

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

**ANÁLISE DOS NÍVEIS DO GLUTATIÃO HEPÁTICO, DA
FUNÇÃO E DOS DANOS HEPATOCELULARES EM
ENXERTOS ÓTIMOS E SUBÓTIMOS NO TRANSPLANTE
DE FÍGADO**

TOMAZ DE JESUS MARIA GREZZANA FILHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre
2003

**ANÁLISE DOS NÍVEIS DO GLUTATIÃO HEPÁTICO, DA
FUNÇÃO E DOS DANOS HEPATOCELULARES EM
ENXERTOS ÓTIMOS E SUBÓTIMOS NO TRANSPLANTE
DE FÍGADO**

TOMAZ DE JESUS MARIA GREZZANA FILHO

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Medicina:
Cirurgia da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Otávio Corso

Porto Alegre

2003

G745c Grezzana Filho, Tomaz de Jesus Maria
Análise dos níveis do glutatião hepático, da função e dos danos
hepatocelulares em enxertos ótimos e subótimos no transplante de fígado

Tomaz de Jesus Maria Grezzana Filho ; orient. Carlos Otávio
Corso. – 2003.
102 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do
Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em
Medicina : Cirurgia. Porto Alegre – RS, 2003.

1. Traumatismo por reperfusão 2. Transplante de fígado 3. Fígado :
Patologia 4. Glutathione I. Corso, Carlos Otávio II. Título.

NLM: QZ 170

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

*À Andréa, minha amada companheira de todos os momentos,
meu símbolo de admiração, de carinho e de ternura.*

*Aos meus pais, Tomaz e Marlize, pelo espírito e valorização do
conhecimento como maior legado que se pode transmitir.*

*Aos meus irmãos, Wilson e Luciane, ícones do esforço pessoal e
exemplos de obstinação para alcançar suas realizações.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que colaboraram para a conclusão desta dissertação, em particular:

Ao Dr. Carlos Otávio Corso, professor do Departamento de Anatomia Humana da UFRGS, pela sua constante disponibilidade, orientação e espírito científico.

Aos colegas do Grupo de Transplante Hepático da ISCMPA, pelo auxílio em diversas etapas da construção desta dissertação.

Ao laboratório de Fisiologia da UFRGS, nas pessoas de sua coordenadora Dra. Adriane Bellò-Klein, Dr. Alexander da Rosa Araújo e da técnica Tânia Regina Gattelli Fernandes, pelo excelente trabalho na mensuração do GSH e GSSG das amostras teciduais.

Ao laboratório de Patologia Experimental do HCPA, nas pessoas do Dr. Tadeu Cerski, e dos técnicos Flávia Giusti Grossmann, Neiva Copetti e Jorge Alberto Lopes, pela interpretação e confecção das lâminas.

À FAPERGS e ao Programa de Pós-Graduação em medicina: Cirurgia, pelo auxílio financeiro.

Aos pacientes que participaram deste estudo, em um momento tão delicado de suas vidas.

Não há nada mais tolo que o orgulho, nada mais duro e odioso que a intolerância, nada mais perigoso ou ridículo do que a vaidade.

Rui Barbosa

RESUMO

Introdução/Objetivos: Os mecanismos responsáveis pela disfunção inicial dos enxertos hepáticos não são completamente entendidos, embora grande parte dos danos seja decorrente do estresse oxidativo induzido pelo fenômeno de isquemia e reperfusão. Doadores com critérios expandidos de aceitação ou subótimos podem contribuir de modo significativo para o desenvolvimento de lesões isquêmicas graves no transplante de fígado. O antioxidante endógeno glutatião (GSH) é o agente de defesa mais importante para detoxificar radicais livres de oxigênio gerados na reperfusão. Contudo, esse efeito pode ser limitado pelas baixas concentrações de GSH ao término da preservação hipotérmica, tornando o órgão vulnerável à reperfusão, em particular nos doadores subótimos. Assim, o objetivo deste estudo foi de avaliar os níveis de GSH, GSSG e GSH/GSSG no tecido hepático antes e após a reperfusão e suas correlações com os danos e função hepáticos na fase inicial da reperfusão e nos cinco primeiros dias após o transplante em receptores de órgãos ótimos e subótimos. **Material e métodos:** 34 pacientes foram divididos em ótimos ou subótimos conforme o número de fatores de risco do doador. Biópsias hepáticas foram realizadas ao término da preservação hipotérmica e duas horas após o implante para medir as concentrações de GSH e GSSG no tecido hepático e calcular o índice de estresse oxidativo. Os níveis de ALT, AST e TP foram medidos por cinco dias e os níveis do fator V por três dias após o transplante. Os danos de reperfusão sobre a integridade do parênquima hepático foram analisados usando cinco parâmetros e correlacionados com os níveis de GSH e GSSG pré e pós-reperfusão. **Resultados:** Houve uma diminuição nos níveis globais de GSH ($p < 0,01$) e aumento nos níveis de GSSG ($p < 0,05$) após 2 horas de reperfusão quando comparado com os níveis encontrados ao término da preservação fria. Não foram encontradas diferenças significativas dos níveis de GSH, GSSG ou GSH/GSSG entre os grupos. Os escores de lesão histopatológica foram significativamente maiores no grupo subótimo ($p < 0,05$). Não foi demonstrada diferença significativa nos valores de AST e ALT entre os grupos. O escore de lesão histopatológica mostrou correlação com o TP no grupo total e com o fator V no grupo ótimo ($p < 0,05$). A análise multivariada apontou a esteatose no doador como o principal fator de risco para o aumento dos escores de lesão histopatológica ($p < 0,05$). **Conclusão:** O estresse oxidativo foi de grande intensidade após duas horas de reperfusão. Enxertos ótimos e subótimos apresentam comportamento semelhante frente ao estresse oxidativo. Neste estudo, a esteatose no doador foi o principal determinante das lesões hepáticas na reperfusão inicial.

