada e da fluorescência podem ser re-emitidas e coletadas na superfície do tecido.

A fluorescência é um tipo de interação que pode ser observada. Basicamente, a energia luminosa absorvida excita as biomoléculas que passam a um estado energético maior. A tendência da biomolécula é retornar ao estado fundamental, ou seja, de menor energia. A liberação desse excesso de energia pode ocorrer por fenômenos de vibração (não-radioativo), mas também resultar na emissão de fótons, isto é, fluorescência. As biomoléculas que emitem fluorescência são denominadas fluoróforos, e apresentam bandas de emissão características em função do comprimento de onda empregado na excitação, possibilitando a sua discriminação óptica. Um mesmo componente biológico pode funcionar como absorvedor/fluoróforo ou espalhador dependendo do comprimento de onda empregado para a excitação.

Os tecidos biológicos são opticamente turvos, os fenômenos de espalhamento e absorção têm maior probabilidade de ocorrer do que a conversão em fluorescência. Uma luz monocromática incidente na superfície do tecido será espalhada intersticialmente, podendo ser absorvida ou difusamente espalhada. A luz absorvida pode ser convertida para fluorescência, que por sua vez será espalhada e poderá ser reabsorvida ou sair pela superfície do tecido. A fluorescência re-emitida detectada na superfície tecidual é resultado da contribuição não apenas dos fluoróforos, mas também dos absorvedores e espalhadores teciduais (GEORGAKOUDI et al , 2003; RICHARDS-KORTUM et al, 2003). A complexidade e variabilidade das estruturas celulares e dos componentes teciduais fazem com que seja muito difícil prever o comportamento da luz no interior dos tecidos biológicos, e conseqüentemente da fluorescência produzida (GEORGAKOUDI et al , 2003).

Para a excitação do tecido usualmente são empregados fontes de luz com banda de emissão bastante estreita, como no caso das lâmpadas de xenônio e mercúrio, ou sistema laser. A monocromaticidade possibilita uma maior seletividade

na excitação dos fluoróforos, absorvedores e/ou espalhadores, tornando o processo mais eficiente e, portanto, mais evidente a sua identificação. A região mais usada para excitação de tecidos biológicos é a região ultravioleta do espectro eletromagnético, com fótons de alta energia e com alta absorção pelos tecidos biológicos. A região inicial do espectro visível - violeta, azul e verde – também pode ser empregada com ligeiro aumento do volume tecidual excitado uma vez que a profundidade de penetração no tecido biológico é comparativamente maior. Dependendo da luz de excitação empregada, a absorção pelos componentes teciduais será diferente e, conseqüentemente, haverá contribuição de biomoléculas distintas para a luz coletada.

Equipamentos usados para a 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 de coloração 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 intensidade da fluorescência, o espectro ou o tempo de vida. Geralmente apenas uma pequena área (habitualmente 1 mm²) é investigada por vez; no entanto, pode-se coletar informações de diversos pontos, analisando assim, uma grande área da lesão. A espectroscopia de fluorescência oferece muita informação sobre uma pequena área. Para investigar áreas maiores de relevância clínica, sem fazer uma amostragem aleatória, é necessária uma técnica de imagem (KURACHI, 2005; LANE et al, 2006). A fluorescência permite análise detalhada da luz emitida, com a obtenção da intensidade para cada comprimento de onda e, neste caso, a investigação é por ponto analisado. Usualmente, um sistema composto por um laser de excitação, uma sonda de investigação para a entrega e coleta da luz e um espectrofotômetro são utilizados. No caso da avaliação dos tecidos biológicos, o intervalo de leitura espectral é basicamente na região do visível. A avaliação clínica é realizada posicionando a sonda de investigação em contato com a superfície do tecido. A sonda possui uma fibra óptica conduzindo a luz de excitação e uma ou mais fibras de leitura que coletam a luz re-emitada pelo tecido e conduzem para o espectrofotômetro. O espectrofotômetro é um equipamento que possibilita a quantificação da intensidade luminosa em cada comprimento de onda. Usualmente a luz de excitação é um laser, devido ao acoplamento óptico e monocromaticidade.

O estabelecimento dos parâmetros ópticos de leitura, como o melhor comprimento de onda de excitação, e das assinaturas espectrais de cada tipo de lesão deve ser realizado. A partir disso, estudos clínicos são necessários para a determinação dos índices de sensibilidade e especificidade da técnica, comprovando ou não sua eficácia como método de diagnóstico.

1.3. LESÃO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO DO FÍGADO

1.3.1. Introdução

A perfusão do sangue em um fígado previamente isquêmico induz à lesão tecidual grave, a qual é chamada de injúria de isquemia e reperfusão (SERRACINO-INGLOTT et al, 2001). A privação de oxigênio para o fígado durante a isquemia induz lesões graves, mas as lesões mais graves são encontradas após a reperfusão, quando a entrada de oxigênio nos tecidos é restaurada (GLANTZONIUS et al, 2005). A isquemia-reperfusão (I/R) causa a indução de múltiplos processos inflamatórios locais e sistêmicos que definem a complexa fisiopatologia da injúria I/R. Essa injúria é caracterizada por vasoconstricção sinusoidal, acúmulo de neutrófilos, agregação plaquetária e alterações na permeabilidade capilar levando a uma progressiva reação inflamatória com importantes alterações na microcirculação que poderão levar a morte celular difusa e conseqüente falência do enxerto (SERRACINO-INGLOTT et al, 2001). A progressão da injúria I/R depende primariamente da presença de alterações parenquimatosas pré-existentes, entre as quais esteatose e fibrose hepáticas, bem como a duração do tempo de isquemia (ISOZAKLet al, 1995). Quando o aporte de oxigênio aos hepatócitos torna-se insuficiente como resultado da redução ou ausência do fluxo de sangue, ocorre a inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial com a subseqüente redução na síntese de adenosina trifosfato (ATP). A depleção de estoques celulares de ATP induz a alterações no transporte iônico transmembrana pela inibição da Na^+/K^+ ATPase dependente de ATP, causando mudanças no influxo de sódio e cloro, acúmulo de sódio intracelular, alterações secundárias na homeostase do cálcio e, particularmente, inchaço e morte celular (BELZER et al, 1988). A injúria hepática pode ser dividida em quente (normotérmica), fria (hipotérmica) e reaquecimento (durante o período de implantação do enxerto) (SELZNER et al, 2003). Embora o mecanismo básico dessas categorias de injúria de isquemia seja similar em todos os casos,

diferenças significativas entre elas podem ser observadas. O principal local onde a isquemia fria ocorre são nas células não parenquimatosas, que compreende as células endoteliais sinusoidais (SEC), células de Kupffer (KC), células estreladas e células biliares epiteliais, e a isquemia quente ocorre nos hepatócitos (IKEDA et al, 1992). O período da isquemia de reaquecimento envolve preferencialmente os hepatócitos. A isquemia fria é associada com a redução da fosforilação oxidativa, baixos níveis de ATP celular, aumento da glicogenólise, enquanto a isquemia quente leva a uma grande disfunção mitocondrial e stresse oxidativo (MOCHIDA et al, 1994). Embora, o insulto isquêmico direto determine um dano significativo às células do fígado, a lesão tecidual originada durante a reperfusão é muito mais grave. Uma intensa resposta inflamatória se inicia prontamente após a restauração do fluxo sanguíneo, tendo sido reconhecida como o mecanismo chave da injúria hepática de reperfusão (JAESCHKE et al, 2003). Estudos com modelos experimentais de injúria I/R têm mostrado evidências da deficiência da perfusão na microcirculação hepática, da ativação das KC, neutrófilos, SEC, linfócitos T CD4+ e a subsequente geração de espécies reativas de O₂ (ROS), citocinas e fatores quimiotáticos como sendo os episódios mais importantes na patogênese da injúria I/R (JAESCHKE et al, 2003). A ativação das KC tem sido considerada o evento central na fisiopatologia da injúria I/R precoce, levando a geração de ROS e outros mediadores inflamatórios, entre os quais, citocinas (TNF- α , IL-1) e mediadores vasoativos (óxido nítrico, endotelinas) (JAESCHKE et al, 2003). Durante as primeiras horas de reperfusão, ROS são gerados por KC, os quais podem agir diretamente como citotoxinas para hepatócitos e SEC, contribuindo para o progresso da injúria hepática. Outras fontes adicionais de ROS são as mitocôndrias hepáticas e o sistema xantina/xantina oxidase (JAESCHKE et al, 2003) (Figura 2).

INJÚRIA DA ISQUEMIA E REPERFUSÃO NO FÍGADO

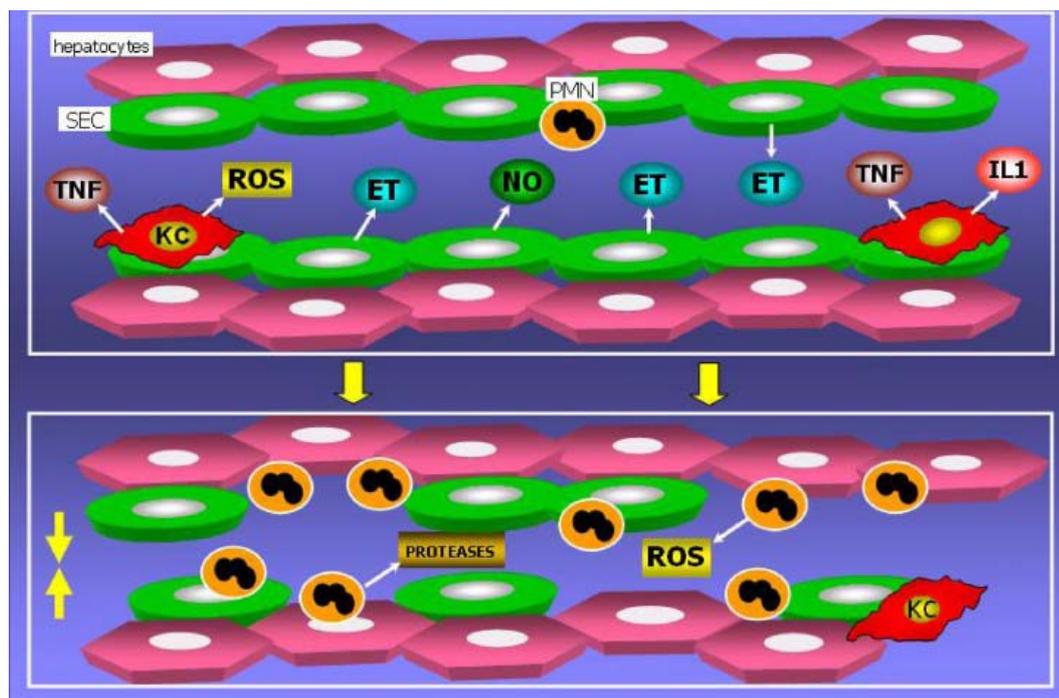


Figura 2: I/R ativam KC, as quais podem gerar ROS e citocinas (TNF- α e IL-1). O imbalance entre endotelinas (ET) e óxido nítrico (NO) produzidos pelas SEC causam vasoconstrição ativa, estreitamento do lúmen sinusoidal e subsequente falência da microcirculação. TNF- α e IL-1 promovem a ativação de neutrófilos (PMN), recrutamento e migração transendotelial que culminará na injúria das SEC e hepatócitos induzida por PMNs, através da liberação de ROS e proteases. Estreitamento sinusoidal também contribui para o acúmulo de PMNs no fígado (JAESCHKE, 2003).

1.3.2. Falência da microcirculação na injúria de I/R

Microcirculação hepática compreende um único sistema de capilares, chamados sinusóides, os quais são revestidos por um particular endotélio fenestrado com alta permeabilidade que permite contato máximo entre hepatócitos e sangue (McCUSKEY et al, 2000). O distúrbio na microcirculação é o evento principal da injúria I/R (CLEMENS and ZHANG, 1999). É bem estabelecido que a severidade das desordens na microcirculação esteja fortemente correlacionada à amplitude da injúria I/R (VOLLMAR et al, 1994). Na fase precoce da reperfusão (2 horas após a restauração do fluxo sanguíneo), a quebra do transporte ativo de íons transmembrana secundário à deficiência de energia induzida pela isquemia, resulta em vacuolização e inchaço das SEC, bem como estreitamento do lúmen sinusoidal, sendo os fatores iniciais responsáveis pela ocorrência das desordens na microcirculação durante a reperfusão. (VOLLMAR et al, 1994). Em adição à formação do edema intracelular, tem sido

evidenciado o alargamento do espaço perisinusoidal Disse's, acúmulo microvascular de neutrófilos, hemoconcentração intravascular, decréscimo da velocidade dos eritrócitos e extravazamento de células sanguíneas vermelhas devido à perda da integridade endotelial. (VOLLMAR et al, 1994). Entretanto, alterações como a vasoconstrição capilar, secundária ao imbalance entre ET e níveis baixos de NO, são o fator de maior contribuição para a deteriorização da microcirculação durante o período de reperfusão (McCUSKEY et al, 1996). A vasoconstrição ativa, induz a uma exclusão progressiva de sinusóides da perfusão, contribuindo para uma piora local do fluxo sanguíneo e do suprimento de oxigênio. Certamente, este fato contribui para o prolongamento do período de hipóxia nos lóbulos hepáticos, exarcebando então a injúria isquêmica tecidual (CLEMENS and ZHANG, 1999; VOLLMAR et al, 1994). Em adição, os distúrbios na microcirculação, podem ser causados pela ativação da cascata de coagulação e deposição de fibrina durante a reperfusão (ARAI et al, 1996). Embora o dano isquêmico celular seja mais pronunciado na zona acinar pericentral (zona 3), depois da reperfusão, a falha mais proeminente da perfusão sinusoidal foi observada na zona periportal (zona 1) (VOLLMAR et al, 1994). Isto é consequência de pelo menos 2 fatos: primeiro, o estreitamento luminal devido ao inchaço das SEC resulta em déficit na microcirculação periportal, visto que os sinusóides periportais têm normalmente diâmetros pequenos com alta resistência ao fluxo sanguíneo quando comparados com os sinusóides pericentrais (KOMATSU et al, 1990). Segundo, a maior população das KC (2/3) é localizada na zona 1, mostrando comumente um largo tamanho com relação àqueles localizados na zona 3 (VOLLMAR et al, 1994). Inicialmente, acreditava-se que o acúmulo e a adesão de neutrófilos, bem como de plaquetas, nos sinusóides hepáticos, poderiam obstruir o lúmen, originando distúrbios circulatórios chamados de fenômeno "no-reflow" (KOO et al, 1992). Entretanto, investigações posteriores argumentaram contra esta hipótese. Então, durante a reperfusão *in vivo*, a estase de neutrófilos nos sinusóides foi frequentemente evidenciada, mas essa obstrução neutrofílica não necessariamente ocluía o lúmen capilar (VOLLMAR et al, 1996). Recentes investigações têm confirmado que o fator causal principal da piora da microcirculação pós-isquemia é o aumento local desse potente peptídeo vasoconstrictor, as ET, as quais são produzidas durante estágios precoces da reperfusão, causando redução do diâmetro sinusoidal com a subsequente indução do desarranjo na microcirculação (McCUSKEY et al, 1996; NAKAMURA et al, 1995). ET são provavelmente liberadas pelas SEC, KC e células estreladas em resposta à hipóxia,

espécies reativas de O₂ e citocinas pró-inflamatórias (URAMAKI et al, 1997). O NO é um potente vasodilatador envolvido na regulação da microcirculação hepática, pois atenua a piora na perfusão sinusoidal, melhorando a oxigenação tecidual hepática e contrabalanceia os efeitos transitórios das ET durante as fases precoces da reperfusão (PANNEN et al, 1998). Em adição, a geração de peroxinitrito, um potente oxidante formado pela reação do NO com anion superóxido, pode causar injúria através da peroxidação lipídica, inibição direta da respiração mitocondrial, inibição da atividade da Na⁺/K⁺ ATPase ou modificação de proteínas oxidativas (GLANTZOUNIS et al, 2005).

1.4. ESTEATOSE HEPÁTICA E FALÊNCIA DO ENXERTO

Esteatose hepática é o resultado do acúmulo anormal de triacilglicerol dentro do citoplasma dos hepatócitos. A esteatose pode ser quantificada de acordo com a infiltração gordurosa nos hepatócitos, em leve (menos de 30% dos hepatócitos têm vacúolos de gordura dentro do citoplasma), moderada (entre 30 a 60%) ou severa (mais que 60%) (D' ALESANDRO et al, 1991). Histologicamente, ela é classificada em micro e macroesteatose. Em 1987, um estudo clínico correlacionou a presença de esteatose e falência primária do enxerto (PORTMANN et al, 1987). É bem estabelecido que a esteatose represente um fator de risco associado à viabilidade do enxerto hepático após o transplante de fígado. Entretanto, devido a falta de órgãos para transplante, faz com que as equipes utilizem fígados com esteatose moderada, aumentando a vulnerabilidade para a injúria de I/R. Recentes investigações demonstram que ratos com macroesteatose hepática são mais susceptíveis à injúria I/R do que aqueles com microesteatose (IJAZ et al 2005). O depósito de triglicérides na forma de gotículas de gordura intracitoplasmáticas, está associado ao aumento do volume hepatocelular, o qual pode induzir à distorção e estreitamento dos sinusóides, com redução do diâmetro luminal de até 50% quando comparado com fígados normais (TERAMOTO et al, 1993). Consequentemente, o aumento na infiltração hepática é consistente com a aparição de alterações severas no fluxo sanguíneo do fígado e na microcirculação hepática. Nesta linha, tem sido sugerido que as alterações na perfusão sinusoidal na esteatose macrovesicular podem estar associadas a mecanismos de compressão do espaço sinusoidal pela esteatose e pelo inchaço neutrofílico

(TERAMOTO et al, 1993). O desbalanço entre ET/NO também contribui no desarranjo da microcirculação hepática em fígados esteatóticos (IJAZ et al, 2005).

1.5. O DOADOR MARGINAL

O transplante ortotópico de fígado passou a ser considerado como um método terapêutico para doenças terminais hepáticas em meados da década de 80. Desde então, o número de pacientes na fila por um órgão vem crescendo substancialmente em relação ao número de doadores disponíveis, aumentando-se, conseqüentemente, o tempo de espera por esta cirurgia. (ADAM, 1991; ABOUNA, 1997). Muitas opções técnicas têm sido utilizadas para reduzir o tempo de espera em lista, a escassez de doadores e a mortalidade em lista de espera, como o transplante intervivos, o *split-liver* e o transplante dominó. Outra alternativa é a utilização dos doadores marginais. A dificuldade principal é em caracterizar quais critérios a serem usados na seleção desses doadores. O termo marginal foi originalmente aplicado no passado para caracterizar enxertos de doadores “velhos”, mas a definição mudou, e agora é usada para se referir a enxertos de doadores de “alto risco”, com base em critérios demográficos, clínicos, laboratoriais e histológicos.