ABSTRACT

Background/Aims: The mechanisms underlying the initial liver graft dysfunction are not completely understood, although much of the liver graft injury derives from the oxidative stress induced by the ischemia-reperfusion phenomena. Expanded criteria donors or suboptimal can contribute significantly to the development of severe ischemic injuries in liver transplant. The endogenous antioxidant glutathione (GSH) is the most important agent to detoxify oxygen reactive species generated after reperfusion. However, this effect might be limited by the low concentrations of GSH at the end of cold storage, switching the organ vulnerable to reperfusion, particularly in the suboptimal donors. Thus, the aim of this study was to evaluate the role of GSH tissue levels before and after two hours of reperfusion and its correlation with liver injury and function at the initial phase of the reperfusion and also five days after the liver transplant in recipients of optimal and suboptimal organs. **Material and methods:** 34 patients were divided in optimal and suboptimal groups according to the number of risk criteria from the donor. Liver biopsies were taken at the end of cold storage and two hours after reperfusion aiming to determine tissue concentrations of GSH and GSSG and to calculate the oxidative stress ratio (GSH/GSSG). The ALT, AST, and PT levels were measured during five days and factor V levels were measured three days following the transplant. The histopathological reperfusion injuries were analyzed using five parameters and correlated with the GSH and GSSG levels before and after reperfusion. **Results:** There was a decrease in GSH levels ($p < 0,01$) and increase of GSSG levels ($p < 0,05$) after 2 hours of reperfusion in comparison with base line values at the end of cold storage in both groups. No significant differences in the levels of GSH, GSSG or GSH/GSSH were found between the groups. Histopathological injury scores were significantly higher in the suboptimal group ($p < 0,05$). No significant difference in the levels of AST and ALT were demonstrated between the groups. The histopathological score showed correlation with PT in the total sample ($p < 0,05$) and with factor V in optimal group ($p < 0,05$). The multivariate analysis showed donor steatosis as the most important risk factor to increasing histopathological injury scores ($p < 0,05$). **Conclusion:** The oxidative stress was of great intensity after two hours of reperfusion. Optimal and suboptimal grafts showed similar behavior facing oxidative stress after cold storage and two hours after reperfusion in optimal and suboptimal liver donors. In this study, donor steatosis was the most important factor that promotes hepatocellular injury at initial reperfusion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Movimentos dos íons Na ⁺ e K ⁺ na disfunção da ATPase Na ⁺ /K ⁺	22
Figura 2	- Esquema gráfico da interação entre leucócitos e endotélio que ocorre nas veias pós-sinusoidais após a reperfusão	30
Figura 3	- Esquema gráfico das alterações celulares estruturais que ocorrem durante a preservação e reperfusão do fígado	32
Figura 4	- Seqüência das reações enzimáticas intracelulares envolvidas na formação dos radicais superóxido e peróxido de hidrogênio na reperfusão	34
Figura 5	- Estrutura molecular do GSH	39
Figura 6	- Fotografia da artéria hepática dissecada.....	49
Figura 7	- Veia porta e via biliar dissecadas	52
Figura 8	- Fígado ao término da isquemia fria.....	52
Figura 9	- Escore de Marginalidade nos grupos Subótimo e Ótimo	62
Figura 10	- Variações dos níveis de GSH pré e pós-reperfusão nos grupos Subótimo e Ótimo	65
Figura 11	- Variações dos níveis de GSSG pré e pós-reperfusão nos grupos Subótimo e Ótimo	66
Figura 12	- Variações do índice de estresse oxidativo pré e pós-reperfusão nos grupos Subótimo e Ótimo	67
Figura 13	- Escore de lesão histopatológica nos grupos Subótimo e Ótimo.....	68
Figura 14	- Fotomicrografia do fígado duas horas após a reperfusão.....	71

Figura 15 - Fotomicrografia do fígado duas horas após a reperfusão.....	72
Figura 16 - Variações nos níveis plasmáticos de ALT e AST nos cinco primeiros dias após o transplante.....	73
Figura 17 - Variações dos níveis plasmáticos de TP e Fator V nos primeiros cinco dias pós-transplante nos grupos Subótimo e Ótimo	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da solução de UW.....	24
Tabela 2 - Fatores que influenciam a qualidade e função do órgão transplantado.....	26
Tabela 3 - Equipamentos e métodos para a mensuração das provas hepáticas	57
Tabela 4 - Quantificação da lesão isquêmica	58
Tabela 5 - Fatores de risco em doadores Subótimos e Ótimos.....	61
Tabela 6 - Variáveis dos receptores nos grupos Subótimo e Ótimo	63
Tabela 7 - Escores de lesão histopatológica nos grupos Subótimo e Ótimo	69
Tabela 8 - Frequência dos graus de lesão nos grupos Subótimo e Ótimo	70
Tabela 9 - Análise bivariada nos grupos Subótimo e Ótimo.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	- Adenosina difosfato
ATP	- Adenosina trifosfato
ALT	- Alanino aminotransferase
AST	- Aspartato aminotransferase
CMV	- Citomegalovírus
Cr	- Creatinina
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
EC	- Euro-Collins
ET	- Endotelina
FA	- Fosfatase alcalina
GSH	- Glutatião reduzido
GSSG	- Glutatião oxidado
GSH/GSSG	- Índice de estresse oxidativo
γ GT	- Gama glutamil-transpeptidase
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
HOCl	- Ácido hipoclorídico
HIV	- Vírus da imunodeficiência humana

HCV	- Vírus da hepatite C
HBV	- Vírus da hepatite B
HTLV	- Vírus da leucemia de células T
ICAM-1	- Molécula de adesão intercelular 1
IL-1	- Interleucina 1
IPF	- Initial poor function
NAD	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NO	- Óxido nítrico
$^{\circ}\text{O}_2^-$	- Radical superóxido
$^{\circ}\text{OH}^-$	- Radical hidroxila
ONOO^-	- Peroxinitrito
PAF	- Fator de adesão plaquetária
PCR	- Parada cardiorrespiratória
PNF	- Primary nonfunction
RLO	- Radicais livres de oxigênio
SOD	- Superóxido dismutase
$\text{TNF-}\alpha$	- Fator de necrose tumoral- α
TP	- Tempo de protrombina
U	- Uréia
UW	- University of Wisconsin

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Histórico	16
1.2 A Disfunção do Enxerto Hepático.....	19
1.3 A Preservação de Órgãos	20
1.3.1 <i>Princípios da preservação de órgãos</i>	21
1.3.2 <i>O desenvolvimento da preservação hepática</i>	23
1.4 O Papel da Microcirculação no Dano de Isquemia e Reperusão	27
1.5 A Lesão de Reperusão, o Estresse Oxidativo e os Radicais Livres de Oxigênio .	33
1.6 O Glutatião e a Lesão de Reperusão	39
2 OBJETIVOS	45
2.1 Principal	45
2.2 Secundários	45
3 MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1 Alocação de Doadores.....	46
3.1.1 <i>Crterios de inclusão</i>	46
3.1.2 <i>Crterios de exclusão</i>	47
3.2 Seleção dos Receptores	47
3.3 Cirurgia de Captação e Seleção dos Grupos Ótimo e Subótimo.....	48
3.3.1 <i>Escore de Marginalidade</i>	50
3.4 Preparação para o Implante	51
3.5 Transplante Hepático.....	53
3.5.1 <i>Hepatectomia total</i>	53
3.5.2 <i>Implante</i>	53
3.6 Pós-Operatório.....	54
3.7 Primeira Biópsia	54
3.8 Segunda Biópsia	56
3.9 Mensurações de GSH, GSSG, Enzimas Hepáticas e Provas de Coagulação	56
3.10 Análise Histopatológica	57
3.11 Análise Estatística	59

4 RESULTADOS	60
4.1 Doadores.....	60
4.2 Receptores	62
4.3 GSH Tecidual	65
4.4 GSSG Tecidual.....	66
4.5 GSH/GSSG.....	67
4.6 Lesão Hepatocelular	68
4.7 Função Hepática.....	74
5 DISCUSSÃO	77
5.1 Mecanismos da Isquemia e Reperfusão	77
5.2 GSH e o Estresse Oxidativo em Enxertos Subótimos.....	80
5.3 Lesão Histopatológica	84
5.4 Variáveis do Doador Subótimo e os Danos de Reperfusão.....	86
5.5 Lesão Hepatocelular e Função dos Enxertos.....	89
5.6 Perspectivas para o Uso de Antioxidantes no Transplante Hepático	91
6 CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS	95
ANEXO	106

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

Os primeiros relatos a respeito do transplante hepático surgiram em 1955, quando Welch realizou transplantes de fígado heterotópicos em cães. Embora apresentasse êxito em algumas cirurgias, a maioria dos fígados implantados foi retirada precocemente em virtude de atrofia hepática decorrente do fluxo proveniente da circulação venosa sistêmica (cava inferior), sem o aporte sanguíneo fisiológico do sistema portal (WELCH, 1955).

Em 1958, Moore descreveu a técnica padronizada para realização de transplante canino ortotópico (MOORE, 1959). Um modelo semelhante foi aprimorado por Starzl, que realizou mais de duzentas intervenções em cães, antes da sua primeira tentativa em humanos (STARZL et al., 1960).

O primeiro transplante de fígado em humanos foi realizado por Starzl em 1º de março de 1963. O doador foi um paciente submetido à massagem cardíaca prolongada. A perfusão dos órgãos do doador foi feita com uma solução de glicose e heparina,

seguida de perfusão com solução de Ringer Lactato (STARZL et al., 1963). O tempo de isquemia total até o implante foi de sete horas e quarenta e cinco minutos. O receptor foi uma criança de três anos, portadora de atresia das vias biliares e obstrução da veia porta, que morreu devido ao sangramento antes de concluída a cirurgia.

A análise histopatológica do enxerto revelou áreas dispersas de hepatócitos preservados, porém a maioria apresentava autólise. O citoplasma possuía um aspecto borrado e havia ausência nuclear. Os sinusóides e veias centrilobulares mostravam dilatação importante (STARZL et al., 1963). Por essa análise, concluiu que um enxerto viável era o fator mais importante para o sucesso do transplante e que algum método de preservação deveria ser instituído logo após a retirada do órgão para evitar a lesão celular irreversível.

O segundo transplante em humanos também foi realizado por Starzl em cinco de maio de 1963. O tempo de isquemia total foi de duas horas e trinta e dois minutos e o paciente sobreviveu vinte e dois dias, mostrando inicialmente sinais de boa função do enxerto. A causa do óbito foi embolia pulmonar associada a sepsis. A análise do enxerto obtido na autópsia revelou uma arquitetura hepática preservada, com leve colestase, esteatose e uns poucos agregados mononucleares presentes em áreas periportais, sem rejeição (STARZL et al., 1963).

Nos anos seguintes, algumas equipes de transplante de fígado se formaram, porém os resultados iniciais não foram animadores. Pacientes com fígados cirróticos apresentavam tendências ao sangramento, infecções repetitivas e dificuldades no tratamento da insuficiência renal. Entretanto, na década de oitenta, a melhora das técnicas cirúrgicas, da anestesia, da seleção dos pacientes e dos cuidados pós-operatórios

desenvolveram-se de tal forma que uma longa sobrevivência dos pacientes pôde ser alcançada (HÖCKERSTEDT,1995).

Um grande avanço na história do transplante hepático foi a introdução da ciclosporina A por Jean Borel em 1980. Este derivado fúngico permitiu uma redução na incidência de rejeição aguda em todos os órgãos. Até então os regimes de imunossupressão eram baseados no uso de esteróides e azatioprina, desenvolvidos para o transplante renal (KAHAN et al., 1999). O novo impulso despertou o interesse sobre o procedimento e diversas equipes retomaram suas atividades. Contudo, apenas em 1983 foi realizada a primeira reunião de consenso promovida pelo National Institutes of Health, onde se estabeleceu que o transplante hepático deixava de ser um procedimento experimental, passando a ter caráter terapêutico (MADREY, 2001).

Em 1987 surgiu a solução de preservação da Universidade de Wisconsin (UW). A solução podia preservar o fígado por vinte e quatro horas, tempo significativamente maior que as oito horas permitidas com o uso da solução de Euro-Collins (EC). Assim, um procedimento de urgência pôde transformar-se em um procedimento “semi-eletivo”, possibilitando um melhor cuidado no preparo e na hemostasia do receptor, redução nos danos hepatocelulares e menor chance de trombose da artéria hepática (BELZER et al., 1987; KALAYOGLU et al.,1988; JAMIESON et al., 1988).

A evolução também aconteceu na técnica cirúrgica: Pichlmayr e colaboradores desenvolveram em 1988 o “Split Liver”, permitindo a divisão de um enxerto para dois receptores, enquanto Raia e colaboradores, em 1989, descreveram a técnica de cirurgia intervivos com implante de parte do fígado de doador aparentado. À medida que os resultados melhoravam, os critérios para alocação de doadores também se expandiam, permitindo que fígados não aproveitados em outras circunstâncias fossem utilizados. O

mesmo ocorreu com os receptores, onde os critérios e modelos prognósticos de gravidade permitiram alocar pacientes em lista com menores chances de sobrevivência para receber órgãos em um prazo menor (KEEFE, 2001).

Mesmo assim, o número de pacientes ingressando em lista de espera aumenta progressivamente. No final do primeiro semestre de 2002, dois mil setecentos e vinte e um pacientes aguardavam por um fígado nas listas de espera brasileiras, 515 mortes haviam sido registradas nas listas de espera e um total de 325 transplantes realizados (REGISTRO BRASILEIRO DE TRANSPLANTES, 2002).

1.2 A Disfunção do Enxerto Hepático

Na tentativa de expandir o número de doadores e diminuir os óbitos na lista de espera, enxertos considerados insatisfatórios devido a características desfavoráveis, tais como a idade avançada, esteatose, excessivo suporte inotrópico, paradas cardíacas ou internação prolongada em Unidade de Terapia Intensiva passaram a ser utilizados. Esses enxertos, considerados “subótimos”, apresentam uma frequência elevada de ausência de função primária em relação aos órgãos considerados ótimos (BUSQUETS et al., 2002; RULL et al., 2002). Essa síndrome é caracterizada por acentuada elevação nos níveis de aminotransferases, coagulopatia, acidose láctica, hiperglicemia e insuficiência renal aguda. A ausência de função primária significa que o paciente terá de ser retransplantado o mais breve possível. A frequência dessa síndrome é variável, alcançando taxas médias de 10%. Muitos investigadores têm associado a ausência de função primária com os danos de preservação e reperfusão, que são de maior magnitude nesses enxertos. Uma correlação direta entre o tempo de preservação e a ausência de função primária também foi estabelecida (JAESCHKE, 1996; BILBAO et al., 1997).

Além da síndrome de ausência de função primária, é freqüente a ocorrência de disfunção precoce. Essa forma de disfunção ocorre em 7 a 30% dos casos e, na maior parte das vezes, o fígado transplantado se recupera satisfatoriamente, embora apresente inicialmente elevação das provas de função hepática e coagulopatia. Entretanto, esses pacientes apresentam tempos de internação em UTI significativamente maiores, episódios de rejeição aguda e complicações nas vias biliares mais freqüentes, redução na sobrevida do enxerto, maior morbidade e mortalidade pós-transplante (JASSEM et al., 2000; RENTSCH et al., 2000; BRICEÑO et al., 2002).