Recentes publicações têm sugerido critérios na seleção desses doadores marginais: (SCUDERI, 2006)

- BRICENO et al, 2002 : idade > 60 anos, mais de 4 dias em UTI, macroesteatose moderada e severa, TIF > 14 horas, uso de altas doses de drogas ionotrópicas.
- SALIZZONI et al, 2003 : idade > 65 anos, macroesteatose > 15%, TIF > 10 horas.
- TISSONE et al, 2004 : idade > 50 anos, macroesteatose > 50%, mais de 4 dias em UTI, hipotensão por mais de 1 hora e com PAS < 60 mmHg, uso de dopamina > 14µg/Kg/min, TIF > 14 horas, Na⁺ > 155mEq/L, sepses, infecções virais, alcoolismo, altos níveis de bilirrubinas, TGO(AST) e TGP(ALT), neoplasia extra-hepática, obesidade (IMC > 27).
- TEKIN et al, 2004 : idade > 60 anos, grau de esteatose, TIF > 12 horas.
- MONTALTI et al, 2004 : idade > 70 anos, esteatose leve e moderada, AgHBS+, anti-HCV+.
- ROCHA et al, 2004 :

- critérios maiores: idade > 55 anos, TGP(ALT) > 150 UI/L, Bb > 2mg/dl, Na⁺ > 150 mEq/L, altas doses de dopamina, parada cardíaca, internação em UTI por mais de 5 dias, macroesteatose moderada e severa.
- critérios menores: dopamina < 10 µg/Kg/min, alcoolismo, uso de drogas, menos de 4 dias em UTI, microesteatose de qualquer grau, macroesteatose leve.
- TOTSUKA et al, 2004 : TIF > 12 horas, TIQ > 45 min, Na⁺ > 155 mEq/L, enxerto importado.
- RENZ et al, 2005 : idade > 65 anos, parada cardíaca, anti-HCV+, AgHBS+, split-liver, hipernatremia, priorização para hepatocarcinoma, esteatose
- ANGELICO et al, 2005 : idade > 50anos, instabilidade hemodinâmica, tempo de UTI por mais de 5 dias, hipernatremia, anti-HCV +, AgHBS +, esteatose macrovesicular > 25%.

O termo doador marginal tem sido frequentemente empregado na literatura nos últimos anos, mas até o presente momento, não existe uma concordância na sua definição precisa ou nos parâmetros utilizados para caracterizá-lo, sendo necessária ainda uma padronização mundial, tendo em vista a crescente utilização desses doadores, mediante a escassez de órgãos e a gravidade dos pacientes em listas de espera.

2. OBJETIVO

Avaliar a aplicabilidade da fluorescência induzida por laser na detecção de alterações morfológicas e bioquímicas nos enxertos hepáticos humanos, em diferentes fases de perfusão (fria e quente).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Foram avaliados 31 enxertos hepáticos de pacientes submetidos ao transplante de fígado do Grupo Integrado de Transplante de Fígado do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, com doador cadáver, no período de abril de 2006 a maio de 2009. Os transplantes foram realizados de acordo com a Lei Federal n. 9.434, de 4 de fevereiro de 1997; Decreto n. 2.268, de 30 de junho de 1997; Portaria GM n. 3.407, de 5 de agosto de 1998; e Lei Federal n. 10.211, de 23 de março de 2001.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Médica da FMRP-USP. A família do receptor foi comunicada e esclarecida sobre a realização deste estudo clínico, autorizando sua realização através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Transplante de Fígado, Setor de Cirurgia Experimental e Técnica Cirúrgica do Departamento de Cirurgia e Anatomia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

As análises histológicas foram realizadas pelo Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

A análise óptica foi realizada pelo Instituto de Física da USP-São Carlos.

3.2. INCLUSÃO DO PACIENTE

A avaliação do paciente com doença hepática foi realizada pelos médicos do Grupo Integrado de Transplante de Fígado, analisando-se criteriosamente a necessidade da indicação do transplante hepático (TH), sendo todos os casos discutidos em reunião do Grupo.

3.3. INDICAÇÃO DO TRANSPLANTE

Os critérios mínimos para o cadastramento de receptores potenciais no Cadastro Técnico Único para transplante de fígado – doador cadáver, foram:

- Hepatopata crônico, com pelo menos uma das seguintes complicações:

- a) Hemorragia digestiva de repetição, com dois ou mais episódios distintos
- b) Ascite de difícil controle clínico
- c) Encefalopatia hepática ou porto-sistêmica refratária
- d) Peritonite bacteriana espontânea de repetição
- e) Síndrome hepato-pulmonar
- f) Queda significativa do estado geral
- g) Letargia
- h) Osteodistrofia metabólica

- Hepatopata crônico classificado como Child-Pugh B ou C (por pontuação), independente de complicações (Tabela 1).

Tabela 1 : Classificação de Child-Pugh

| PONTOS | 1 | 2 | 3 |
|-------------------|---------|----------------------------------|--|
| ENCEFALOPATIA | AUSENTE | 1-2 | 3-4 |
| Ascite | Ausente | Leve ou Controlada por Diurético | Ao Menos Moderada Apesar d Terapia cm Diuréticos |
| Bilirrubina | < 2 | 2 – 3 | > 3 |
| Albumiina (MG/DL) | > 3,5 | 2,8 - 3, 5 | < 2,8 |
| T. Protombina INR | < 1,7 | 1,70 – 2,3 | > 2,3 |

CHILD A: 5-6 pontos CHILD B: 7-9 pontos CHILD C: 10-15 pontos

- Cirrose biliar primária, com pelo menos uma das seguintes condições:
 - Prurido;
 - Deterioração da qualidade de vida;
- Colangite esclerosante primária, com pelo menos uma das seguintes condições:
 - Colangite recorrente com mais de um episódio;
 - Deterioração da qualidade de vida;

- Outras doenças colestáticas, pelos mesmos critérios para cirrose biliar primária.
- Deficiência de alfa1 – antitripsina – seguem a mesma indicação que os hepatopatas crônicos: complicações ou pontuação de Child- Pugh.
- Atresia de vias biliares – segundo critérios da equipe discutidos em reunião.
- Outros defeitos congênitos do metabolismo – segundo critérios da equipe discutidos em reunião.
- Polineuropatia amiloidótica familiar (PAF);
- Carcinoma hepatocelular com um nódulo de até 5 cm ou até três nódulos bilobares menores de 3 cm segundo os critérios de Milão, com estadiamento obrigatório, através de tomografia ou ressonância magnética de tórax, mapeamento ósseo.
- Colangiocarcinoma intra-hepático, periférico, pelos mesmos critérios no inciso anterior;
- Duplo fígado e rim a critério das equipes envolvidas.

A indicação do TH respeitou quatro pontos básicos definidos pela Secretaria de Saúde:

- a) Estabelecimento de diagnóstico específico da doença
- b) Demonstração inequívoca da gravidade da doença mediante provas documentadas
- c) Identificação de possível complicação que poderá prejudicar a sobrevida do paciente
- d) Estimativa da sobrevida do paciente submetido ou não ao transplante

3.4. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Não foram cadastrados receptores potenciais com:

- I – Colangiocarcinoma de grandes ductos
- II – Doença alcoólica com menos de seis meses de abstinência
- III – Tumores metastáticos de qualquer origem com exceção dos neuroendócrinos
- IV – Infecção extra-hepática não controlada;
- V – Polineuropatia amiloidótica familiar avançada grau IV

Após preencher os critérios clínicos para o TH, o paciente é avaliado pelas equipes de cirurgia, de enfermagem, de serviço social e pela psicologia. Após estas avaliações e discussão do caso em reunião multidisciplinar conjunta, o paciente é esclarecido sobre os riscos do transplante através da leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que então assinado pelo paciente e duas testemunhas e então o paciente é incluído na lista de espera para o TH.

A sua classificação é de acordo com o grupo sanguíneo e depende dos valores da escala MELD (*Model for End-Stage Liver Disease*).

A escala MELD é uma fórmula matemática disponível que pode ser calculada rapidamente na Internet, no site abaixo: WWW.unos.org/resources/medcalculator.asp, e que leva em consideração o INR (*Internacional Normalized Ratio*), a creatinina e a bilirrubina.

Uma vez listado, o paciente é acompanhado no ambulatório de transplante hepático da FMRP-USP e parâmetros clínicos e bioquímicos são analisados durante o seguimento, a fim de avaliar as alterações das funções metabólicas e atualizar os dados da escala MELD e sua classificação na fila.

Durante o acompanhamento do paciente na lista de espera da Secretaria de Saúde foram consideradas as contra-indicações absolutas e relativas.

- Absolutas

Interrupção da abstinência alcoólica; replicação do VHB; Anti-HIV (+); infecção bacteriana extra-hepática; doença extra-hepática descompensada; neoplasia extra-hepática; falta de adesão ao acompanhamento clínico.

- Relativas

Idade acima de 65 anos; trombose da veia porta; desnutrição grave; insuficiência renal; doença hepática em estágio final; cirurgias abdominais prévias.

3.5. FASES DO TRANSPLANTE**3.5.1. Do doador**

O enxerto foi proveniente única e exclusivamente de doador cadáver, após confirmação de morte encefálica e notificação pela Central de Transplantes.

Os critérios de inclusão e exclusão do doador são os do protocolo do grupo de transplante de fígado deste hospital, que estão abaixo relacionados:

Critérios de inclusão:

- Doadores cadáveres com idade entre 15 e 60 anos
- Uso de dopamina (EV) com dose menor que 10 mcg/kg/min
- Internação em Unidade de Terapia Intensiva menor que três dias
- Parada cardíaco-respiratória prévia revertida menor que 15 minutos
- Ausência de história progressiva de uso de álcool e/ou drogas
- Ausência de história prévia de neoplasias malignas tratadas
- Ausência de infecção ativa
- Aminotransferases (ALT e AST) com valores menores que 4 vezes os valores normais (valor de referência de ambas: 40 U/L)

Critérios de exclusão:

- Doadores cadáveres com idade menor que 15 anos ou maior que 60 anos
- Uso de dopamina (EV) com dose superior a 10mcg/kg/min
- Internação em Unidade de Terapia Intensiva maior que três dias
- Parada cardíaco-respiratória prévia revertida maior que 15 minutos
- História prévia de neoplasias malignas tratadas
- Infecção ativa
- Aminotransferases (ALT, AST) com valores maiores que 5 vezes os valores normais (valor de referência de ambas: 40 U/L)
- Pacientes soropositivos para HIV, Hepatite B (AgHbs +) e Hepatite C (anti-HCV +)

- Da captação e preparo do órgão

O doador é encaminhado ao centro cirúrgico para a retirada do enxerto onde é mantida sua estabilidade hemodinâmica e realizadas assepsia pré-operatória, monitorização adequada e profilaxia antibiótica.

A avaliação do fígado é subjetivamente feita pelo cirurgião, levando-se em conta o aspecto macroscópico e a presença de eventuais variações anatômicas onde se descartaram fígados com esteatose acentuada

Inicia-se a fase de canulação da artéria aorta abdominal pré-iliaca e da veia porta. Após a canulação dos vasos, duas soluções de preservação, entre 0 - 4°C são utilizadas: a solução da Universidade de Wisconsin (UW) ou solução de Celsior, 2000 ml da solução na veia porta e a solução Eurocollins, sendo 2000 ml da solução na artéria aorta, que é clampeada na transição toracoabdominal e realizado a exsanguinação com a secção da veia cava próximo ao átrio direito. Nesse momento o fígado é envolto em grande quantidade de gelo, iniciando-se o período denominado Tempo de Isquemia Fria (TIF) que irá durar até o início da anastomose da veia cava supra-hepática do receptor.

O fígado retirado do doador é colocado em uma bandeja, onde é perfundido com mais 1000 ml de solução U.W ou Celsior, divididos entre a veia porta e artéria hepática .

O órgão é embalado em sacos plásticos estéreis e transportado em caixas térmicas com gelo até ao HC-RP, onde já estará ocorrendo a hepatectomia do receptor.

Após a chegada ao HC-RP, o fígado é encaminhado à outra sala cirúrgica onde é desembalado e devidamente preparado para as anastomoses.

3.5.2. Do receptor

O receptor é avaliado na enfermaria e encaminhado ao centro cirúrgico, após a realização de exames pré-operatórios complementares, como:

- Jejum VO
- Scalp heparinizado em veia periférica
- Ceftriaxona, 1,0 g EV
- Vancomicina, 500 mg, EV
- Nistatina, 500.000 UI, bochechar e engolir

- Diazepan, 10 mg, VO
- Clister glicerinado
- Tricotomia

No centro cirúrgico o paciente é devidamente monitorado com ao menos, uma punção arterial e dois acessos venosos de calibre maior que 8 Fr, sendo um para posicionamento do cateter de Swan-Ganz.

É administrado Metilprednisolona (Solu-medrol®), 1,0 g, EV no início da laparotomia e Ceftriaxona, 1,0 g, EV a cada 6 horas, durante o ato.

Na indução anestésica é administrado propofol ou barbitúrico associado a opióide, e feito bloqueio neuromuscular com succinilcolina. Na manutenção da anestesia deve-se evitar o uso de anestésicos inalatórios. A anestesia é complementada com opióides e bloqueadores neuromusculares de farmacocinética menos comprometida pela doença hepática terminal, como fentanil ou sufentanil, associado a atracúrio ou, preferencialmente, cisatracúrio, pela sua menor liberação de histamina, ambos de eliminação órgão-independente.

A cirurgia, para fins didáticos, compreende três fases. A fase I ou pré-anepática se inicia na indução anestésica e compreende a hepatectomia, portanto finaliza com a exclusão vascular hepática e retirada do órgão nativo. A fase II ou fase anepática se estende da exclusão vascular hepática até a re-vascularização do enxerto. A fase III ou neo-hepática se inicia com a reperfusão hepática e com o restabelecimento do retorno venoso ao coração e finaliza no fechamento da parede abdominal.

A incisão é a subcostal direita ampliada à Mercedes e a técnica da hepatectomia utilizada no receptor é a com preservação da veia cava, ou seja, sem a utilização de circulação extracorpórea, também chamada de “*piggyback*”.

Após a hepatectomia, o enxerto é colocado no mesmo local do fígado extraído e inicia-se o período denominado de Tempo de Isquemia Normotérmica (TIN), que vai do início da anastomose da veia cava supra-hepática até o término da anastomose da veia porta e reperfusão exclusivamente venosa do enxerto.

Ao final da anastomose da veia porta e momentos antes da reperfusão, deixa-se apenas um pequeno espaço para a colocação de uma sonda que é acoplada a um equipo de soro e conectada a dois frascos de Ringer lactato gelado (total de 2000 ml), para a lavagem do enxerto mantendo-se a veia cava supra-hepática ainda

clampeada. Após a lavagem completa do enxerto, conclui-se a anastomose da veia porta, com uma exanguinação de mais ou menos 100 ml propositadamente para desprezar-se o sangue de estase esplâncnica e daí então é liberado o *clamp* da veia cava e da veia porta para a reperfusão venosa do enxerto.

As anastomoses arterial e biliar são realizadas consecutivamente.

A cavidade abdominal é revisada, assim como, a hemostasia é devidamente drenada antes do fechamento.

3.6. DELINEAMENTO DO TRABALHO

O estudo foi realizado durante todas as etapas de transplantes de fígado realizados nesta Instituição, no período de abril de 2006 a maio de 2009 e incluiu 31 pacientes.

O aparato experimental utilizado para a leitura por auto-fluorescência foi composto por um laser de excitação em 532 nm (Nd:YAG dobrado), um espectrofotômetro (350 a 850 nm), *notebook* com um programa de aquisição Light View[®] e uma sonda de aplicação do tipo “Y”, composta por duas fibras: uma entregando a luz do laser ao tecido-alvo, e outra coletando a luz emitida pelo tecido e conduzindo-a ao espectrofotômetro. A potência do laser é de aproximadamente 5 mW, insuficiente para causar uma reação térmica no tecido alvo. O laser de excitação, acoplado à sonda, é entregue à superfície do tecido o mais perpendicularmente possível. A outra extremidade da sonda é conectada ao espectrofotômetro e conduz a luz coletada do tecido. O espectrofotômetro está conectado ao computador e o programa Light View[®] fornece os resultados obtidos da intensidade luminosa em função do comprimento de onda. Para proteger a fibra e evitar a contaminação de uma medida para outra, utilizou-se um filme transparente, estéril (Tegaderm[®]) e flexível entre a ponta da fibra e o tecido hepático (Figura 3).

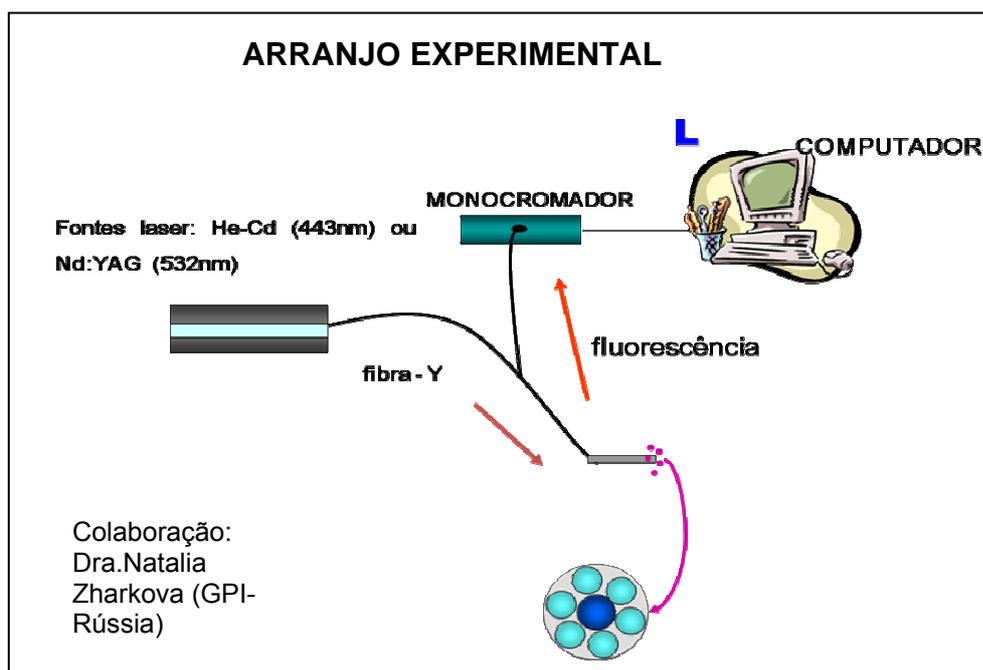


Figura 3: O aparato experimental utilizado para a leitura do por auto-fluorescência foi composto por um laser de excitação em 532 nm (Nd:YAG dobrado), um espectrofotômetro (350 a 850 nm), *notebook* com um programa de aquisição Light View[®] e uma sonda de aplicação do tipo “Y”, composta por duas fibras: uma entregando a luz do laser ao tecido-alvo, e outra coletando a luz emitida pelo tecido e conduzindo-a ao espectrofotômetro.

Neste trabalho, a investigação foi concentrada em excitação de 532 nm. Foi obtido o espectro de cinco pontos, de modo aleatório, nos segmentos medial e lateral direitos e no segmento lateral esquerdo, durante a fase de captação (imediatamente após a abertura da cavidade do doador e após a perfusão fria (momentos 1 e 2 respectivamente), no final do *back-table* (momento 3), 5 minutos e 1 hora após a perfusão quente (momentos 4 e 5 respectivamente). Desse espectro, em cada um dos 5 momentos, a média da leitura será obtida de todos os pontos coletados em cada lobo. Um novo espectro será traçado com essas médias. A intensidade de fluorescência na região de máxima emissão do espectro (em torno de 600 nm), a cada fase do transplante, será utilizada para comparação com as biópsias realizadas em cada um desses 5 momentos. A biópsia foi realizada em cunha com lâmina do bisturi frio 11, em um dos bordos do fígado iluminados pelo laser. Também foi realizada coleta de sangue venoso na fase de abertura do doador, com 5 minutos e 1 hora após a perfusão quente, para dosagens de TGO (AST), TGP

(ALT), DHL e bilirrubina direta (Bb D), as quais utilizamos também para comparação com as médias do espectro de emissão de fluorescência.