A busca de uma melhor qualidade dos órgãos passou a ser uma questão imperiosa. O estudo dos mecanismos pelos quais esses fenômenos ocorrem ganharam popularidade entre os grupos transplantadores, na tentativa de intervir oportunamente e evitar a lesão que ocorre durante a morte encefálica, na preservação hipotérmica, durante o implante e na reperfusão do órgão (MENG et al., 2001). Para tanto, diversas estratégias têm sido empregadas, tais como a melhor preservação dos órgãos, manipulação da microcirculação e combate ao estresse oxidativo. Apesar disso, apenas alguns métodos ganharam validade e são utilizados na prática clínica. (SANCHEZ-URDAZPAL et al., 1993; BACHMANN et al., 1997).

1.3 A Preservação de Órgãos

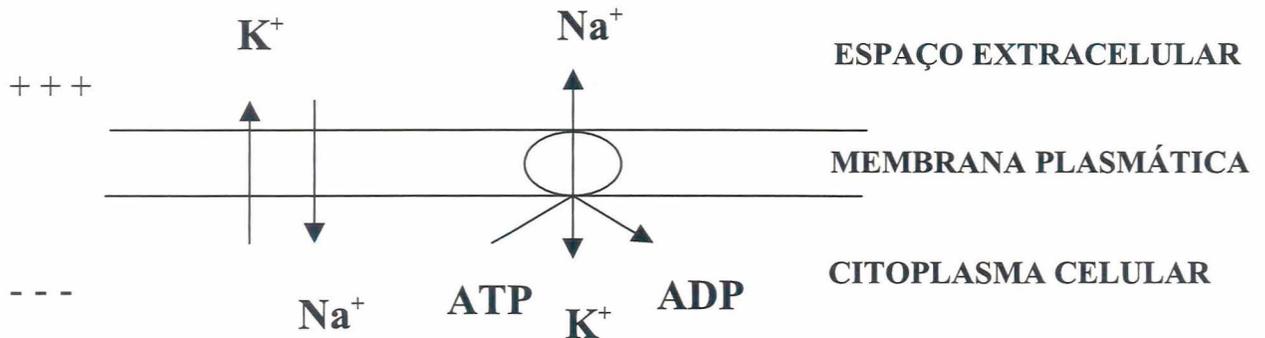
O objetivo de qualquer técnica de preservação é a proteção funcional satisfatória do órgão durante o período de interrupção da perfusão sangüínea, desde a retirada no doador até o implante e reperfusão no receptor. Vários fatores em diferentes momentos podem afetar a função de um órgão transplantado. Em primeiro lugar, pode haver dano prévio à retirada devido a períodos de hipoperfusão no doador. Secundariamente, eventos

celulares podem ocorrer durante o período de preservação em isquemia fria e, por fim, a restauração do fluxo sanguíneo no receptor pode ser seguida por dano de reperfusão devido a uma gama de mecanismos microcirculatórios, bioquímicos e imunológicos. Uma logística que permita a retirada segura do fígado, armazenamento adequado e técnicas de preservação são necessários para manter o órgão em condições ótimas. É essencial que a função imediata capaz de sustentar a vida seja restabelecida logo após o órgão ter sido revascularizado (JAMIESON, 1999).

1.3.1 *Princípios da preservação de órgãos*

A hipotermia é o principal método utilizado para a preservação de órgãos. O resfriamento a uma temperatura entre 0° e 4° C produz redução nas necessidades metabólicas, evitando os efeitos deletérios da estocagem abaixo de zero, onde a formação de cristais intracelulares pode produzir dano irreversível. Estudos têm demonstrado que ocorre uma diminuição de cerca de doze vezes na atividade enzimática como resultado da redução na temperatura do fígado de 37° para 0° C. Essa visão, contudo, subestima a complexidade físico-química das interações metabólicas no órgão hipotérmico e os efeitos próprios do resfriamento sobre esses processos interativos. Deve-se levar em consideração os movimentos passivos de íons através das membranas celulares que irão operar sob princípios químicos e termodinâmicos e que mostram uma relação linear com a temperatura (JAMIESON, 1999). A hipotermia provoca falha na homeostase responsável pela manutenção do volume celular em comparação ao estado de normotermia, onde bombas iônicas, tais como a ATPase Na^+/K^+ , exercem um papel crucial na manutenção dos gradientes intra e extracelulares. Quando a atividade da bomba ATPase Na^+/K^+ está diminuída durante a preservação hipotérmica, os íons Na^+

irão entrar no citoplasma das células, seguido pelos íons Cl^- e por água, resultando em edema e dano hepatocelular (CARINI et al., 1999). Este mecanismo é ilustrado na Figura 1.



Passagem passiva Transporte ativo

Figura 1 - Movimentos dos íons Na^+ e K^+ na disfunção da ATPase Na^+/K^+

A hipernatremia no doador é outra condição que aumenta a vulnerabilidade dos hepatócitos e está associada com disfunção no transplante clínico, enquanto sua correção antes da captação melhora a função do enxerto (CARINI et al., 1999; KUKAN et al., 2001).

Para manter os efeitos benéficos da hipotermia, enquanto minimiza-se os efeitos adversos da homeostase reduzida, soluções especialmente formuladas foram desenvolvidas para atenuar essas alterações físico-químicas. Esse “efeito de solução” é baseado principalmente no uso de substâncias impermeantes que irão permanecer no meio extracelular e, através desse mecanismo simples, impedir o edema celular, mesmo

na ausência de bombas iônicas funcionantes. Agentes farmacológicos podem também ser adicionados às soluções para reduzir o estresse oxidativo e garantir a estabilidade das membranas lisossômicas, atenuando o dano de reperfusão (JAMIESON, 1999).

1.3.2 O desenvolvimento da preservação hepática

Com o objetivo de diminuir as demandas metabólicas, Moore utilizou o resfriamento simples na superfície de fígados de cães com solução gelada (MOORE, 1959). Em seguida, Starzl introduziu uma técnica mais eficiente, que perfundia os grandes vasos do doador com solução gelada (STARZL et al., 1960). Essa técnica permaneceu parte central da atual prática de captação do fígado, utilizando canulação aórtica e portal. Dessa maneira foi possível obter um resfriamento rápido até 15° a 20° C com 3 a 4 litros de solução de preservação. Reduções adicionais na temperatura foram obtidas pelo efeito das soluções geladas sobre a superfície do órgão, até que se alcançassem temperaturas entre 0° e 4° C.

Em 1969, Collins relatou a primeira aplicação efetiva do “efeito de solução”, utilizando uma solução contendo glicose, fosfato e potássio, que mimetizava o líquido intracelular. A atividade da solução de Collins era baseada na presença de impermeantes, o que permitiu o aprimoramento de novas soluções com foco nesse princípio, inclusive uma solução mais simples, a Euro-Collins (EC), que devido ao baixo custo e simplicidade tornou-se popular, embora seja menos efetiva do que soluções mais novas (COLLINS et al., 1969).

Enfatizando o conceito dos impermeantes, Belzer desenvolveu na Universidade de Wisconsin uma nova solução. A solução, batizada de UW, foi desenvolvida para

preservação de pâncreas em cães, e relatos da sua eficiência no fígado e rins foram divulgados em seguida (BELZER et al., 1987). Um dos seus elementos, o lactobionato substitui o íon cloreto e, em combinação com o trissacarídeo rafinose, foi efetivo em prevenir o edema celular (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição da solução UW

Solução UW	
Lactobionato	100 mmol/L
Amido hidroxietílico	50 g/L
Rafinose	3 mmol/L
Adenosina	5 mmol/L
Glutatião	3 mmol/L
Dexametasona	8 mg/L
Insulina	100 U/L
Alopurinol	30 mmol/L
NaKH ₂ PO ₄	25 mmol/L
Sulfametoxazol-trimetoprim	0.5 ml/L
Na ⁺	30 mmol/L
K ⁺	120 mmol/L
MgSO ₄	5 mmol/L
PH	7.4
Osmolaridade	310-330 mosm/L

A solução UW provocou um grande impacto clínico, ao permitir uma preservação do fígado por até 24 horas (KALAYOGLU et al., 1988). Entretanto, independente do tipo de solução utilizada, tem sido demonstrado que períodos superiores a dezesseis horas aumentam o risco de disfunção precoce. Diversos relatos clínicos têm observado correlação do tempo de isquemia fria com o surgimento de estenoses biliares tardias

(ADAM et al., 1992; SANCHEZ-URDAZPAL et al., 1992; BUSQUETS et al., 2002). Trabalhos iniciais mostraram o papel independente dos componentes da solução UW, sendo demonstrados como de maior importância o lactobionato, a rafinose e o glutatião (GSH), este último desempenhando um papel central como antioxidante (JAMIESON et al., 1999).

Os efeitos de longos períodos de preservação agravam quaisquer lesões e disfunções pré-existentes no doador. Assim, a longa permanência em UTI, dependência de medicações inotrópicas, infiltração gordurosa, parada cardiorrespiratória ou hipotensão, são fatores de risco que comprometem a viabilidade do enxerto na reperfusão (Tabela 2). Todavia, devido à escassez de doadores, têm-se utilizado cada vez mais órgãos de qualidade duvidosa. Portanto, proteger o enxerto hepático contra o dano de isquemia e reperfusão poderia diminuir a taxa de complicações relacionadas com a preservação e, mais ainda, poderia aumentar o número de órgãos disponíveis para transplante hepático (BILZER et al., 2000).

Muito esforço tem sido devotado para tentar prever através de algum parâmetro a função subsequente do enxerto, porém os resultados ainda são precários (ADAM et al., 1993a; REDING et al., 1993). Pesquisa experimental têm demonstrado que animais em morte encefálica apresentam importantes variações hemodinâmicas e na microcirculação hepática, caracterizadas por uma intensa atividade autonômica, seguida de ativação das interações entre leucócitos e endotélio, má perfusão sinusoidal e consequente disfunção do fígado e redução da sobrevida (OKAMOTO et al., 1999; VAN DER HOEVEN et al., 2001).

Tabela 2 - Fatores que influenciam a qualidade e função do órgão transplantado

1. Fatores do doador
<ul style="list-style-type: none"> a) Doença pré-existente b) Hipotensão ou dependência inotrópica c) Parada cardíaca e períodos de hipoperfusão d) Hipóxia e) Intoxicação por drogas f) Tempo de internação em UTI prolongado g) Manejo do diabetes insípido e da hiponatremia/hipernatremia h) Status nutricional i) Status hormonal seguindo a morte encefálica j) Isquemia quente durante a retirada
2. Condições de armazenamento
<ul style="list-style-type: none"> a) Tipo de solução utilizada b) Técnica utilizada (perfusão simples ou mecânica) c) Temperatura d) Duração
3. Implante
<ul style="list-style-type: none"> a) Reaquecimento durante o implante b) Efeitos da reperfusão <ul style="list-style-type: none"> I. Ativação de polimorfonucleares e células de Kupffer <ul style="list-style-type: none"> i. Formação de radicais livres ii. Liberação de citoquinas iii. Ativação do complemento iv. Vasodilatação pelo óxido nítrico v. Influxo de cálcio c) Complicações das técnicas vasculares

Experimentos que estudam a manipulação dos doadores a fim de melhorar a qualidade dos enxertos têm sido esparsos e com resultados contraditórios. A preservação de órgãos de ratos submetidos a jejum prolongado demonstrou ser superior a períodos de jejum curto. Porém, o aumento do conteúdo de glicogênio tem-se mostrado como benéfico no homem e a hiperalimentação do doador tem sido recomendada (ADAM et al., 1993b; SANKARY et al., 1995).

O condicionamento do doador através do uso de drogas como a pentoxifilina, verapamil, epoprostenol, s-adenosilmetionina e ciclosporina têm mostrado melhora da microcirculação do enxerto hepático em estudos experimentais (HAYASHI et al., 1991; STEIN et al., 1993; ANTHUBER et al., 1996; NISHIZAWA et al., 1997; DUNNE et al., 1997). Da mesma forma, o bloqueio da atividade das células de Kupffer, responsável pela liberação de citocinas e radicais livres de oxigênio (RLO) tem sido estudado como possível método de reduzir os efeitos deletérios da reperfusão sobre o endotélio e hepatócitos (KUKAN et al., 1997; IMAMURA et al., 1995).

1.4 O Papel da Microcirculação no Dano de Isquemia e Reperfusão

Vários estudos têm observado duas fases de dano hepático seguindo isquemia e reperfusão. Uma fase precoce se desenvolve no curso das primeiras três horas, enquanto uma fase tardia se inicia entre quatro e seis horas e permanece por mais de vinte e quatro horas após a reperfusão. Os danos hepatocelulares que ocorrem na primeira fase manifestam-se por uma elevação nos níveis das aminotransferases. Vários investigadores têm demonstrado que essa fase precoce é mediada através de mecanismos que liberam RLO, correlacionados com a ativação das células de Kupffer (POST et al., 1995; JAESCHKE, 1996). A redução desses efeitos pode ser realizada pela adição de antioxidantes ou bloqueio das células de Kupffer (KUKAN et al., 1997). A fase tardia, no entanto, é caracterizada pelo grande seqüestro de neutrófilos, atinge seu pico em vinte e quatro horas e pode ser atenuada com a utilização de anticorpos anti-neutrofílicos (COLLETTI et al., 1996; SASAKI et al., 2001).

Períodos prolongados de isquemia, seguidos por reperfusão são caracterizados por dois eventos microvasculares distintos, conhecidos como “No-Reflow” (falha de

perfusão capilar primária) e “Reflow-Paradox” (aderência de leucócitos, liberação de mediadores tóxicos e perda da integridade endotelial) (MENGER et al., 1992a; MENGER et al., 1992b).