3.7. DOSAGENS BIOQUÍMICAS

Foram dosadas as concentrações das aminotransferases (ALT e AST), bilirrubina direta (BbD) e desidrogenase láctica (DHL) na corrente sanguínea (séricas) no início da captação, com 5 minutos e 1 hora após o implante e do primeiro ao sexto pós-operatório.

As aminotransferases (ALT e AST) foram determinadas por método cinético a 340nm, e os valores obtidos foram expressos em U/L (HENRY,1996) .

A desidrogenase láctica (DHL) foi determinada por método cinético a 340nm , e os valores obtidos foram expressos em U/L (PESCE,1989).

A bilirrubina direta foi determinada por método colorimétrico a 525 nm e os valores obtidos foram expressos em mg/dL (SIMS, 1958).

3.8. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após a coleta das biópsias, o material foi fixado em frasco contendo formol tamponado, no mínimo 24 horas de fixação e logo em seguida as mesmas foram incluídas em parafina. Destas foram obtidos fragmentos com espessura de 5 micrometros (um), utilizando o micrometro da marca MICROM. Esses fragmentos foram processados e corados com hematoxilina-eosina para análise microscópica. Foram analisados através microscópio ZEISS utilizando lentes ocular 10 e objetiva 25, onde em 10 campos microscopicos foram analisados cápsula e subcápsula hepáticas. Tomou-se o cuidado da cápsula e subcapsula serem analisadas na zona equatorial do campo do microscópio. Nas fases 1, 2 e 3 foram feitas uma analise semi-quantitativa da autólise em 1, 2 e 3 cruces, respectivamente em leve, moderada e grave. Nas fases 4 e 5 foram também analisadas necrose e hemorragia, utilizando a mesma semi-quantificação anterior.

A esteatose dos hepatocitos foi avaliada de acordo com a classificação de ADAMS, 1991 que consiste em:

- ausente
- discreta: até 30% de hepatócitos com vacúolos de gordura

- moderada : 30 a 60% de hepatócitos com vacúolos de gordura
- grave: mais 60% de hepatócitos com vacúolos de gordura

3.9. ANÁLISE ÓTICA

Os espectros de fluorescência coletados durante as cinco fases do transplante, foram tratados com o *software* Origin®. Para cada transplante, médias dos cinco espectros coletados em cada lobo do fígado e em cada etapa foram obtidas. Assim cada procedimento contou com um espectro médio de cada porção (segmentos lateral esquerdo, medial e lateral direitos) do fígado, em cada etapa, num total de três médias por etapa e quinze médias no total para cada procedimento.

Cada um dos espectros médios foi analisado da seguinte forma: removeu-se a linha de base dos espectros (a qual inclui um sinal de ruído relacionado ao equipamento) de forma a obter-se informação apenas da luz de fluorescência coletada. Uma vez que o espectro de emissão de fluorescência do fígado com excitação de 532 nm é composto por uma única banda, foi medida a amplitude máxima de cada espectro médio, e à meia-altura (metade da amplitude máxima) da banda, mediu-se a largura do espectro. Isso foi feito para obtenção de informação relacionada às alterações no formato do espectro, as quais dizem respeito às alterações físicas e metabólicas do tecido (Figura 4). Estas alterações podem levar a aumento/diminuição da intensidade de emissão de fluorescência, aumentando ou diminuindo, portanto, a amplitude da banda. Além disso, o surgimento ou desaparecimento de porções do espectro na forma de bandas adicionais ou ausentes também pode indicar a ocorrência destas alterações, modificando a relação entre altura e largura espectral, o que se reflete na largura do espectro medida à meia-altura. Assim estas informações foram comparadas entre si e analisadas de acordo com as diferentes fases do transplante em que foram observadas e com as condições físicas e metabólicas tanto do paciente quanto do órgão enxertado.

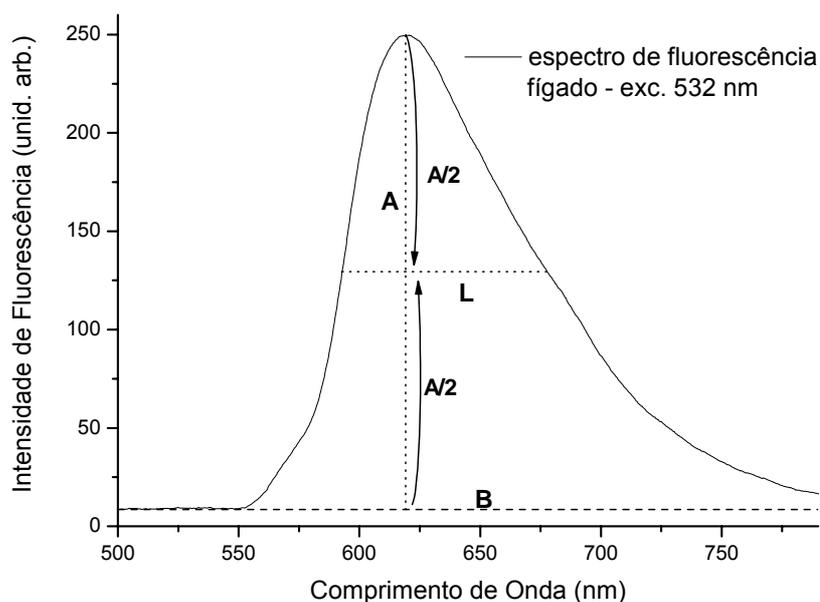


Figura 4: Análise do espectro de fluorescência do fígado com excitação de 532 nm. **B** representa a linha base; **A** é a amplitude máxima do espectro (distância entre o máximo de emissão e a linha de base); e **L** representa a largura da meia-altura, ou seja, a largura espectral na metade da amplitude observada.

3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação dos grupos foi feita utilizando o teste estatístico de Mann-Whitney, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

No presente trabalho foram avaliados 31 enxertos hepáticos de pacientes submetidos ao transplante de fígado do Grupo Integrado de Transplante de Fígado do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, com doador cadáver, no período de abril de 2006 a maio de 2009, sendo 18 enxertos conservados com solução de Celsior (58,06%) e 13 pacientes com solução de Belzer (41,94%).

Com relação à análise da fluorescência (amplitude e largura) coletadas no momento 1, nos 2 grupos Celsior e Belzer, demonstradas nas figuras 5 e 6, não se observou diferenças estatísticas ($p > 0,05$).

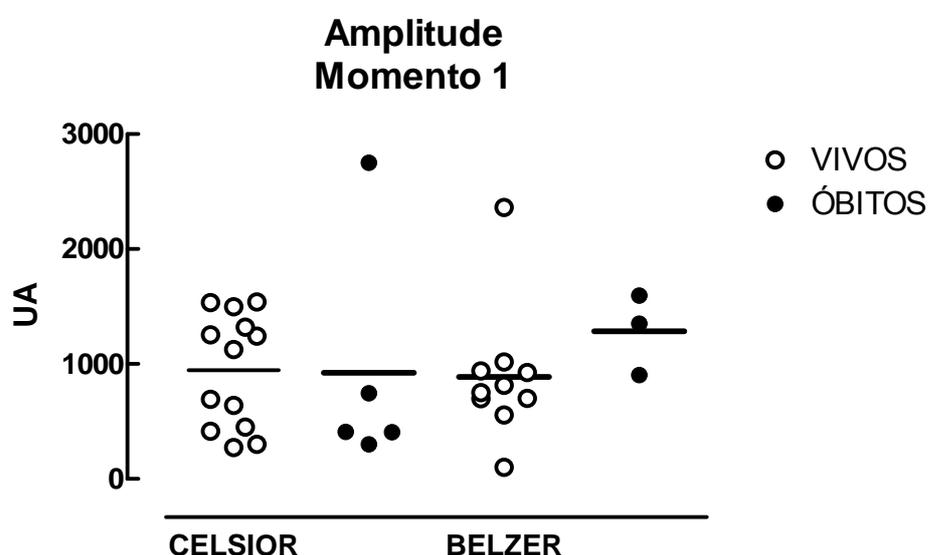


Figura 5: Amplitude da fluorescência expressa em UA (unidade arbitrária) coletada no momento 1, com excitação de 532 nm, nos 2 grupos Celsior e Belzer.

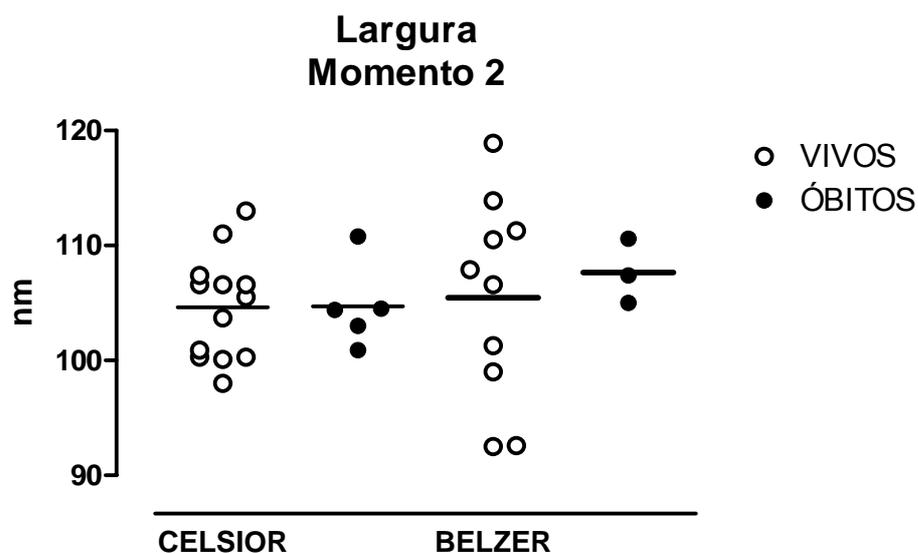


Figura 8 : Amplitude da fluorescência expressa em UA (unidade arbitrária) coletada no momento 2, nos 2 grupos Celsior e Belzer.

A análise da fluorescência (amplitude e largura) coletadas no momento 3, nos 2 grupos Celsior e Belzer, e que estão demonstradas nas figuras 9 e 10, não se identificou diferenças estatísticas ($p > 0,05$).

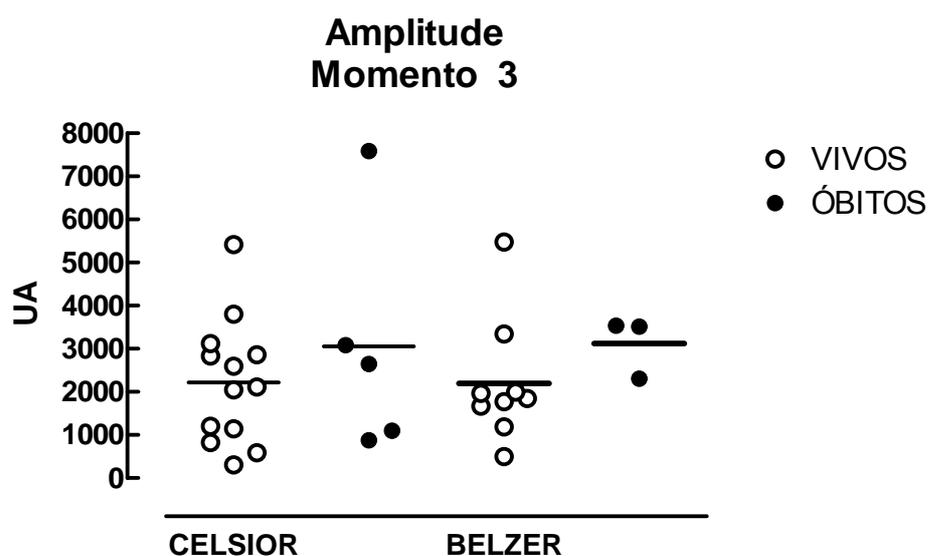


Figura 9: Amplitude da fluorescência expressa em UA(unidade arbitrária) coletada no momento 3, nos 2 grupos Celsior e Belzer.

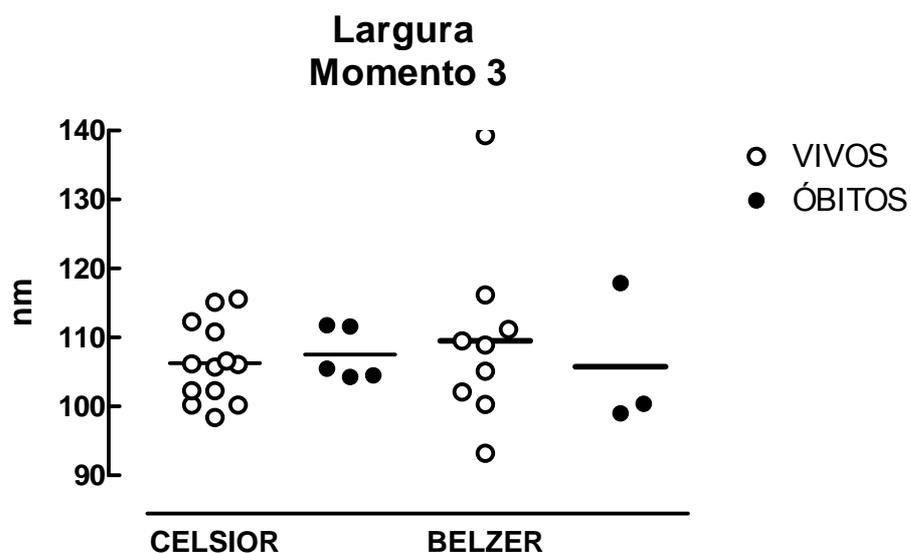


Figura 10: Largura da fluorescência expressa em UA (unidade arbitrária) coletada no momento 3, nos 2 grupos Celsior e Belzer.

Com relação à análise da fluorescência (amplitude e largura) coletadas no momento 4, nos 2 grupos Celsior e Belzer, demonstradas nas figuras 11 e 12, não se observou diferenças estatísticas ($p > 0,05$).

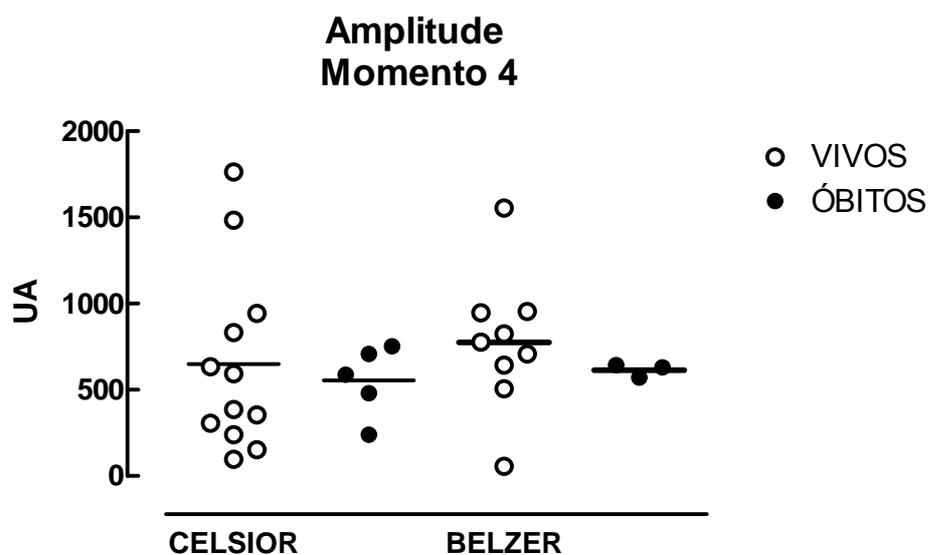


Figura 11: Amplitude da fluorescência expressa em UA (unidade arbitrária) coletada no momento 4, nos 2 grupos Celsior e Belzer

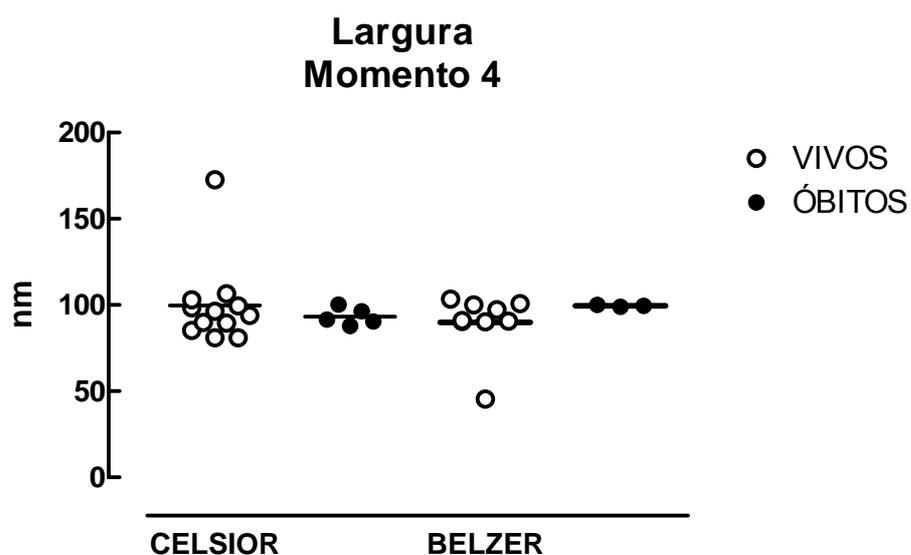


Figura 12: Largura da fluorescência expressa em UA (unidade arbitrária) coletada no momento 3, nos 2 grupos Celsior e Belzer

Quanto à análise da fluorescência (amplitude e largura) realizada no momento 5, nos 2 grupos Celsior e Belzer, demonstradas nas figuras 13 e 14, não se observou diferenças estatísticas ($p > 0,05$).