O “No Reflow” é causado pelo edema endotelial, hemoconcentração, vasoconstrição, aprisionamento de leucócitos e agregação plaquetária nos sinusóides, com subsequente falha da microcirculação nas fases iniciais da reperfusão (SERRACINO-INGLOT et al., 2001). A preservação hipotérmica e a reperfusão provocam alterações ultra-estruturais que se tornam mais proeminentes com o aumento do tempo de preservação. Essas incluem o alargamento das fenestrações endoteliais, vacuolização endotelial, eliminação de partes do hepatócito na microcirculação (“bolhas”) e desnudamento do endotélio. Este último é provocado por proteases, gelatinases e metaloproteinases. Curiosamente, o lactobionato e o GSH presentes na solução UW são potentes inibidores de gelatinases, o que pode explicar sua superioridade na preservação do endotélio em relação às outras soluções (BILZER et al., 2000; UPADHYA et al., 2000). Tem-se demonstrado que a vasoconstrição sinusoidal é o resultado da deterioração no balanço entre as ações vasodilatadoras do óxido nítrico (NO) e as ações vasoconstritoras da endotelina (ET). Nos estágios precoces da reperfusão, foi demonstrado que os níveis de ET encontram-se aumentados, enquanto as concentrações de NO estão diminuídas, resultado dos baixos níveis de NADPH e oxigênio, cofatores para a sua síntese (STEWART et al., 1999). Assim, o estreitamento da luz sinusoidal dificulta e até mesmo pode impedir a passagem dos leucócitos (SAWAYA et al., 1999). Os leucócitos estagnados, embora incapazes de ocluir o lúmen sinusoidal, contribuem para a redução do fluxo sinusoidal na microcirculação hepática (BILZER et al., 1994; RENTSCH et al., 2000; VOLLMAR et al., 1996). Esse efeito possivelmente prolonga o período de hipóxia, com áreas do fígado permanecendo

isquêmicas após o início da reperfusão. Existe, entretanto, uma possível contribuição de RLO produzidos pelos neutrófilos na falha da microcirculação, além dos efeitos mecânicos, pois a reperfusão de fígados preservados em solução que utilizaram GSH resultou em um aumento da pressão portal após a reperfusão (BILZER et al., 1999). Um efeito similar nas pressões portais foi observado em fígados de ratos perfundidos com ativação seletiva das células de Kupffer. Esse efeito foi revertido pela administração de antioxidantes, indicando que o estresse oxidativo produzido pelas células de Kupffer durante a reperfusão pode causar falha de perfusão por mecanismos independentes da obstrução sinusoidal por granulócitos (BILZER et al., 1994). Esses achados favorecem o uso de antioxidantes como uma estratégia para a prevenção da falha microcirculatória nos enxertos hepáticos (BILZER et al., 1998).

O “Reflow-Paradox” é um mecanismo complexo, caracterizado por uma sobreposição de eventos que incluem a participação de diversas citocinas inflamatórias e um aumento das interações entre neutrófilos e endotélio como característica principal. Na primeira fase ocorre a ativação dos neutrófilos e endotélio com diminuição da velocidade dos neutrófilos na circulação e contatos ocasionais com o endotélio, fenômeno conhecido como rolamento ou “rolling”. Este evento é mediado pelas Selectinas, moléculas de adesão celular. A L-selectina é um receptor expresso continuamente sobre os leucócitos, pode ter sua expressão e avidéz rapidamente aumentadas. A P-selectina e a E-selectina são encontradas na superfície do endotélio e somente se expressam quando o endotélio está ativado, como na isquemia e reperfusão. A segunda fase é caracterizada pela adesão firme do leucócito ao endotélio, através da interação de β -integrinas do leucócito com imunoglobulinas do endotélio, principalmente a ICAM-1. A migração para o tecido é o terceiro passo. Esse mecanismo seqüencial de rolamento, adesão e migração ocorre nas vênulas pós-sinusoidais, mas não foi claramente

caracterizado nos sinusóides (CORSO et al., 1999). O aumento da expressão dessas moléculas de adesão pode ser induzido por citocinas pró-inflamatórias tais como o TNF- α e a IL-1, e também por RLO (SERRACINO-INGLOT et al., 2001). Foi demonstrado que anticorpos dirigidos contra a ICAM-1 reduzem significativamente o rolamento pós-isquêmico e a aderência firme dos leucócitos dentro das veias pós-sinusoidais em modelos de transplante hepático em roedores (RENTSCH et al., 2000; BEN-ARI et al., 2002). Embora a interação leucócito-endotélio tenha seu início ainda na fase de isquemia, uma contribuição significativa somente é encontrada depois de transcorridas algumas horas de reperfusão. Esse tempo é necessário para que ocorra a aderência de neutrófilos ao endotélio das veias pós-sinusoidais, migração, liberação de mediadores pró-inflamatórios no tecido e ataque às células do parênquima hepático (JAESCHKE et al., 1996). (Figura 2)

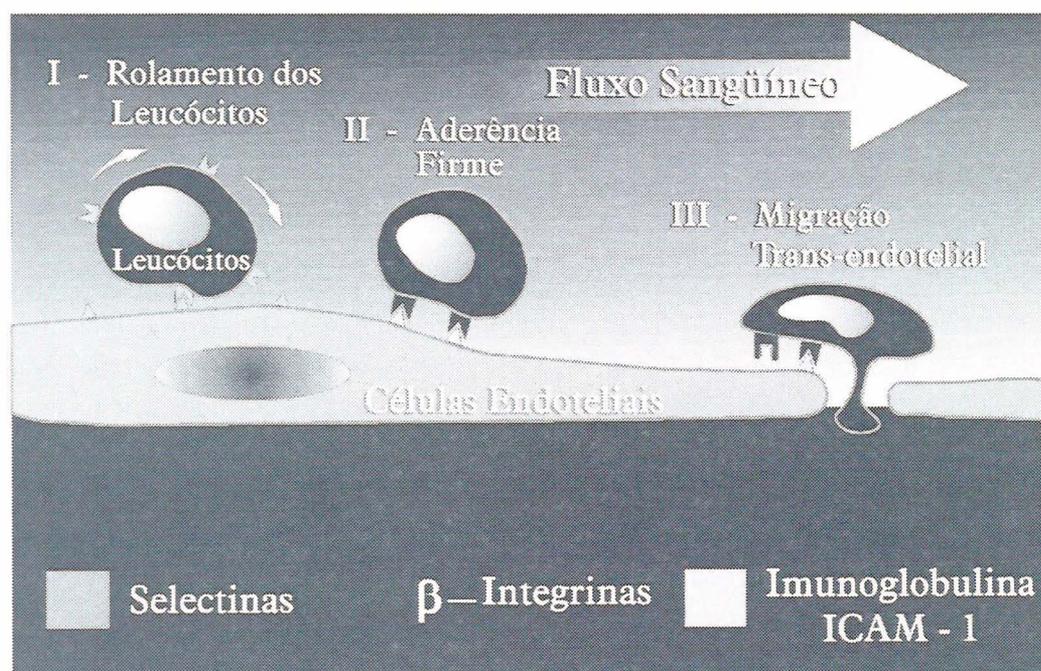
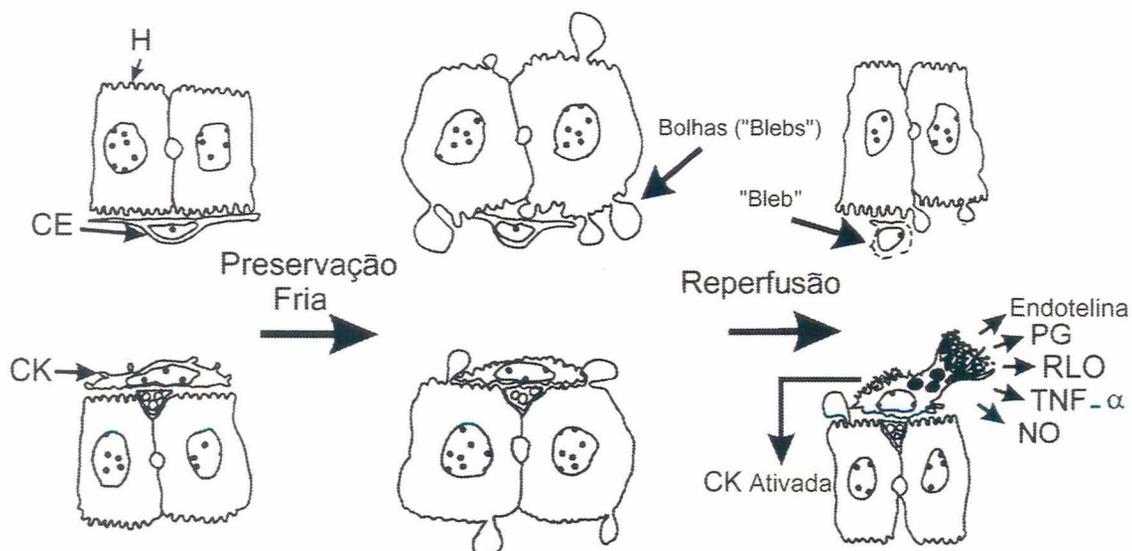