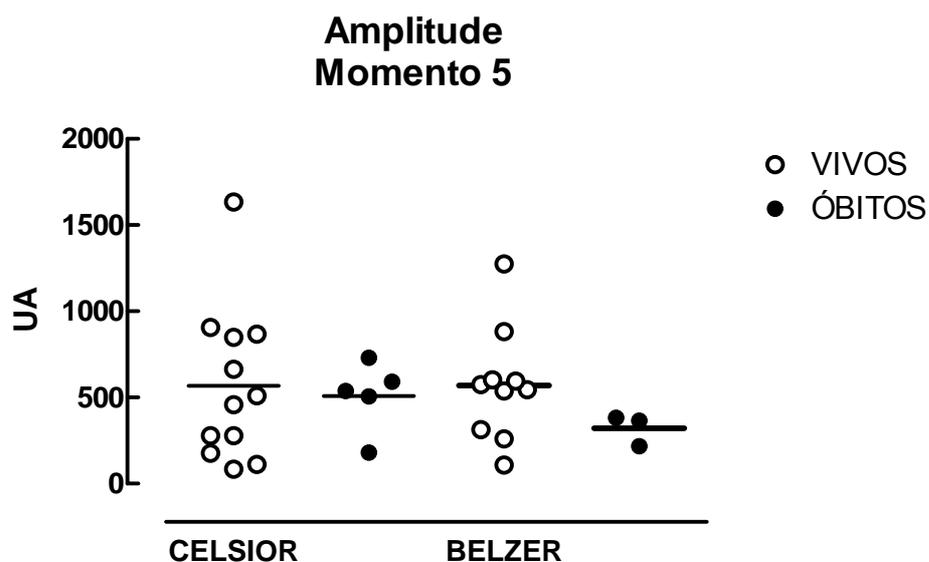


Figura 13: Amplitude da fluorescência expressa em UA (unidade arbitrária) coletada no momento 5, nos 2 grupos Celsior e Belzer

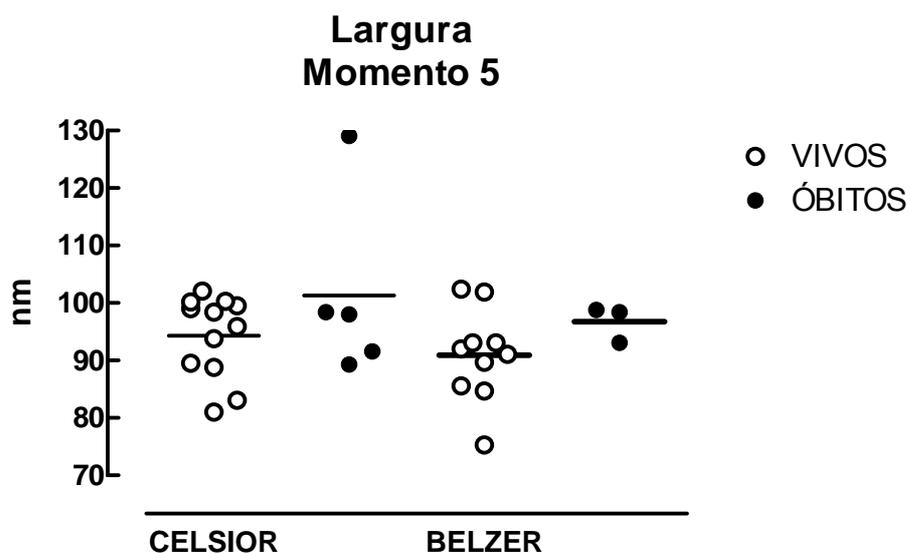
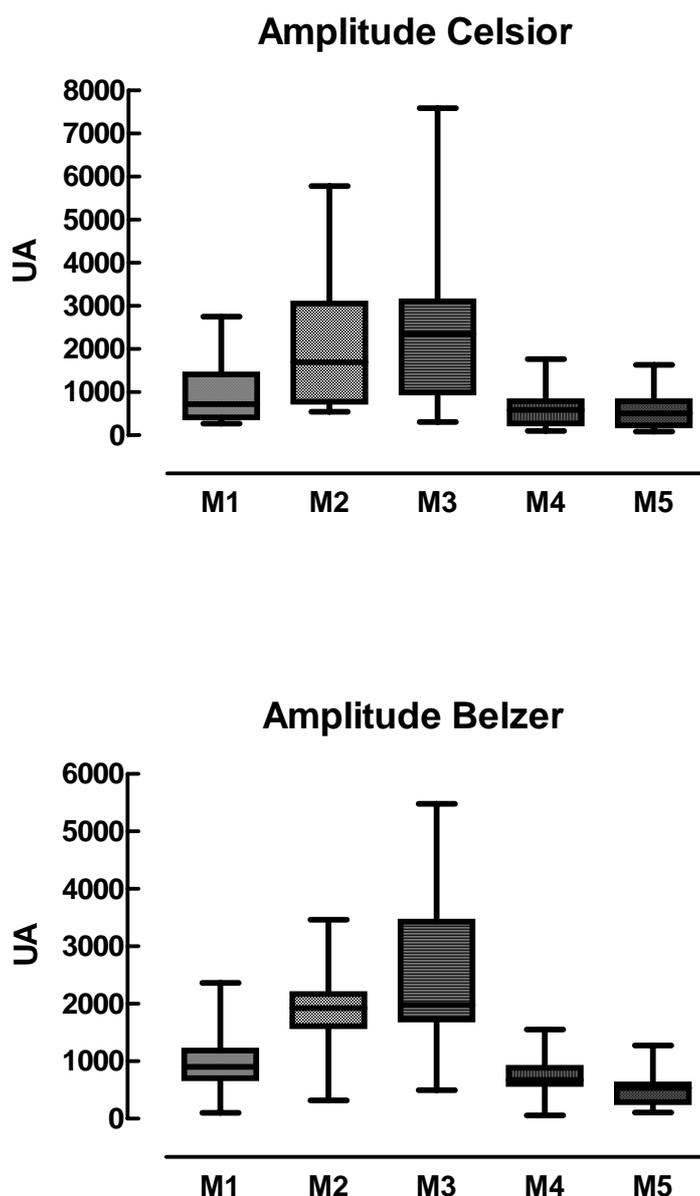


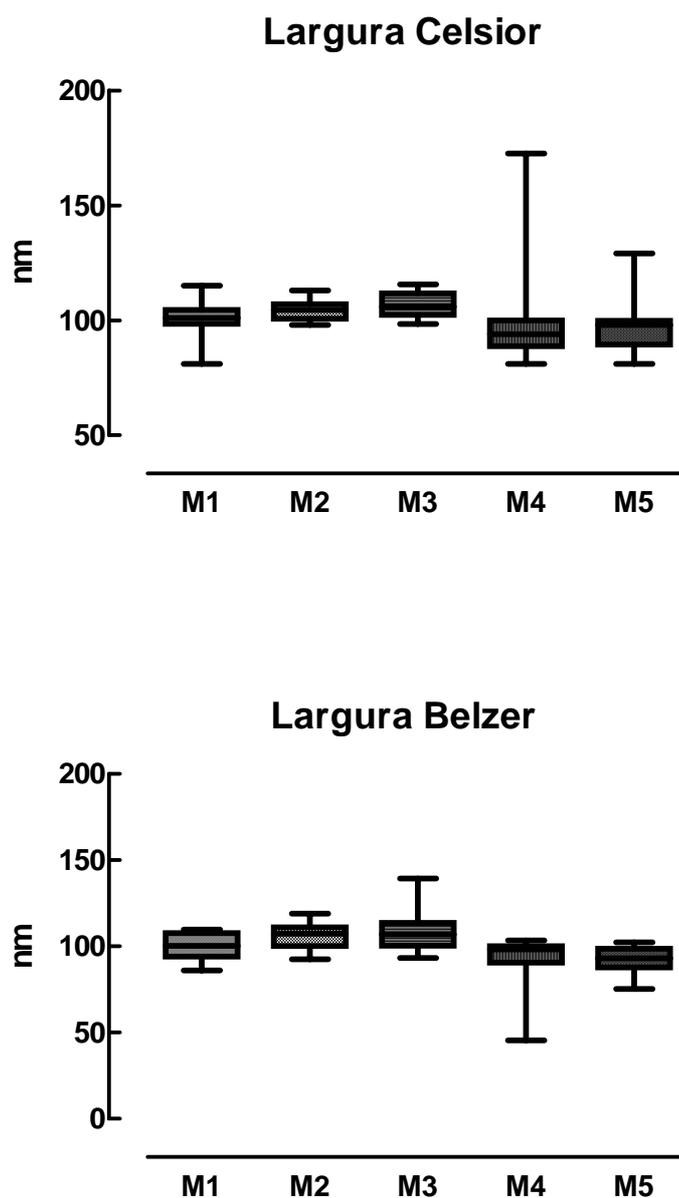
Figura 14: Largura da fluorescência expressa em UA (unidade arbitrária) coletada no momento 5, nos 2 grupos Celsior e Belzer.

Nas figuras 15 A e B foi analisada a amplitude de espectro da fluorescência à laser nos momentos 1, 2, 3, 4 e 5, após diferentes períodos de isquemia hipotérmica (M2 e M3) comparada com momentos de 5 minutos e 1 hora após a perfusão quente (M4 e M5), nos grupos Celsior e Belzer. Observou-se haver diferença estatisticamente significativa entre M2 e M3 vs M4 e M5 ($p < 0,05$).



Figuras 15 A e B : Amplitude do espectro de fluorescência a laser, com excitação de 532 nm, nos momentos 1, 2, 3, 4 e 5, início da operação no doador, após a perfusão hipotérmica, após diferentes períodos de isquemia hipotérmica, 5 minutos e 1 hora após revascularização arterial do fígado, respectivamente. M2 e M3 vs M4 e M5 ($p < 0,05$).

Nas figuras 16 A e B analisamos a largura do espectro da fluorescência a laser nos momentos 1, 2, 3, 4 e 5 após diferentes períodos de isquemia hipotérmica (M2 e M3) comparados com momentos de 5 minutos e 1 hora após a perfusão quente (M4 e M5), nos grupos Celsior e Belzer. Observamos não haver diferença estatisticamente significativa entre M2 e M3 vs M4 e M5 ($p > 0,05$).



Figuras 16 A e B : Largura de espectro de fluorescência a laser, com excitação de 532 nm, nos momentos 1, 2, 3, 4 e 5, início da operação no doador, após a perfusão hipotérmica, após diferentes períodos de isquemia hipotérmica, 5 minutos e 1 hora após revascularização arterial do fígado, respectivamente. A comparação estatística entre os diversos grupos não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$).

Foram comparados os tempos de isquemia hipotérmica e normotérmica, nos 2 grupos Celsior e Belzer, demonstradas respectivamente nas figuras 17 e 18, onde observamos não haver diferenças estatísticas entre os 2 grupos. ($p > 0,05$).

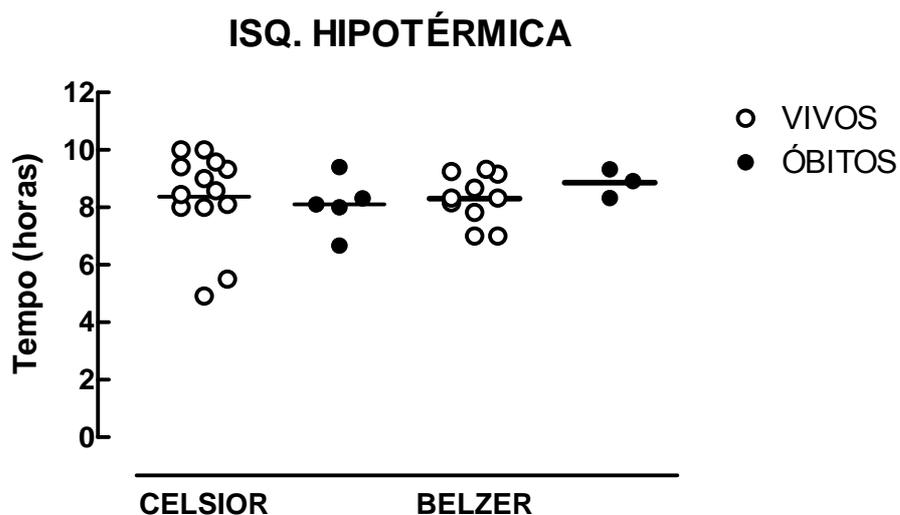


Figura 17: Tempos de isquemia hipotérmica, expressos em horas, nos grupos Celsior e Belzer. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

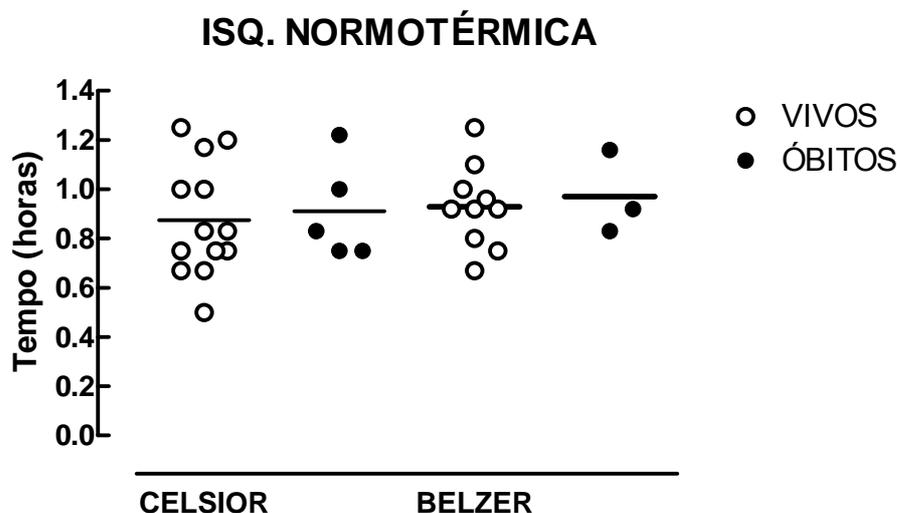


Figura 18: Tempos de isquemia normotérmica, expressos em horas, nos grupos Celsior e Belzer. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

A análise histológica do grau de esteatose hepática, cujas biópsias foram coletadas todas no mesmo momento (1) e classificadas em ausente, discreta (até 30%), moderada (30-60%) e severa (mais que 60%), foram realizadas nos 2 grupos, Celsior e Belzer, e demonstradas na figura 19.

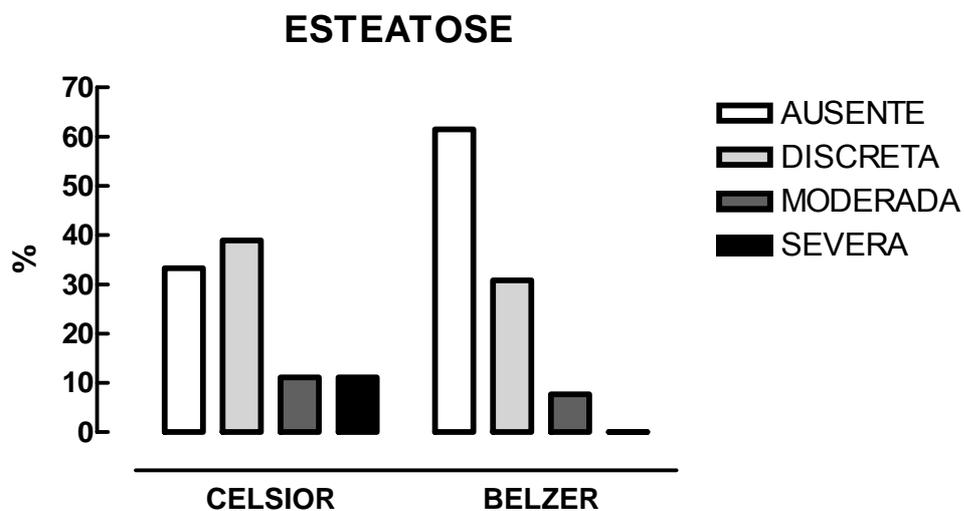


Figura 19: Graus de esteatose hepática (ausente, discreta, moderada e severa), coletadas no momento 1, nos grupos Celsior e Belzer.

O grau de injúria hepática nos momentos 1, 2 e 3, foi avaliado pelo grau de autólise, em leve, moderada e grave, e analisada nos 2 grupos Celsior e Belzer e estão demonstradas nas figuras 20, 21 e 22.

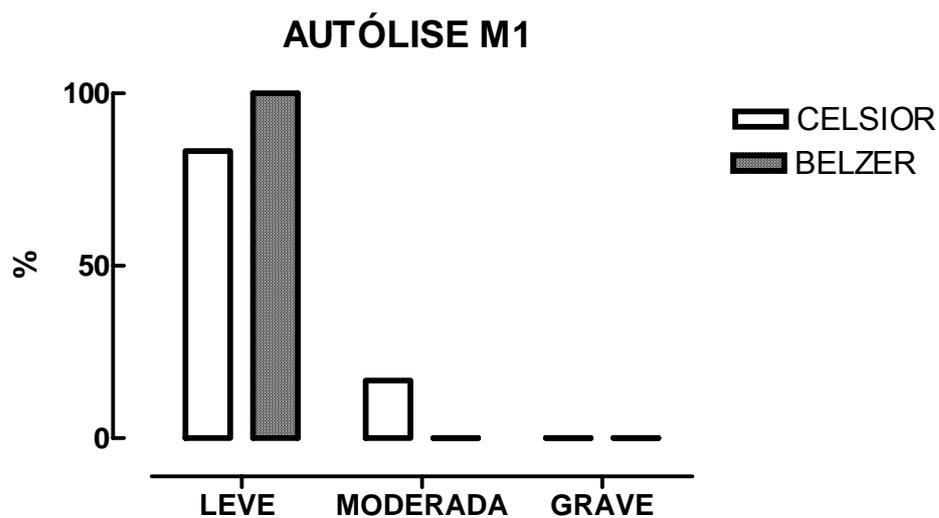


Figura 20: Graus de autólise no momento 1, expressos em leve, moderada e grave, nos grupos Celsior e Belzer.

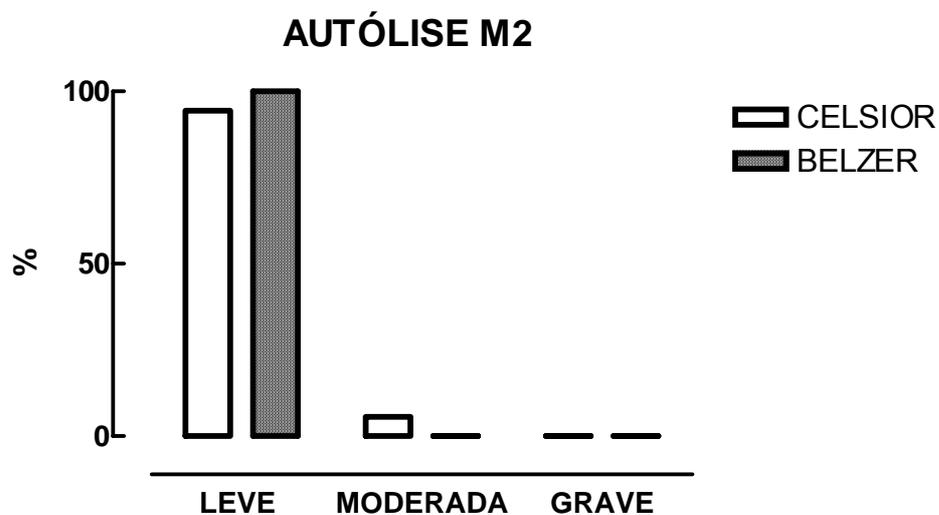


Figura 21: Graus de autólise no momento 2, expressos em leve, moderada e grave, nos grupos Celsior e Belzer.

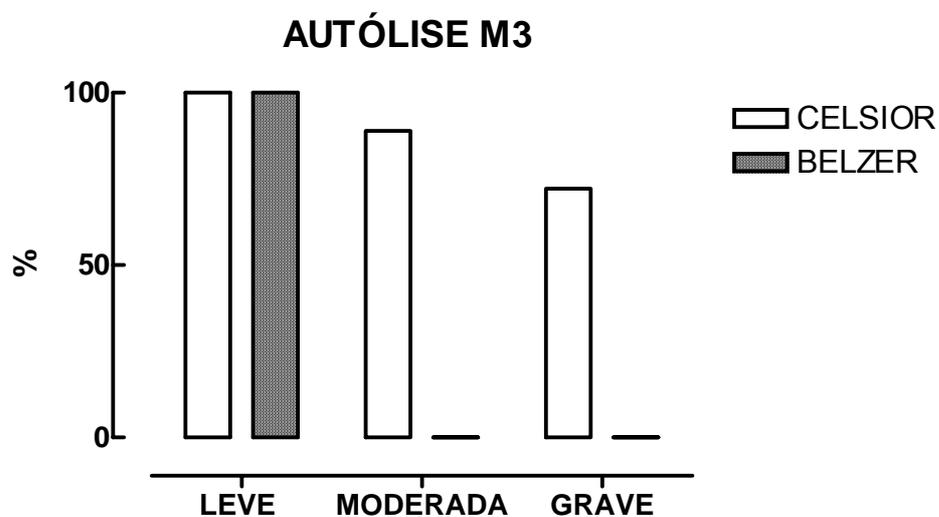


Figura 22: Graus de autólise no momento 3, expressos em leve, moderada e grave, nos grupos Celsior e Belzer.

A lesão de reperfusão hepática, ocorrida nos momentos 4 e 5, foi avaliada histologicamente através do grau de necrose hepática, a qual foi classificada em leve, moderada e grave. Nas figuras 23, 24 e 25 avaliamos conjuntamente o grau de necrose nos momentos 4 e 5, nos grupos da solução de Celsior, Belzer e na totalidade dos 2 grupos, respectivamente.