Figura 2 - Esquema gráfico da interação entre leucócitos e endotélio que ocorre nas veias pós-sinusoidais após a reperfusão

A consequência final da reperfusão é a desintegração do revestimento endotelial, com formação de edema intersticial devido à ação citotóxica de RLO e mediadores liberados pelos leucócitos aderentes ativados (MENGER et al., 1992b). A desnudação do endotélio sinusoidal observada após preservação fria deixa os hepatócitos acessíveis aos neutrófilos, enquanto uma camada endotelial intacta necessita de migração (BILZER et al., 2000). O componente inflamatório dos danos de reperfusão no transplante hepático envolve também macrófagos, em particular células de Kupffer. Existe substancial evidência que na reperfusão após isquemia fria, essas células entram em atividade minutos após a reoxigenação e que essa atividade está associada com depressão da função hepatocelular (POST et al., 1992). Paralelamente ao que é conhecido sobre a ativação dos leucócitos, uma apropriada proteção com antioxidantes resultou em significativa diminuição da resposta agressiva pelas células de Kupffer e melhora da função do fígado (POST et al., 1993). Alguns investigadores mostraram que a inibição das células de Kupffer impede a deterioração endotelial, reduz os distúrbios microcirculatórios, melhora o fluxo sanguíneo e a sobrevida do enxerto (KUKAN et al., 2001) (Figura 3).

Diversos estudos avaliaram a relação entre a perfusão sinusoidal e a função secretora dos hepatócitos após transplante hepático experimental. Esses estudos sugerem que a função secretora hepática pode estar seriamente danificada, mesmo sem significantes distúrbios da microcirculação, e que outros mecanismos, à medida que o tempo de isquemia fria aumenta, podem estar envolvidos na disfunção hepática (POST et al., 1994; POST et al., 1995; KOEPEL et al., 1996).



Nota: H- hepatócito, CE- célula endotelial, CK- célula de Kupffer, PG- prostaglandinas, RLO- radicais livres de oxigênio, TNF- α – fator de necrose tumoral - α , NO- óxido nítrico.

Adaptado de Madrey, 3ª ed.

Figura 3 - Esquema gráfico das alterações celulares estruturais que ocorrem durante a preservação e reperfusão do fígado

Estudos mostram que durante períodos de preservação prolongada, as funções hepatocitárias são consideravelmente comprometidas pelo reaquecimento, pela congestão sinusoidal devido ao edema dos hepatócitos e pela congestão portal que ocorre no implante. Esse último pode ser um fator independente, pois a construção de “shunt” para aliviar a pressão portal melhorou o status energético das células e a sobrevivência dos animais (MARUBAYASHI et al., 1980; SANKARY et al., 1999).

1.5 A Lesão de Reperfusão, o Estresse Oxidativo e os Radicais Livres de Oxigênio

O uso do termo isquemia significa insuficiência de suprimento sanguíneo. No contexto da preservação de órgãos, isquemia significa a ausência completa da circulação sanguínea. A patogênese não repousa somente na baixa disponibilidade de fosfatos ricos em energia com déficit crescente, quando comparado ao metabolismo aeróbio, mas também ao acúmulo de produtos terminais do metabolismo anaeróbico, com conseqüente declínio do pH tissular (GEBHARD et al., 1999).

Dados derivados de experimentos com fígados de cães ilustram a extensão dessas alterações sob condições de hipotermia a 25° C, quando o conteúdo de ATP sofre uma depleção até chegar a 10% dos valores fisiológicos após 45 minutos, enquanto o pH reduz-se para 6,8. Os sistemas de síntese e detoxificação do fígado estão entre os principais consumidores de energia, juntamente com as células miocárdicas e os túbulos renais (GEBHARD et al., 1999). À medida que os níveis de ATP e o pH se reduzem, ocorre disfunção nas bombas iônicas de Na⁺ e Ca⁺⁺, dependentes de energia derivada desse ATP, com conseqüente influxo desses dois cátions para dentro da célula. O sódio em excesso exige uma regulação do volume celular, enquanto o cálcio irá atuar no metabolismo das xantinas, com conseqüente formação de RLO intracelulares por ocasião da reperfusão. A depleção de fosfatos é acompanhada por um acúmulo de seus produtos de degradação, principalmente hipoxantina. Essa age como substrato para a reação da xantina oxidase, mecanismo formador de radicais superóxido ($^{\circ}\text{O}_2^-$) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por ocasião da reperfusão (Figura 4).

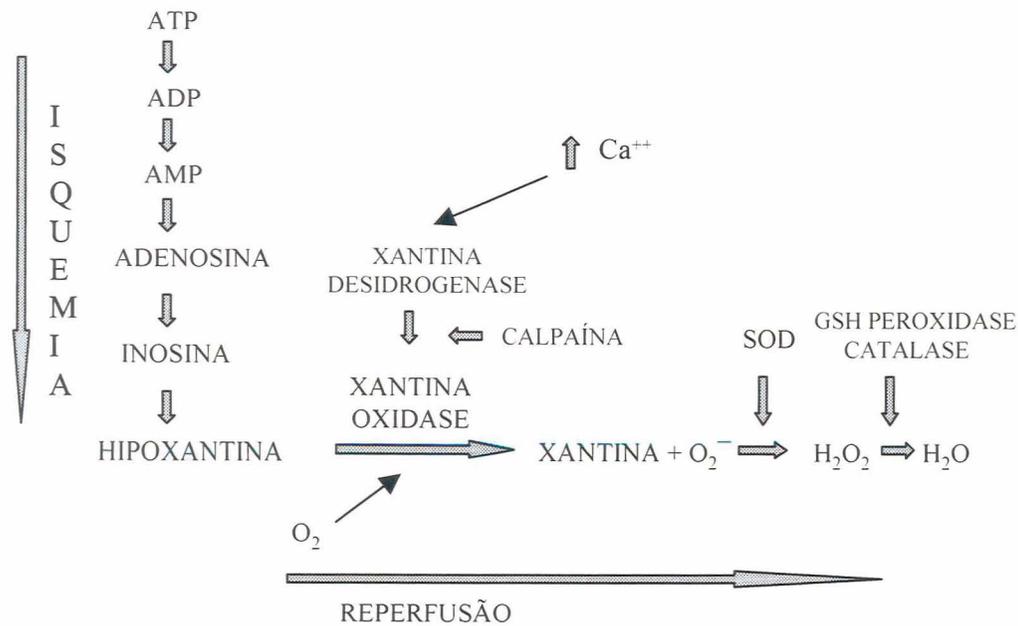


Figura 4 - Seqüência das reações enzimáticas intracelulares envolvidas na formação dos radicais superóxido, peróxido de hidrogênio na reperfusão

Nesse mesmo contexto, há participação do íon Fe⁺⁺ como facilitador da formação dos radicais hidroxila ([°]OH⁻), espécies altamente reativas capazes de oxidar qualquer molécula do organismo (KATO et al., 2001). Na presença do íon ferroso, o H₂O₂ produz as espécies [°]OH⁻ pela reação de Fenton:



Essa reação de decomposição do ferro é considerada a mais prevalente em sistemas biológicos e fonte de vários produtos deletérios envolvidos na peroxidação lipídica das membranas celulares (KATO et al., 2001).