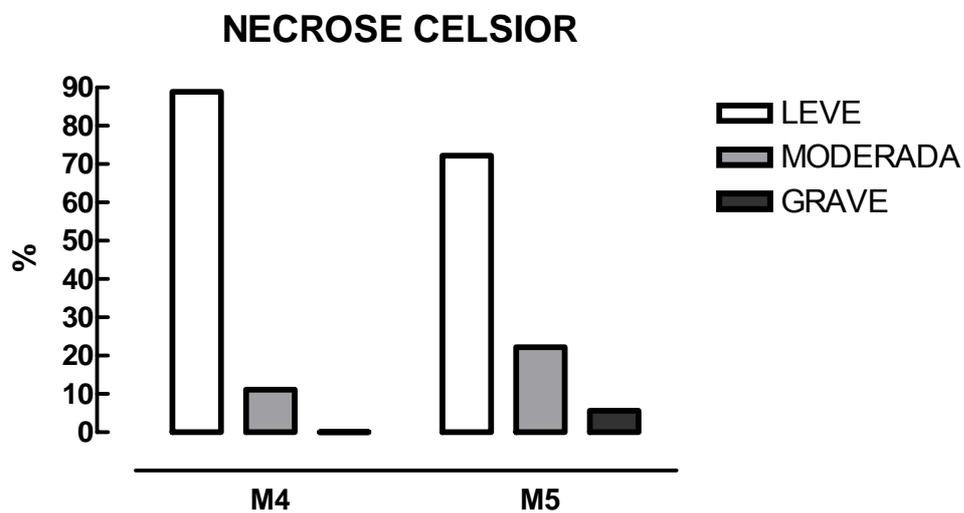


Figura 23: Graus de necrose hepática, expressos em leve, moderada e grave, nos momentos 4 e 5, do grupo Celsior.

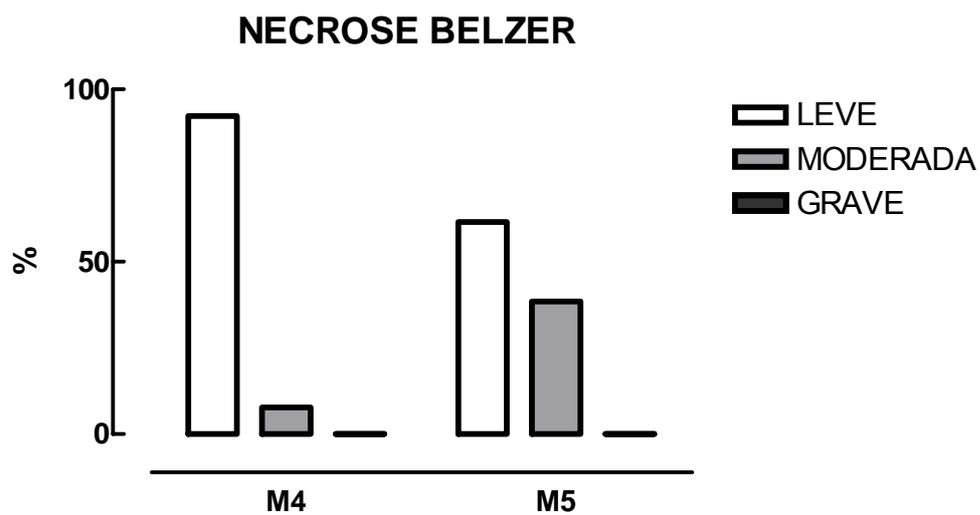


Figura 24: Graus de necrose hepática, expressos em leve, moderada e grave, nos momentos 4 e 5, do grupo Belzer.

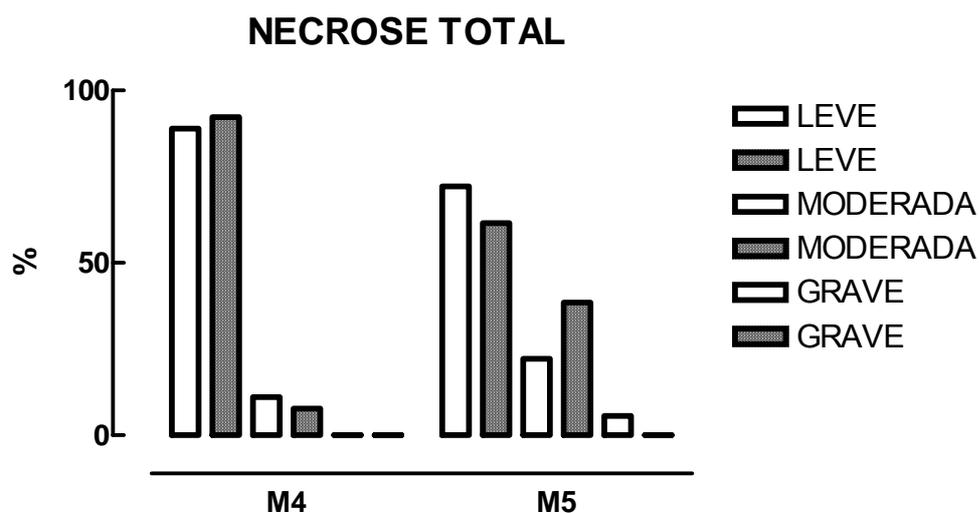


Figura 25: Graus de necrose hepática, expressos em leve, moderada e grave, nos momentos 4 e 5, do total de 31 pacientes.

Neste estudo também avaliamos a função do enxerto, após 5 minutos e 1 hora da revascularização arterial, através das dosagens bioquímicas da ALT, AST, DHL e Bb D, comparando os 2 grupos, através das figuras 26 a 33. Observamos através da análise estatística que não houve diferenças significantes entre os grupos ($p > 0,05$).

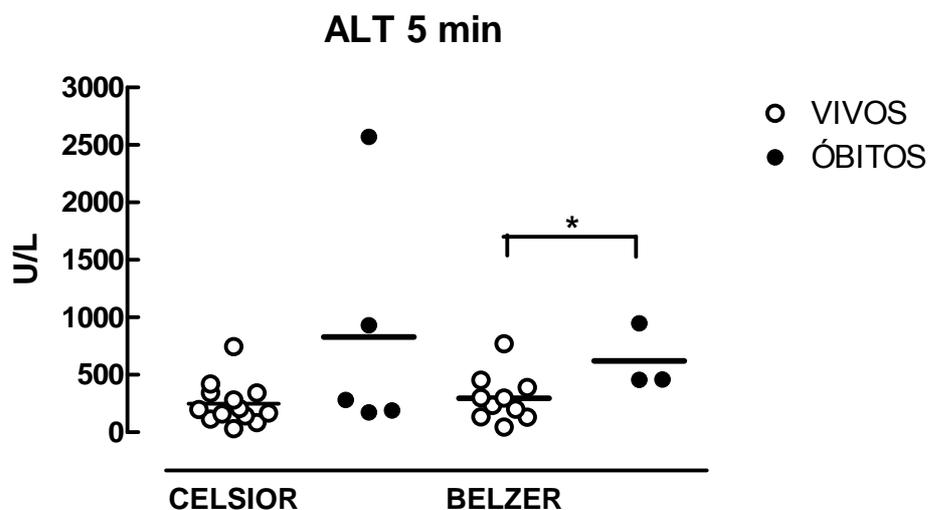


Figura 26: Níveis da ALT após 5 minutos da revascularização arterial, expressos em unidades por litro, nos grupos Celsior e Belzer.* Vivos vs óbitos ($p < 0,05$)

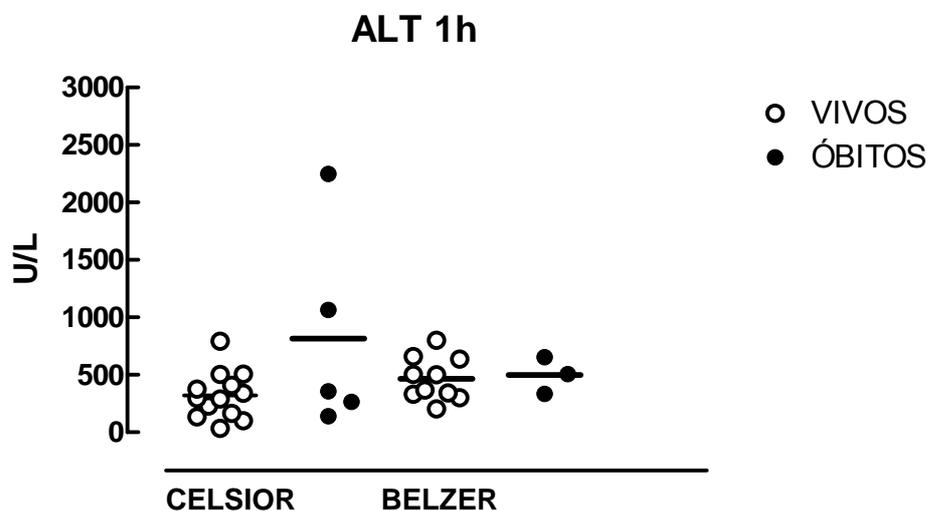


Figura 27: Níveis da ALT após 1 hora da revascularização arterial, expressos em unidades por litro, nos grupos Celsior e Belzer.

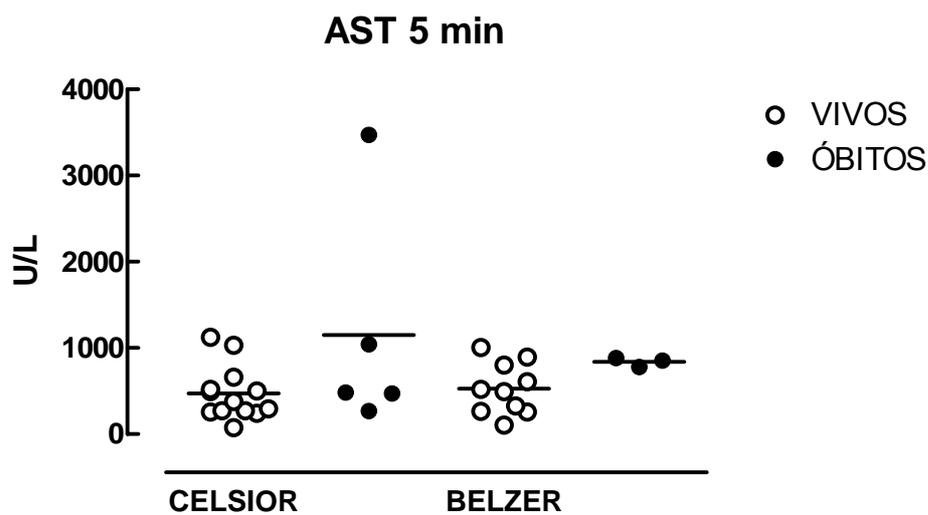


Figura 28: Níveis da AST após 5 minutos da revascularização arterial, expressos em unidades por litro, nos grupos Celsior e Belzer.

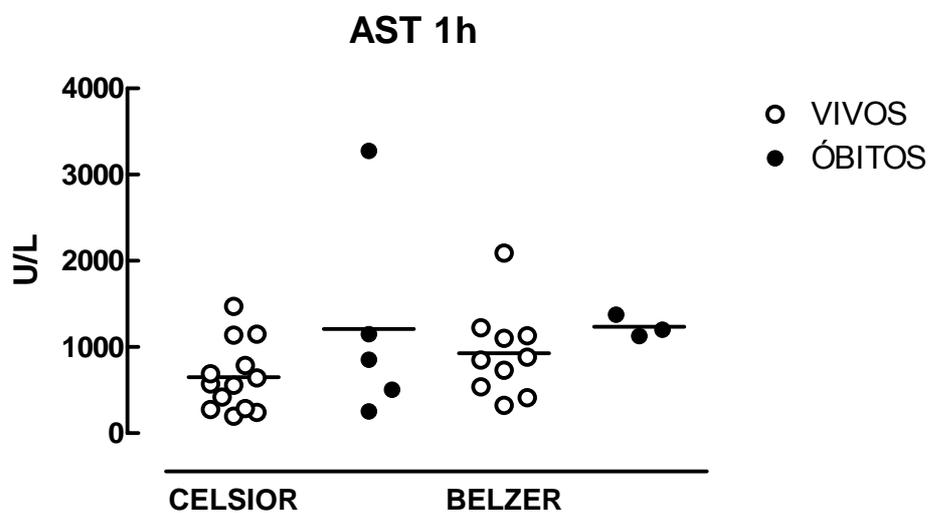


Figura 29: Níveis da ALT após 1 hora da revascularização arterial , expressos em unidades por litro, nos grupos Celsior e Belzer.

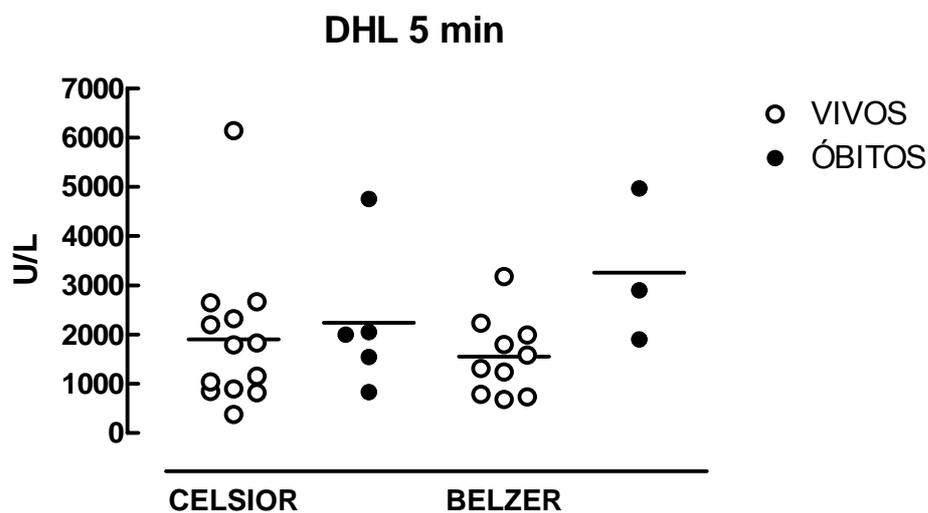


Figura 30: Níveis da DHL após 5 minutos da revascularização arterial , expressos em unidades por litro, nos grupos Celsior e Belzer.

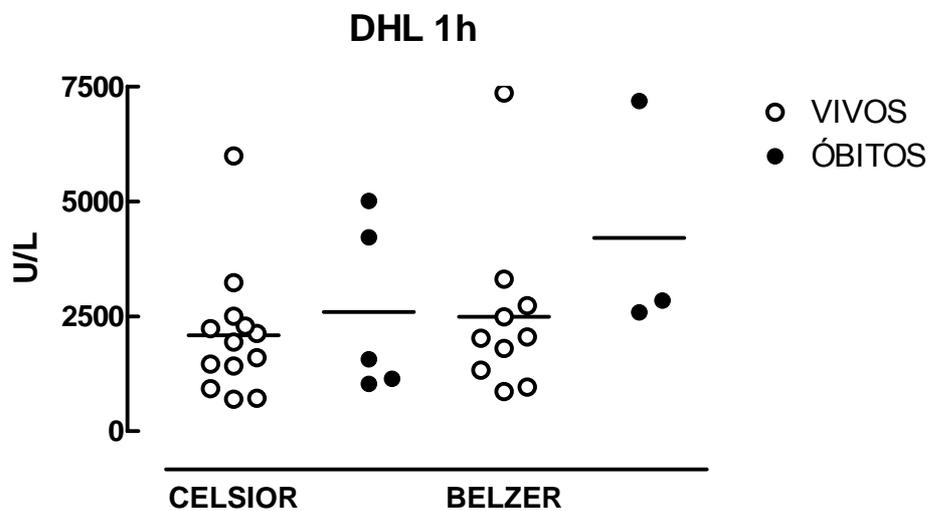


Figura 31: Níveis da ALT após 1 hora da revascularização arterial , expressos em unidades por litro, nos grupos Celsior e Belzer.

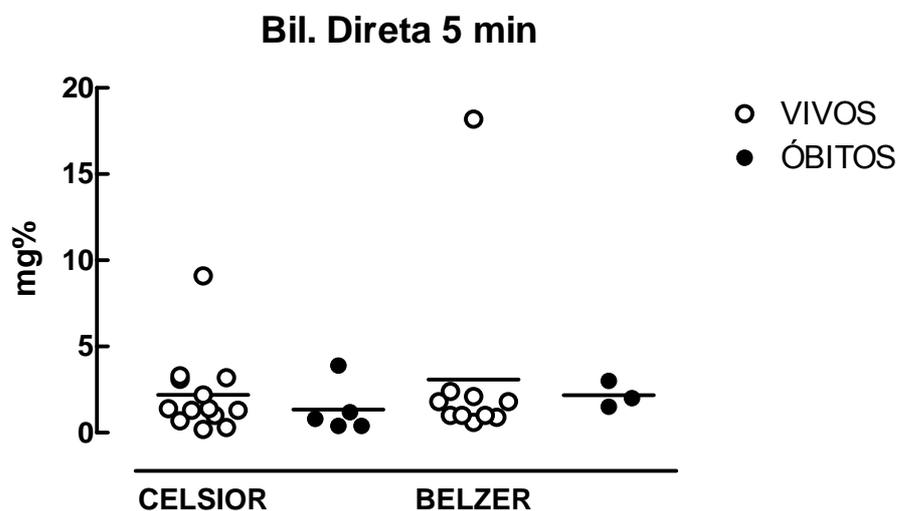


Figura 32: Níveis da Bb D após 5 minutos da revascularização arterial , expressos em unidades por litro, nos grupos Celsior e Belzer.

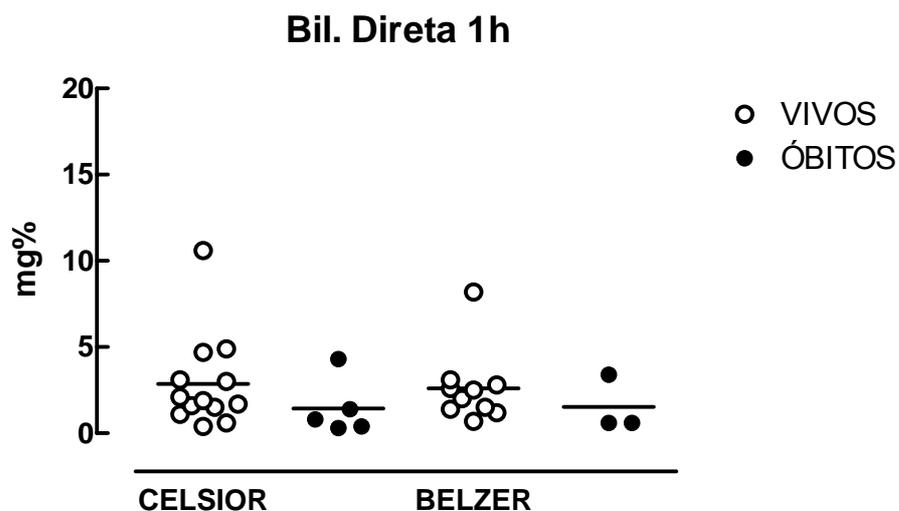


Figura 33: Níveis da Bb D após 1 hora da revascularização arterial expressos em miligramas por cento, nos grupos Celsior e Belzer.

Avaliamos neste trabalho a evolução bioquímica do enxerto hepático nos primeiros 6 dias do pós-operatório, através das dosagens bioquímicas da ALT, AST, DHL e Bb D, comparando os pacientes dos 2 grupos, respectivamente através das figuras 34, 35, 36 e 37, e notamos não haver diferenças estatísticas significativas nessas dosagens laboratoriais nos 2 grupos ($p > 0,05$).

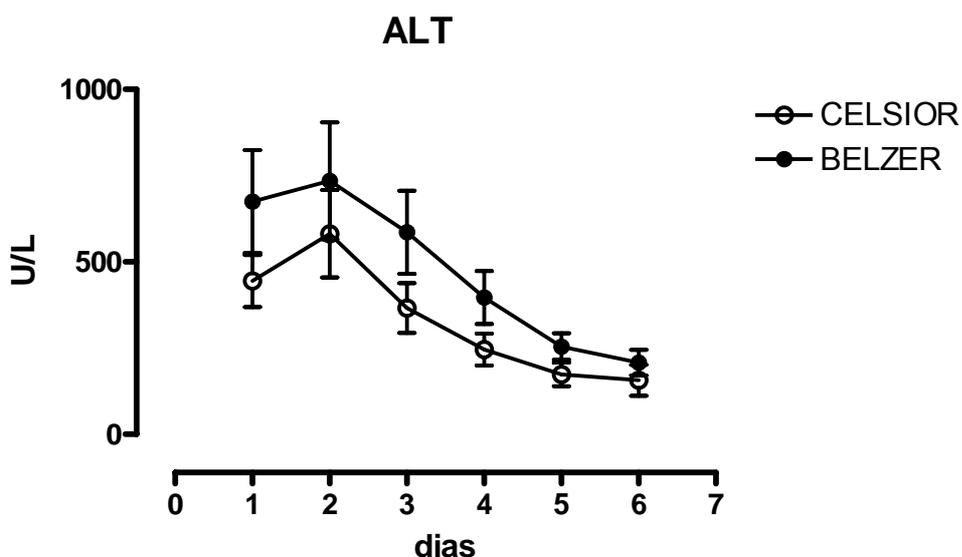


Figura 34: Níveis séricos da ALT, expressos em unidades por litro, nos primeiros 6 dias de pós-operatório, nos grupos Celsior e Belzer. Perfil das curvas dos pacientes vivos e dos óbitos foram semelhantes do ponto de vista estatístico. ($p > 0,05$).

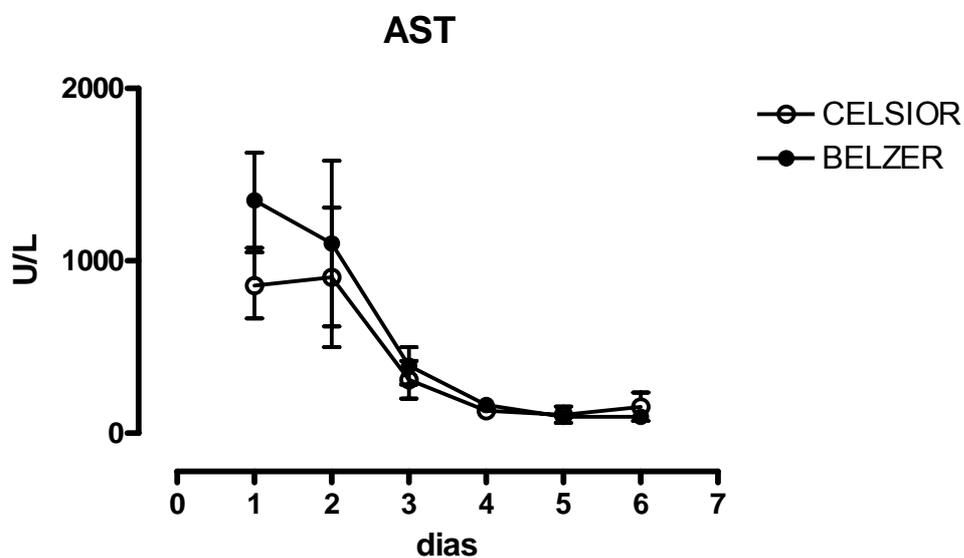


Figura 35: Níveis séricos da AST, expressos em unidades por litro, nos primeiros 6 dias de pós-operatório, nos grupos Celsior e Belzer. O perfil das curvas dos pacientes vivos e dos óbitos foram semelhantes do ponto de vista estatístico. ($p > 0,05$).

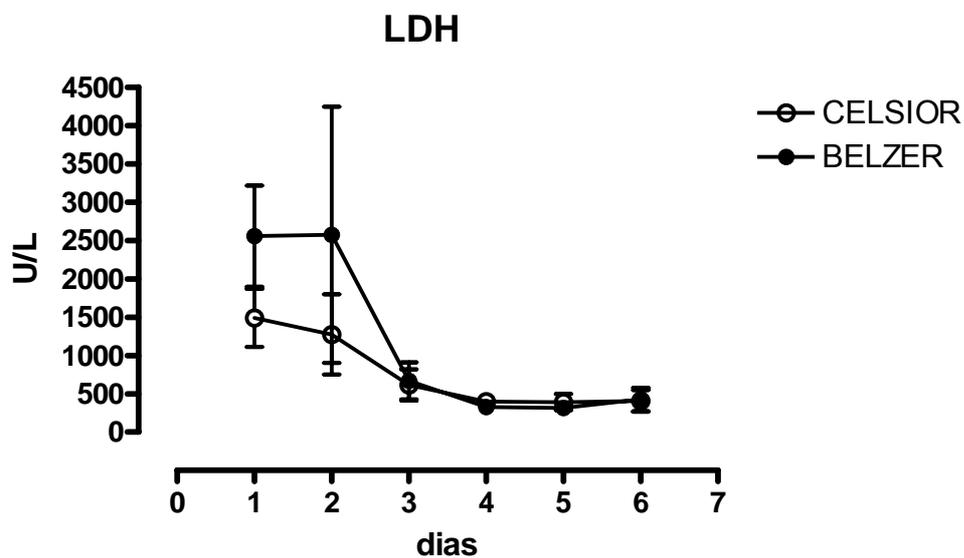


Figura 36: Níveis séricos da DHL, expressos em unidades por litro, nos primeiros 6 dias de pós-operatório, nos grupos Celsior e Belzer. O perfil das curvas dos pacientes vivos e dos óbitos foram semelhantes do ponto de vista estatístico. ($p > 0,05$).

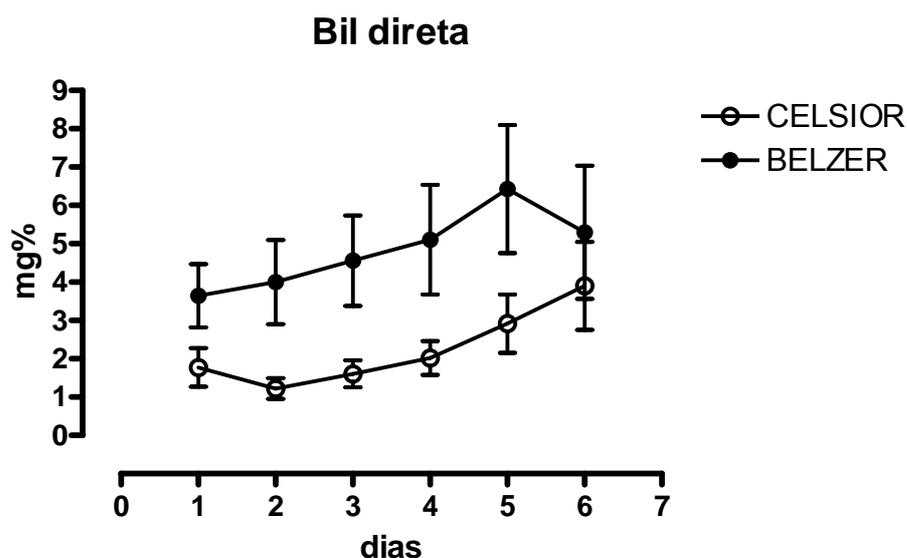


Figura 37: Níveis séricos da Bb D, expressos em miligramas por cento, nos primeiros 6 dias de pós-operatório, nos grupos Celsior e Belzer. O perfil das curvas dos pacientes vivos e dos óbitos foi semelhante do ponto de vista estatístico ($p > 0,05$).

Comparamos também a evolução bioquímica do enxerto hepático nos primeiros 6 dias do pós-operatório, através das dosagens bioquímicas da ALT, AST, DHL e Bb D, agora dividindo os pacientes conjuntamente dos grupos Celsior e Belzer, em vivos e mortos, demonstradas nas figuras 38, 39, 40 e 41, e observamos que não houve diferenças estatísticas significativas entre os 2 grupos ($p > 0,05$).

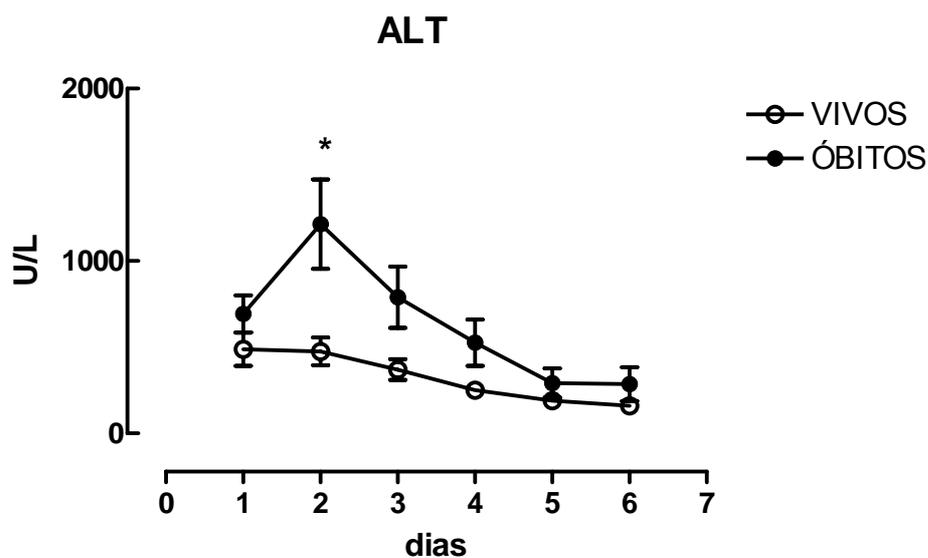


Figura 38: Níveis da Alanino-aminotransferase (ALT) no pós-operatório, expressos em unidades por litro, do primeiro ao sexto dia. O perfil das curvas dos pacientes vivos e dos óbitos foram semelhantes do ponto de vista estatístico. ($p > 0,05$). * Vivos vs óbitos (segundo dia de pós-operatório), $p < 0,05$.

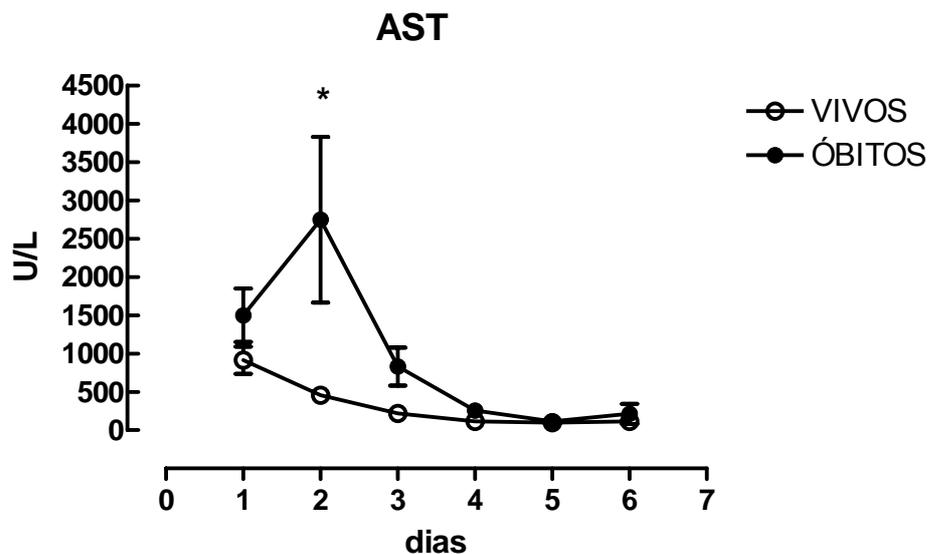


Figura 39: Níveis séricos da aspartato-aminotransferase expressos em unidades por litro, no pós-operatório, do primeiro ao sexto dia. O perfil das curvas dos pacientes vivos e dos óbitos foram semelhantes do ponto de vista estatístico. ($p > 0,05$). * Vivos vs óbitos (segundo pós-operatório), $p < 0,05$.

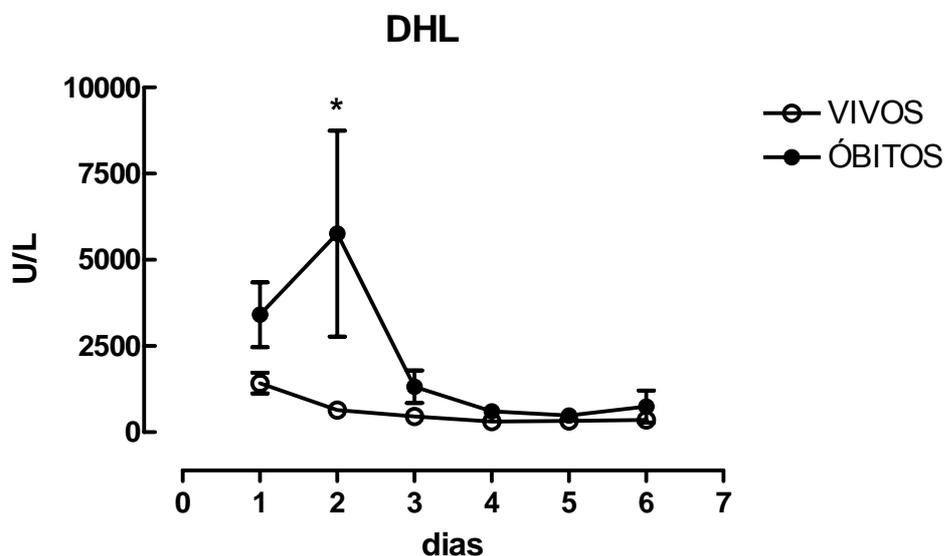


Figura 40: Níveis séricos do DHL, expressos em unidades por litro, nos primeiros 6 dias de pós-operatório, nos 2 grupos vivos e mortos. O perfil das curvas dos pacientes vivos e dos óbitos foram semelhantes do ponto de vista estatístico. ($p > 0,05$). * Vivos vs óbitos (segundo dia pós-operatório), $p < 0,05$.

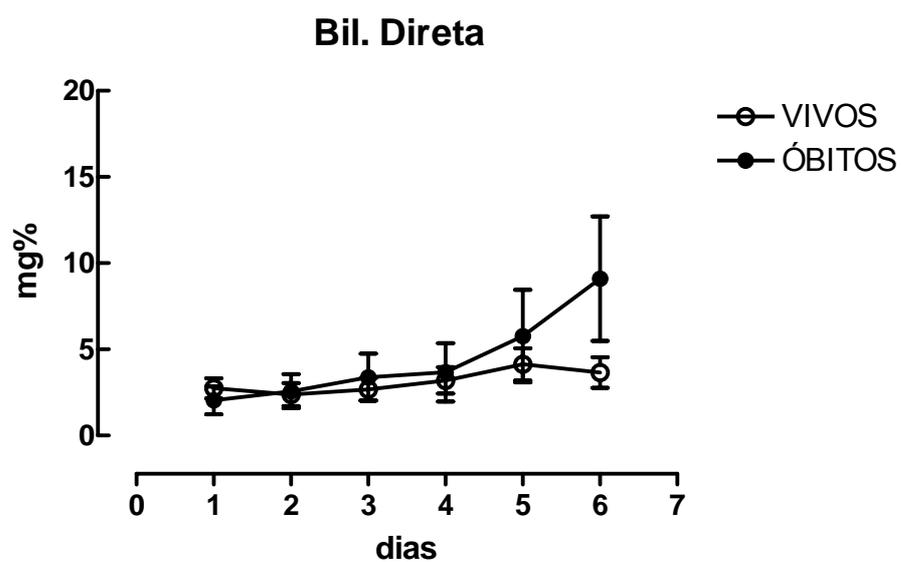


Figura 41: Níveis séricos da Bb D, expressos em miligramas por cento, nos primeiros 6 dias de pós-operatório, nos 2 grupos vivos e mortos. O perfil das curvas dos pacientes vivos e dos óbitos foram semelhantes do ponto de vista estatístico. ($p > 0,05$).

5. DISCUSSÃO

As técnicas ópticas para diagnóstico são extremamente atrativas, principalmente por serem procedimentos não invasivos e com potencial de fornecer resultado em tempo real. Vários grupos de pesquisa vêm investigando a eficiência das técnicas na detecção e no diagnóstico de diversos tipos de câncer, buscando um método que possa melhorar a detecção precoce de lesões malignas (BAGNATO et al, 2006; BAGNATO, 2008; BAGNATO et al, 2010).

Ao realizarmos análise da fluorescência, durante todo o procedimento de transplante, é preciso inicialmente construir um quadro físico-químico do que está ocorrendo. Com este quadro em mente, é possível visualizar tudo que a espectroscopia de fluorescência mostra a cada passo do processo.

Vamos iniciar descrevendo o que ocorre durante o procedimento. Inicialmente, temos o órgão no doador, na chamada condição inicial (Momento 1). Este órgão pode apresentar uma diversidade de condições que envolvem diferentes graus de esteatose, injúrias teciduais associadas. (MALHI and GORES, 2008; VANDARNIAN et al, 2008; CASTRO E SILVA, 2002; IMBER et al, 2002) Do ponto de vista tecidual, cada órgão tem uma vasta variabilidade de destruição de vasos, bem como pequenas variâncias na distribuição dos lóbulos e também variâncias relacionadas com a razão superfície-volume. Essa razão superfície-volume é essencialmente dependente da forma geométrica de sua massa (VOLLMAR and MENGER, 2009).

A visão externa do órgão, ou mesmo coletas de biópsias são observações estritamente superficiais. A vitalidade e a funcionalidade do órgão são, no entanto, grandemente dependentes das condições volumétricas do órgão, muito mais do que das condições superficiais. Os procedimentos de acompanhamento e avaliação do órgão são, portanto, indiretas, já que temos que inferir sobre condições internas. Mais do que isto, temos que relacionar as condições de funcionamento, e as probabilidades de falhas, com estas condições e observações superficiais.

Com base nestas observações, devemos iniciar nossas considerações com as características observadas durante a biópsia óptica ou fluorescência. Sendo observações de superfície elas revelam as características de periferia do órgão. Entretanto, os aspectos observados estão intimamente relacionados com o todo.

Em particular, a fluorescência fornece indícios sobre a superfície, através de um feixe de luz (no caso um comprimento de onda de 532 nm). Ao incidir no órgão, esta luz é absorvida e parcialmente reemitida. A absorção ocorre simultaneamente

com o espalhamento (mudança aleatória de propagação da luz), de modo que, à medida que a luz do feixe inicial propaga-se pelo órgão, ela vai atingindo uma distribuição tecidual. Uma parte da luz absorvida é devolvida na forma de fluorescência. Assim, a fluorescência ocorre ao longo da região iluminada. Uma vez que a absorção é muito grande, a quantidade de tecido atingida pela luz é pequena e, conseqüentemente há redução na fluorescência. Ao fluorescer, a luz proveniente dos vários pontos fluorescentes deve percorrer de volta o caminho para poder ser observada na superfície (BAGNATO, 2008).

A figura 42 mostra de forma simplificada a situação da medida da fluorescência quando temos grande absorção ou pequena absorção:

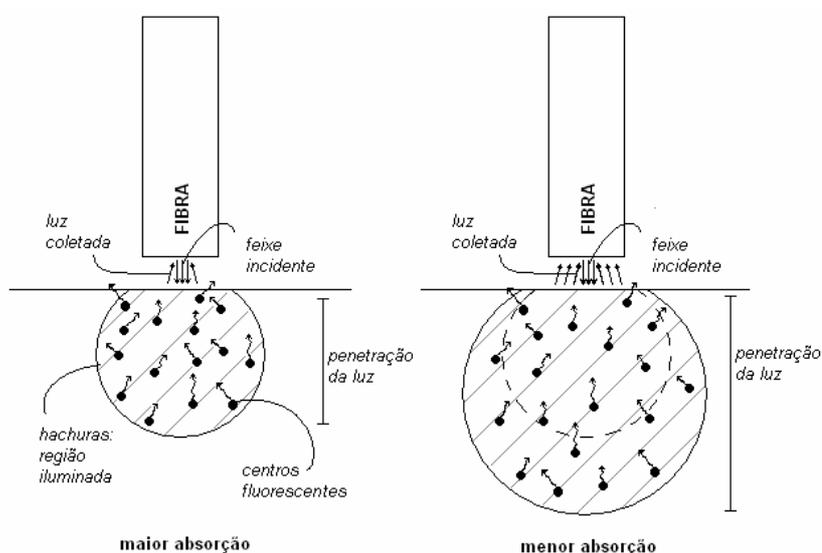


Figura 42: Níveis de fluorescência na presença de maior ou menor absorção.

O sangue é um grande absorvedor da luz verde (comprimento de 532 nm). Desta forma, sua quantidade e aproximação da superfície interferem de forma marcante na amplitude da luz de fluorescência.

A constituição bioquímica tecidual e sanguínea é a grande responsável pelas características espectrais da fluorescência. Isto é, enquanto a amplitude tem grande relação com a absorção e penetrabilidade, a forma do espectro (picos e largura) tem a ver com a constituição química do órgão estudado (VO-DINH et al, 1998).

Assim, discutiremos a auto-fluorescência, o espectro obtido em condições normais do órgão (figura 43).

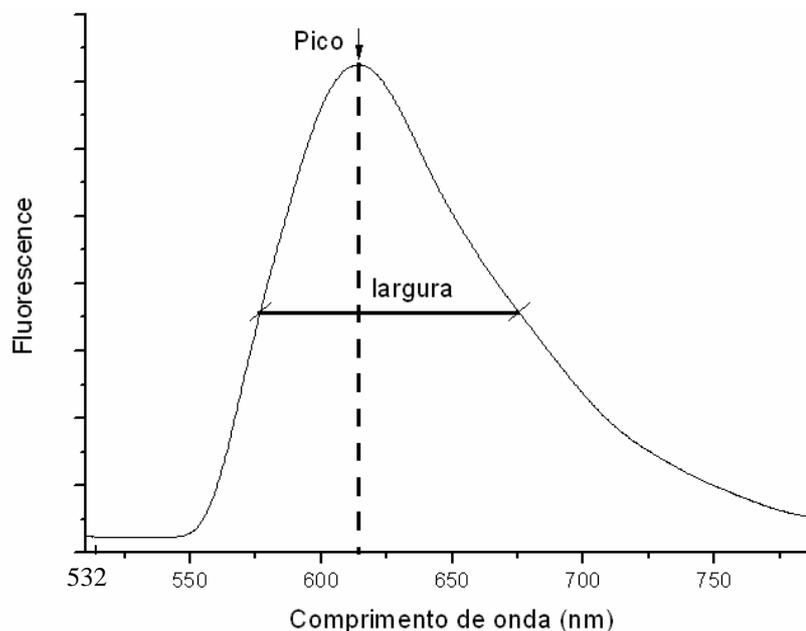


Figura 43: Padrão de autofluorescência obtido em condições normais do fígado.

Excitando o tecido com 532 nm, observamos um grande pico de fluorescência com máximo em torno de 620 nm estendendo-se além de 750 nm. Enquanto a amplitude geral do espectro depende grandemente das condições de absorção e penetrabilidade da luz, a forma do espectro que aqui será caracterizada pela sua largura, é fortemente representativa de sua composição bioquímica. Devido às variabilidades existentes no próprio órgão, cada posição pode ter uma amplitude levemente diferente. Se considerarmos todas as medidas realizadas de autofluorescência, observamos que, enquanto temos uma grande variabilidade de amplitudes num mesmo órgão, independentemente de estarmos olhando lóbulos diferentes, notamos uma baixa, ou estreita variação de largura. Este resultado nos mostra que as condições físicas de penetrabilidade da luz variam mais fortemente de parte a parte do fígado humano, enquanto sua constituição bioquímica, por outro lado é bastante homogênea. Uma possibilidade para esta observação é a concentração de vasos periféricos em cada localidade levando a diferentes concentrações de sangue (principal elemento absorvedor), o que resulta em variação de amplitude. Apesar dessa variabilidade do órgão, o padrão geral de autofluorescência corresponde à forma descrita na figura 43.

Grandes variações no padrão de fluorescência apresentadas na figura 43 podem indicar condições diferenciadas do fígado. A presença de uma excessiva

variação na largura espectral ou a presença de uma deformação na banda de emissão pode ser um indicativo forte de anomalias no órgão. Esta situação deve ser vista como possibilidade de complicação, já que representa uma condição bioquímica distinta da esperada. De todos os órgãos estudados neste trabalho, advindos de doadores pré-selecionados, não foram observadas grandes anomalias no momento 1 (auto-fluorescência), as quais merecem ser mencionadas. A largura espectral de meia- altura permaneceu ao redor de (100 +/- 15 nm).

O próximo estágio no procedimento é a perfusão a frio (momento 2). Nesta situação, ambas as soluções usadas têm a função de substituir o sangue presente no órgão, bem como evitar a ocorrência de grande troca de substâncias que possam comprometer a viabilidade do órgão durante o procedimento (CAVALLARI et al, 2003). Todos os espectros mostram um aumento da amplitude de fluorescência ao se fazer a perfusão a frio. Este aumento de fluorescência de cerca de 100% está associado ao fato de que grande parte do meio, predominantemente absorvedoras (sangue), foi removido do órgão. Como resultado disto, e de acordo com o que foi discutido inicialmente (figura 42), há um considerável aumento do volume de tecido excitado pela luz verde, com conseqüente aumento do retorno da luz fluorescente e, portanto, um aumento global da amplitude. Este aumento representa uma adequada perfusão fria, mesmo nas regiões mais periféricas do órgão. Sua ocorrência é um indicativo da adequada perfusão a frio. Os espectros com ambas as soluções, tanto Belzer como Celsior, devem sofrer aumento semelhante de amplitude. Um aumento excessivo de amplitude pode representar excessiva pressão na injeção da solução de preservação, com possíveis conseqüentes danos aos microvasos periféricos. Como nesta etapa houve apenas substituição do meio fortemente absorvedor, a largura espectral não deve ser fortemente alterada. Isto é, de fato, comprovado pelas medidas dos espectros em ambas as soluções. Nesta fase, o tecido não deve sofrer grandes alterações bioquímicas (JAESCHKE, 2003). Embora se espere que o procedimento de perfusão fria consiga atingir todas as partes do órgão de forma uniforme, isto não necessariamente ocorra, gerando certa dispersão dos dados.

Após esta fase, vem a fase do *back-table* (momento 3). Nela, o órgão começa a ser refrigerado para o transporte, e o espectro de fluorescência será aferido ao final, momentos antes do implante. Esta é uma fase onde ocorre acomodação da solução de preservação no órgão. Os vasos de menor calibre poderão durante este período sofrer uma continuidade de substituição do seu conteúdo de sangue, bem

como diluição pelo meio preservador. Em ambos os casos, uma nova diminuição do meio absorvedor deverá ocorrer. Como conseqüência, ocorrerá também uma capacidade de absorção de luz do órgão ainda mais intensa, com aumento de fluorescência. Este segundo aumento, dependerá consideravelmente de diversos fatores. A viscosidade do meio preservador determina sua capacidade de atingir os vasos mais superficiais, que normalmente são menores. Enquanto uma solução mais viscosa promoverá nesta fase um maior aumento da amplitude de fluorescência, já que não teve tempo, anteriormente, de penetrar completamente no tecido. Uma solução menos viscosa representará pouco aumento, já que provavelmente terá atingido os limites possíveis já na perfusão inicial. Isto explica a razão pela qual a solução de Belzer (maior viscosidade) mostra um maior aumento de fluorescência no momento 3 quando comparada com a solução de Celsior (menos viscosa). Embora isto seja o esperado com maior freqüência, representando normalidade do procedimento, é possível que, dependendo da densidade dos vasos superficiais, a sua contração com o meio gelado possa apresentar uma pequena diminuição de fluorescência no momento 3, como ocorreu em diversos casos. De qualquer forma, esta diminuição entre 2 e 3 não deve ser severa. Uma diminuição de amplitude de fluorescência severa pode significar uma “folga” ou “falha” da solução de preservação, ou causada por rompimentos ou algum tipo de embolia.

Ao se registrar a medida no momento 3, certamente houve tempo suficiente para que alguma alteração bioquímica possa ter ocorrido. Apesar das soluções de preservação serem desenvolvidas para diminuir ao máximo o metabolismo do órgão, evitando danos oxidativos, mantendo o trifosfato sobre condições anaeróbicas, e prevenindo assim alterações intracelulares, sempre ocorrerá um pouco dessas alterações (LOPEZ-ANDUJAR et al, 2009). O controle homeostático será levemente alterado pelas mudanças introduzidas pelo meio preservador como conseqüência, ocorrerá uma pequena alteração bioquímica indicada na fluorescência pela alteração da largura espectral. Isto de fato é notado com o emprego de ambas as soluções. Uma exagerada variação da largura de fluorescência nesta fase poderá significar alterações bioquímicas excessivas, com possíveis conseqüências nos estágios posteriores. De fato, alteração significativa na largura espectral nos momentos 2 e/ou 3 devem ser consideradas como sinal de alerta.

Ao se atingir o momento 4, onde a reperfusão é feita, ocorre o caminho inverso. Nesta fase o sangue do receptor, sob ação da própria pressão sistêmica,

deverá reocupar todo o espaço anteriormente ocupado pela solução preservadora ou pelo soro fisiológico utilizado no *flushing*. Esse *flushing* é realizado à temperatura ambiente, já promovendo por si só considerável variação de temperatura, mas a grande massa corpórea do fígado ainda representa capacidade térmica suficiente para que a variação global da temperatura do órgão ocorra numa escala de tempo mais lenta. Ao se permitir a reperfusão do sangue no receptor, o órgão começa a ser trazido rapidamente à temperatura corpórea, causando uma repentina dilatação dos vasos com subsequente aumento da permeabilidade do sangue. Isto faz com que, num tempo bastante curto, haja um considerável aumento do fluxo sanguíneo nas regiões periféricas. O aumento da absorção neste caso causa um decréscimo súbito da fluorescência, podendo mesmo atingir níveis inferiores ao da autofluorescência inicial. Uma queda muito acentuada da amplitude de fluorescência, relativa à autofluorescência, pode significar dano ao sistema de capilares periféricos. Como após este choque térmico à nível vascular a recuperação do órgão pode ser lenta, espera-se que, após algumas horas, uma situação de amplitude muito próxima à da autofluorescência deva ocorrer. Ao reperfundir sangue, diversas alterações bioquímicas deverão ocorrer (VARDANIAN et al, 2008), e uma variação perceptível na largura espectral deverá ser observada. A diminuição da largura significa que uma quantidade menor de moléculas fluorescentes é observada. A restituição deste equilíbrio é esperada, podendo, contudo, demorar tempos bastante longos de horas a dias, uma vez que os exames laboratoriais costumam a normalizar-se apenas após aproximadamente 1 semana. Com estas observações, podemos determinar um “padrão” de fluorescência que deva ocorrer durante o procedimento de transplante (figura 44).

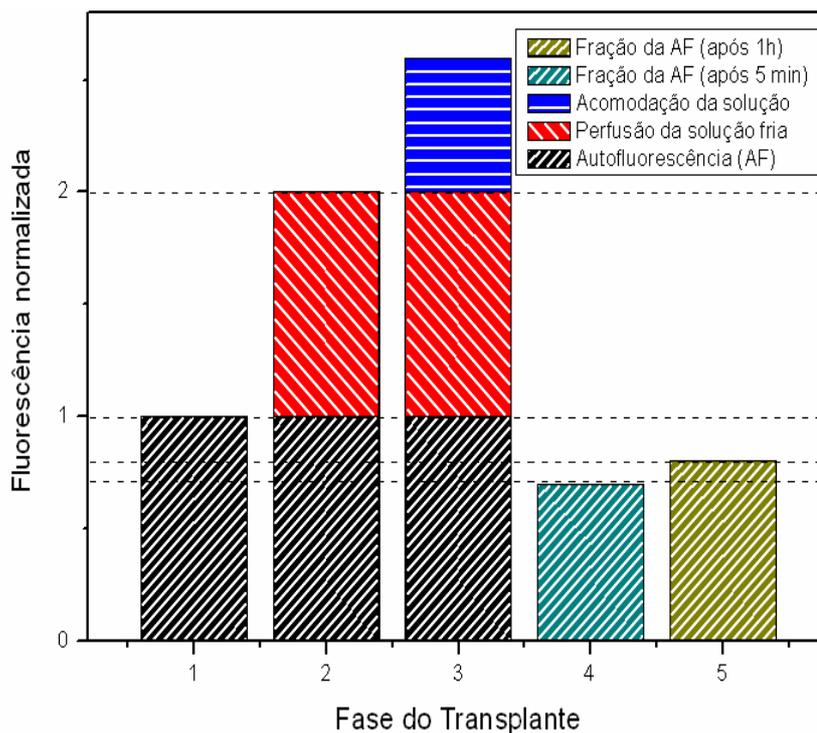


FIGURA 44: “Padrão” de fluorescência esperado durante o procedimento do transplante.

Chamando de “1” (momento 1) a amplitude de fluorescência inicial, espera-se um aumento no momento 2 com possibilidade de continuidade do aumento no momento 3. Como no momento 3 há uma acomodação do líquido preservador, a qual é fortemente dependente da distribuição de vasos e outras considerações anatômicas, podem ocorrer uma variabilidade de comportamentos aceitáveis. O momento 4 muito freqüentemente representará uma queda da amplitude abaixo daquela observada no momento 1. Esta queda pode ser maior ou menor dependendo também de diversas condições anatômicas.

Com relação à largura espectral, o padrão esperado envolve pequena alteração da largura inicial nos momentos 2 e 3 com leve queda nos momentos 4 e 5 (figura 45).

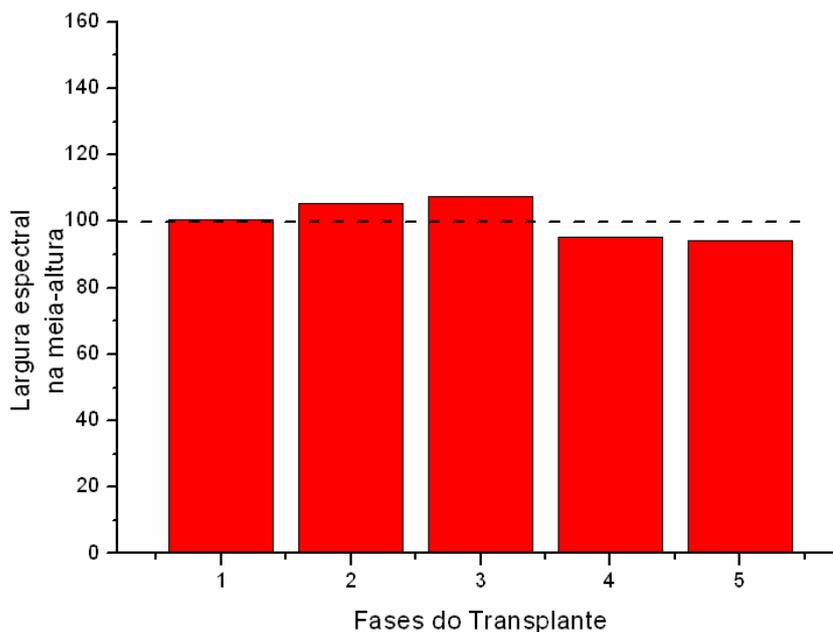


FIGURA 45: Variações da largura espectral nos 5 momentos do transplante de fígado.

Os pacientes analisados para o estabelecimento deste padrão de fluorescência tiveram em cada momento um acompanhamento histológico e bioquímico, mostrando que o padrão desenhado deve representar a normalidade como padrão de qualidade para o procedimento de transplante. Anomalias neste quadro podem representar alterações do órgão que podem ou não serem recuperáveis. A variação do padrão de normalidade deve ser acompanhada de forma muito mais cuidadosa.

Um exemplo de anormalidade pode ser observado no padrão de fluorescência do paciente LRO (figura 46). Ao se realizar o procedimento observa-se que, na perfusão fria do lado direito, ocorreu uma severa queda da fluorescência, seguida de uma recuperação no momento 3. Este comportamento da região superficial do órgão pode mostrar problema na perfusão, com consequências subsequentes.

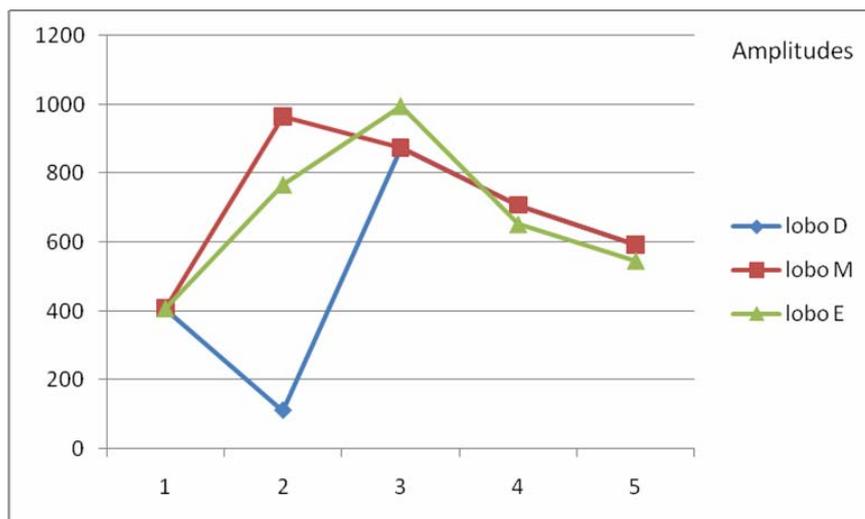


FIGURA 46: Padrão de fluorescência alterado no lobo direito do fígado, sugerindo uma perfusão fria inadequada neste lobo.

A maioria dos pacientes analisados obedeceu ao padrão de fluorescência, o que nos permite associar como “procedimentos adequados” nos vários momentos. Apesar disso, a percentagem de óbitos de 23% observada no trabalho, acreditamos que possam ter sido causadas por complicações pós-operatórias, não associadas ao procedimento cirúrgico “per se”. Isto nos mostra que segundo o critério adotado de padrões de fluorescência observado e desenvolvido neste trabalho, o ponto crucial de insucesso está associado ao pós-operatório.

Com relação à comparação entre as duas soluções usadas, observamos que a maior variação entre elas ocorre no momento 3, com um comportamento médio representando menor acomodação do meio no tecido. Isto deve ser principalmente associado com a viscosidade do meio.

Uma vez que podemos associar as variações da fluorescência com alterações físico-químicas no órgão durante os vários procedimentos, criamos uma nova janela de observação, que nos permite acompanhar o procedimento em tempo real. Esta capacidade de “graduar” o procedimento ao longo de seu acontecimento amplia o poder de observação e monitoramento do transplante e assim, o aumento das chances de sucesso.

Com base nos 31 casos onde os procedimentos foram monitorados, podemos observar que, na maioria dos casos, a equipe cirúrgica conseguiu manter o padrão de fluorescência superficial, classificado como estando dentro da normalidade.

Obviamente que pela natureza da medida, é observar a superfície e concluir a respeito do órgão como um todo. Detalhes são extremamente importantes. A possibilidade de excitar o tecido hepático em diferentes comprimentos de onda (no momento só foi utilizado o comprimento de 532 nm) poderá ampliar o leque de detalhes observáveis, e criar condições ainda mais seguras para quantificação da qualidade do procedimento. Mesmo que ainda necessitando de aperfeiçoamento, a técnica já permitiu estabelecer um padrão de normalidade do procedimento, dentro do qual pode-se descartar determinadas causas para complicações pós-operatórias.

A comprovação disto nos permite investir mais nos cuidados e procedimentos pós-operatórios, para que, quando possível, estas complicações possam ser evitadas, promovendo assim melhorias no índice de sucesso.

6. CONCLUSÃO

Os resultados em 31 pacientes submetidos ao transplante de fígado demonstram o potencial do uso da espectroscopia de fluorescência para monitorar a função do enxerto. A injúria tecidual induzida pela isquemia e reoxigenação pode ser detectada por mudanças na emissão da fluorescência quando comparada com o espectro da autofluorescência. Esta técnica pode ser importante na aplicação clínica devido à característica de poder fornecer informações de maneira não invasiva e em tempo real, úteis no auxílio dos cirurgiões e para o sucesso do transplante.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUNA, G.M. Marginal donors: a viable solution for organ shortage. **Transplant Proc.**, v.29, p.2579-64, 1997.

ADAM, R., ASTARCIOGLU, I., AZOULAY, D., MORINO, M., BAO, Y.M., CASTAING, D. Age greater than 50 years is not a contraindication for liver donation. **Transplant Proc.**, v.23, p.2602-03, 1991.

ADAM, R., REYNES, M., JOHANN, M. The outcome steatotic grafts in liver transplantation. **Transplant Proc.**, v.23 (part 2), p.1538-40, 1991.

ANGELICO, M. Donor liver steatosis and graft selection for liver transplantation: a short review. **Eur Rev Pharmacol Sci.**, v.9, p.295-300, 2005.

ARAI, M., MOCHILA, S., OHNO, A., FUJIWARA, K. Blood coagulation in the hepatic sinusoids as a contributing factor in liver injury following orthotopic liver transplantation in the rat. **Transplantation**, v.62, p.1398-1401, 1996.

BAGNATO, V.S. Detecção óptica no diagnóstico. In: KURACHI, C., VOLLET FILHO, J.D., BAGNATO, V.S. **Novas técnicas ópticas**. Primeira edição. São Carlos: Livraria da Física, 2008, p. 81-95.

BAGNATO, V.S., KURACHI, C., FERREIRA, J., CASTRO E SILVA, O., SANKARANKUTTY, A.K., ZUCOLOTO, S. New photonic Technologies for the treatment and diagnosis of hepatic diseases. An overview of the experimental work performed in collaboration, between Physics Institute of São Carlos and Ribeirão Preto Faculty of Medicine of the University of São Paulo. **Acta Cirúrgica Brasileira.**, v.21, p.3-11, 2006.

BAGNATO, V.S., KURACHI, C., CASTRO E SILVA, O. New perspectives for optical techniques in diagnostic and treatment of hepatic diseases. **Acta Cirúrgica Brasileira.**, 2010. In press.

BELZER, F.O., SOUTHARD, J.H. Principles of solid-organ preservation by cold storage. **Transplantation**, v.45, p.673-6, 1988.

BRICENO, J., MARCHAL, T., PADILLO, J., SOLÓRZANO, G., PERA, C. Influence of marginal donors on liver preservation injury. **Transplantation.**, v.74, p.522-26, 2002.

CASTRO E SILVA, O. Editorial Primeiro Transplante de Fígado em Ribeirão. **Revista de Medicina (FMUSP)**, v.34, p.119-20, 2001.

CASTRO E SILVA, O., SANKARANKUTTY, A.K., CORREA, R.B., FERREIRA, J., VOLLET FILHO, J.D., KURACHI, C., BAGNATO, V.S. Autofluorescence spectroscopy

in liver transplantation: Preliminary results from a pilot clinical study. **Transplant Proc.**, v.40, p. 722-5, 2008.

CASTRO E SILVA, O., ZUCOLOTO, S., MARCASSA, L.G., MARCASSA, J., KURACHI, C., MELO, C.A.S., RAMALHO, L.N.Z., RAMALHO, F.S., BAGNATO, V. Spectral response for laser enhancement in hepatic regeneration for hepatectomized rats. **Lasers in Surgery and Medicine.**, v.32, p.50-53, 2003.

CASTRO E SILVA, O., CENTURION, S., PACHECO, E.G., BRISOTTI, J.L., OLIVEIRA, A.F., SASSO, K. Aspectos básicos da lesão isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirúrgica Brasileira.**, v.17, p.96-100, 2002.

CAVALLARI, A., CILLO, U., NARDO, B., FILLIPONI, F., GRINGERI, E., MONTALTI, R., VISTOLI, F., D'AMICO, F., FAENZA, A., MOSCA, F., VITALE, A., D'AMICO, D. A multicenter pilot prospective study comparing Celsior and University of Wisconsin preserving solutions for use in liver transplantation. **Liver Transplantation**, v.9, p.814-21, 2003.

CHEONG, W., PRAHL, A.S., WELCH, A.J. A review of the optical properties of biological tissues. **IEEE Quan Elec.**, v.26, p.2166-85, 1990.

CLEMENS, M.G., ZHANG, J.X. Regulation of sinusoidal perfusion: in vivo methodology and control by endothelins. **Semin Liver Dis.**, v.19, p.383-96, 1999.

D'ALESSANDRO, A., KALAYOGLU, M., SOLLINGER, H., HOFFMANN, R.M., REED, A., KNECHTLE, S.J., PIRSCH, J.D., HAFEZ, G.R., LORENTZEN, D., BELZER, F.O. The predictive value of donor liver biopsies for the development of primary nonfunction after orthotopic liver transplantation. **Transplantation**, v.52, p.157-63, 1991.

GEORGAKOUDI, I., FELD, M.S., MULLER, M.G. **Intrinsic fluorescence spectroscopy of biological tissue.** In: MYCEK, M.A., POGUE, B.W. Handbook of medical fluorescence. New York, Marcel Dekker, 2003. Cap.4, p.109-42.

GLANTZOUNIS, G.K., SALACINSKI, H.J., YANG, W., DAVIDSON, B.R., SEIFALIAN, A.M. The conyemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemia-reperfusion injury: a review. **Liver Transplant.**, v.11, p.1031-47, 2005.

HENRY, J., CHIAMORI, N., GOLUB, O.J. Revsed spectrophotometry methods for determination of glutamic oxalacetic transaminase, and latic acid dehydrogenase . **Am J Clin Path.**, v.34, p.391-8, 1996.

IJAZ, S., YANG, W., WINSLET, M.C., SEIFALIAN, A.M. The role of nitric oxide in the modulation and tissue oxygenation in a experiment model of model of hepatic steatosis. **Microvasc Res.**, v.70, p.129-36, 2005.

IKEDA, T., YANAGA, K., KISHIKAWA, K., KAKIZOE, S., SHIMADA, M., SUGIMACHI, K. Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. **Hepatology**, v.16, p.454-61, 1992.

IMBER, J.C., PETER, S.D., HANDA, A., FRIEND, P.J. Hepatic steatosis and its relationship to transplantation. **Liver Transplantation**, v.8, p.415-423, 2002.

ISOZAKI, H., OKAJIMA, K., KOBAYASHI, M., HARA, H., AKINOMOTO, H. Experimental study of liver injury after partial hepatectomy with intermittent or continuous hepatic vascular occlusion. Differences in tolerance to ischemia between normal and cirrhotic livers. **Eur Surg Res.**, v.27, p.313-22, 1995.

JAESCHKE, H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. **American Journal Physiology Gastrointestinal liver Physiology**, v.284, p.15-26, 2003.

KOMATSU, H., KOO, A., GUTH, PH. Leukocyte flow dynamics in the rat liver microcirculation. **Microvas Res.**, v.40, p.1-13, 1990.

JAMIESON, N.V., SUNDBER, G.R., LINDELL, S. Successful 24-hour liver preservation: a preliminary report. **Proceedings of the international Organ Transplant Forum**, Pittsburg, EUA, p.74, 1987.

KLINTEBERG, C. **Photodynamic therapy and treatment of malignant tumours**. 1999. Tese de Doutorado, Lund Institute of Technology, Department of Physics, 1999.

KOMATSU, H., KOO, A., GUTH, P.H. Leukocyte flow dynamics in the rat liver microcirculation. **Microvas Res.**, v.40, p.1-13, 1990.

KOO, A., KOMATSU, H., TAO, G., INOUE, M., GUTH, P.H., KAPLOWITZ, N. Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: evidence for a role for superoxide anion. **Hepatology**, v.15, p.507-14, 1992.

KURACHI, C. **Espectroscopia de fluorescência na detecção de lesões quimicamente induzidas por agente carcinogênico na borda lateral da língua-estudo in vivo**. Tese apresentada à Área de Interunidades em Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo. Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato. São Carlos, 2005.

LANE, P.M., GILHULY, T., WHITEHEAD, P., ZENG, H., POH, C.F., N.G. S., WILLIAMS, P.M., ZHANG, L., ROSIN, M.P., MACAULAY, C.E. Simple device for the direct visualization of oral-cavity tissue fluorescence. **Journal of Biomedical Optics**, v.11, n.2, 024006, 2006.

LOPEZ-ANDUJAR, R., DEUSA, S., MONTALVÁ, E., JUAN, F.S., MOYA, A., PAREJA, E., DeJUAN, M., BERENQUER, M., PRIETO, M., MIR, J. Comparative prospective study of two liver graft preservation solutions: University of Wisconsin and Celsior. **Liver Transplantation**, v.15, p.1709-17, 2009.

MALI, H., GORES, G.J. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. **Gastroenterology**, v.134, p.1641-1654, 2008.

McCUSKEY, R.S. Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids. **Liver**, V.2000, p.3-7.

McCUSKEY, R.S., URBASCHEK, R., URBASCHEK, B. The microcirculation in during endotoxemia. **Cardiovas Res.**, v.32, p.752-63, 1996.

MELD (Model for End-Stage Liver Disease). MELD CALCULATOR in: www.unos.org/resources/meldcalculator.asp.

MIES, S. Transplante de fígado. **Rev Ass Med Brasil.**, v.44(2), p.127-134, 1998.

MOCHIDA, S., ARAI, M., OHNO, A., MASAKI, N., OGATA, I., FUJIWARA, K. Oxidative stress in hepatocytes and stimulatory state of Kupffer cells after reperfusion differ between warm and cold ischemia in rats. **Liver**, v.14, p.234-40, 1994.

MONTALDI, R., NARDO, B., BERTELLI, R., BELTEMPO, P., PUVIANI, L., VIVARELLI, M., CAVALLARI, A. Donor pool expansion in liver transplantation. **Transplant Proc.**, v.36, p.520-2, 2004.

NAKAMURA, S., NISHIYAMA, R., SERIZAWA, A., YOKOKI, Y., SUZUKI, S., KONNO, H. BABA, S., MURO, H. Hepatic release of endothelin-1 after warm ischemia. Reperfusion injury and its hemodynamic effect. **Transplantation**, v.59, p.679-84, 1995.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Liver Transplantation-June 20-23, 1983. **Hepatology**, v.4, p.107S-110S, 1984, Supplement 1.

OLIVEIRA, G.R., CASTRO E SILVA, O., SANKARAKUTTY, A.K., FERREIRA, J., KURACHI, C., ZUCOLOTO, S., VANNUCCHI, H., JORDÃO, A.A., MARCHINI, J.S.,

BAGNATO, V. Fluorescence spectroscopy to diagnose hepatic steatosis in rat model of fatty liver. **Liver international**, p. 331-6, 2009.

PANNEN, B.H., AL-ADILI, F., BAUER, M., CLEMENS, M.G., GEIGER, K.K. Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat. **Hepatology**, v.27, p.755-64, 1998.

PESCE, A.J. Lactate Dehydrogenase. In: KAPLAN, L.A.; Pesce, Chemistry Theory Analysis and correlation, 2. Ed. Philadelphia, C. V. Mosby Company. **Am J Clin.**, p.924-30, 1989.

PORTMANN, B., WIGHT, D. Pathology of liver transplantation. In: CALNE, R. **Liver Transplant.**, p.437, 1987.

RAMANUJAM, N. **Fluorescence spectroscopy in vivo**. In: MEYERS, R.A. Encyclopedia of Analytical Chemistry. Chichester, John Wiley & Sons Ltd, 2000. Pp.20-56.

RAMANUJAM, N. Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues. **Neoplasia**, v.2, n.1-2, p.89-117, 2000.

REDMOND, R.W. Introduction to Fluorescence and Photophysics. In: MYCEK, M., POGUE, B.W. **Handbook of Biomedical Fluorescence**. New York: Marcel-Dekker, 2003, Chap. 1, p.1-27.

RENZ, J.F., KIN, C., KINKHABWALA, M., JAN, D., VARADARAJAN, R., GOLDSTEIN, M., BROWN, R.J., EMOND, J.C. Utilization of extended donor criteria liver allografts maximizes donor use and patient access to liver transplantation. **Ann Surg.**, v.242, p.556-63, 2005.

RICHARDS-KOURTUM, R., DREZEK, R., SOKOLOV, K., PAVLOVA, I., FOLLEN, M. **Survey of endogenous biological fluorophores**. In: MYCEK, M., POGUE, B.W. Handbook of biomedical fluorescence. New York, Marcel Dekker, 2003. Cap.8, p.237-64.

ROCHA, M.B., BOIN, I.F., ESCANHOELA, C.A., BELTEMPO, P., PUVIANI, L., VIVARELLI, M., CAVALLARI, A. Can the use of marginal livers donors change recipient survival rate. **Transplant Proc.**, v.36, p.914-915, 2004.

SALIZZONI, M., FRANCHELLO, A., ZAMBONI, F., RICCHIUTI, A., COCCHIS, D., FOP, F., BRUNATI, A., CERUTTI, E. Marginal grafts: finding the correct treatment for fatty livers. **Transplant Int.**, v.16, p.486-93, 2003.

SANKARAKUTTY, A.K. **Aplicabilidade da espectroscopia de fluorescência induzida por laser na avaliação dos enxertos hepáticos.** Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Universidade de São Paulo- Departamento de Cirurgia e Anatomia. Orientador: Prof. Dr. Orlando de Castro e Silva Jr, 2004.

SANKARAKUTTY, A.K., CASTRO E SILVA, O., FERREIRA, J., SOUZA, M.E.J., GOMES, M.C., KURACHI, C., BAGNATO, V. Use of laser autofluorescence for evaluating grafts. **Laser Phys Lett.**, v.11, p.539-45, 2006.

SCUDERI, V., CERIELLO, P., MAIDA, G., ARAGIUSTO, G., ARENGA, T., CARFORA, M., DEFEZ, A., GIULIANI, G, G.N., MONTI, W., SANTANIELLO, F., SICIOLI, F., CALISE, F. The marginal donor: A single-center experience in orthotopic liver transplantation. **Transplant Proc.**, v.38, p.1069-73, 2006.

SELZNER, N., RUDIGER, H., GRAF, R., CLAVIEN, P.A. Protective strategies against ischemic injury of the liver. **Gastroenterology**, v.125, p.917-36, 2003.

SERRACINO-INGLOTT, F., HABIB, N.A., MATHIE, R.T. Hepatic ischemia-reperfusion injury. **Am J Surg.**, v.181 p.160-6, 2001.

SIMS, F.H., HORN, C. Some observations on powells methods for the determination of serum bilirrubin. **Am J Clin Path.**, v.29, p.412-7, 1958

STARZL, T.E., VAN THIEL, D., TZAKIS, A.G. Orthotopic liver transplantation for alcoholic cirrhosis. **JAMA**, V.260, P.2542-44, 1998.

TEKIN, K., IMBER, C.J., ATLI, M., GUNSON, B.K., BRAMHALL, S.R., MAYER, D., BUCKELS, J.A., McMASTER, P., MIRZA, D.F. A simple scoring system to evaluate the effects of cold ischemia on marginal livers donors. **Transplantation**, v.77, p.411-16, 2004.

TERAMOTO, K., BOWERS, J.L., KRUSKAL, J.B., CLOUSE, M.E. Hepatic microcirculatory changes after reperfusion in fatty and normal liver transplantation in the rat. **Transplantation**, v.56, p.1076-82, 1993.

TISONE, G., MANZIA, T.M., ZAZZA, S., De LIGUORI, C.N., CICERONI, C., De LUCA, I., TOTI, C., CASCIANI, C.U. Marginal donors in liver transplantation. **Transplantation**, v.36, p.525-6, 2004.

TOTSUKA, E., FUNG, U., HAKAMADA, K., TANAKA, M., TAKAHASHI, K., NAKAI, M., MOROHASHI, S., NISHIMURA, A., ISHIZAWA, Y., ONO, H., TOYOKI, Y., NARUMI, S., SASAKI, M. Analysis of clinical variables of donors and recipients with respect to short-

term graft outcome in huma liver transplantation. **Transplant Proc.**, v.36, p.2215-18, 2004.

TURKA, L.A. Historical overview. In: NORMAN, D.J., TURKA, L.A. **Primer on transplantation**. Second Edition. United States of America: American Society of Transplantation, 2001. p. 1-2.

URAMAKI, A., TODO, S., ZHU, Y., ZHANG, S., JIN, M.B., ISHIZAKI, N., SHIMAMURA, T., TOTSUKA, E., SUBBOTIN, V., LEE, R., STARZL, T.E. Attenuation of ischemic liver injury by monoclonal anti-endothelin antibody. **J Am Coll Surg.**, v. 185, p.358-64, 1997.

VARDANIAN, A.J., BUSUTTIL, R.W., KUPIEC-WEGLINSKI, J.W. Molecular mediators of liver ischemia and reperfusion injury: a brief review. **Mol Med.**, v.14, p.337-345, 2008.

VOLLMAR, B., GLASZ, J., LEIDER, R., POST, S., MENGER M.D. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver disfunction in warm ischemia-reperfusion. **Am J Pathol.**, v.145, p.1421-31, 1994.

VOLLMAR, B., MENGER, M.D. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. **Physiol Rev.**, v.89, p.1269-339, 2009.

VOLLMAR, B., RITCHER, S., MENGER M.D. Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. **Am J Physiol.**, v.270, p.789-803, 1996.

VON-DINH, T., PANJEHPOUR, M., OVERHOLT, B.F. Laser-induced fluorescence for esophageal cancer and dysplasia diagnosis. **Ann N Y Acad Sci.**, v.838, p.116-22, 1998.

WANG, I. **Photodynamic therapy and laser based diagnostic studies of malignant tumours**. 1999. Tese de Doutorado, Department of Oncology, Lund University Hospital, 1999.

WELCH, C. S. Liver graft. **Maroc Med.** v. 34, p.514-515. 1955.