O aumento do cálcio intracelular e a geração de RLO levam a um aumento transitório de permeabilidade da membrana interna das mitocôndrias. A passagem de

solutos pela membrana provoca a despolarização mitocondrial e redução (“uncoupling”) das reações de fosforilação. A diminuição das reações de fosforilação é um desarranjo mais grave do que a simples inibição respiratória, pois hidrolisa grandes quantidades de ATP. A depleção de ATP provoca alterações na função e estrutura da membrana plasmática que culminam com a morte da célula por necrose. As células formam bolhas, aumentam de volume em 30 a 50 por cento, as cisternas do retículo endoplasmático se dilatam e ocorre edema moderado das mitocôndrias (NIEMINEN et al., 1994). Até esse ponto o dano é reversível. Porém, quando as bolhas se rompem, ocorre uma falha de barreira da membrana plasmática, liberação de enzimas intracelulares e metabólitos e, finalmente, colapso de todos os gradientes elétricos e aniônicos (ZAHBERELSKI et al., 1995).

Embora a morte celular seguida por isquemia e reperfusão é geralmente considerada como sendo provocada por necrose, estudos têm demonstrado apoptose de hepatócitos e células sinusoidais após a reperfusão de fígados preservados em solução (SASAKI et al., 1997; KOHLI et al., 1999). Evidências indicam que a apoptose de células endoteliais e hepatócitos ocorre rapidamente seguindo a reperfusão após isquemia fria (GAO et al., 1998; KOHLI et al., 1999). Esse mecanismo pode representar um dos principais danos de reperfusão, pois foi demonstrada correlação entre o número de células apoptóticas com o tempo de isquemia e a viabilidade do enxerto (GAO et al., 1998; KOHLI et al., 1999). Por exemplo, o número de células endoteliais e hepatócitos com apoptose após uma hora de reperfusão em um modelo animal aumentou respectivamente de 22 e 2% para 53 e 48% em 24 horas (KOHLI et al., 1999). A apoptose possivelmente está associada a uma alteração no status redox intracelular e os níveis de antioxidantes conferem resistência contra apoptose (VAIRETTI et al., 2001). Todavia, os fatores que levam à morte celular por apoptose no transplante hepático são

especulativos. RLO formados pelo ferro parecem ser mediadores chave para apoptose endotelial, mas somente parcialmente nos hepatócitos (RAUEN et al., 1999). Além disso, os RLO parecem ativar diretamente a protease calpaína, induzindo apoptose (MIYOSHI et al., 1996). Outros achados sugerem que o GSH tem um papel crítico na modulação e indução de apoptose, na produção de RLO e na peroxidação lipídica das membranas, durante a preservação hipotérmica seguida de reoxigenação (VAIRETTI et al., 2001).

O estresse oxidativo é uma condição que reflete um desequilíbrio entre a disponibilidade de oxidantes e antioxidantes. Numerosos estudos experimentais têm mostrado que a reperfusão seguindo isquemia gera estresse oxidativo devido à excessiva formação de RLO (BILZER et al., 1994, GRATTAGLIANO et al., 1999; BURKE et al., 2002), e que este evento inicia uma cascata de respostas celulares levando à inflamação, morte celular e insuficiência orgânica.

Muitos RLO são gerados dentro dos hepatócitos pelo acúmulo dos subprodutos de degradação do ATP, com conseqüente acúmulo de hipoxantina e sua posterior conversão a RLO. Porém, curiosamente, diversos experimentos revelaram uma falta de relevante estresse oxidativo em hepatócitos durante a reperfusão, provavelmente refletindo a existência de um eficiente sistema de defesa antioxidante dentro desse tipo de célula (JAESCHKE et al., 1988; OKUDA et al., 1992, BILZER et al., 1999). Esses estudos constataram que a geração de RLO parece ocorrer com maior intensidade no compartimento extracelular, onde as células endoteliais e de Kupffer têm mostrado uma participação significativa nos danos hepáticos pós-reperfusão (JAESCHKE et al., 1991, JAESCHKE et al., 1996). Possivelmente esse cenário de estresse oxidativo extracelular seja o motivo pelo qual a adição de antioxidantes como o GSH tenha reduzido os efeitos da reperfusão em estudos anteriores (KOBAYASHI et al., 1993).

Os RLO modulam e retroalimentam outros mecanismos que participam na piora e amplificação do dano hepático, incluindo a expressão e liberação de citocinas pelas células de Kupffer, recrutamento de leucócitos e plaquetas por diversos mediadores liberados (TNF- α , PAF, prostaglandinas, proteases), ativação do sistema de coagulação com conseqüente dano endotelial (SCHAUER et al., 2001). Entretanto, em outros estudos, o dano de reperfusão sobre as células endoteliais em fígados preservados não foi reduzido por antioxidantes (CALDWELL-KENKEL et al., 1995; LEMASTERS et al., 1997). Esses achados indicam que outros mecanismos independentes dos RLO contribuem para o dano endotelial na reperfusão.

Especula-se que um destes efeitos seja a correção súbita da acidose em que as células se encontram durante a preservação no momento da reperfusão. Este fenômeno conhecido como “pH paradox” é um estresse suficiente para precipitar dano celular letal ao endotélio. Esses achados são corroborados pelo fato de que a perfusão com tampão acidótico imediatamente antes da reperfusão reduziu marcadamente a morte das células endoteliais (CALDWELL-KENKEL et al., 1995).

Em relação ao TNF- α , mínimas quantidades desta citocina foram detectados em fígados sujeitos a isquemia fria ou isquemia fria seguida de reperfusão, ao contrário do que é visto na isquemia quente (LUTTEROVÁ et al., 2000). Alguns investigadores sugerem que a superprodução de TNF- α no transplante hepático é disparada pela produção de endotoxinas intestinais, devido à prolongada congestão esplâncnica provocada pelo clampeamento portal (URATA et al., 1998). Essa citocina parece também ter um papel importante na indução de apoptose (BEN-ARI et al., 2002).

Tem sido demonstrado que os maiores níveis de RLO ocorrem 30 minutos após a reperfusão (JASSEM et al., 1998). Todavia, os danos de reperfusão sobre as células do

parênquima duram de várias horas a aproximadamente dois dias. Os níveis das aminotransferases, contudo, costumam normalizar-se dentro de uma semana. Entretanto, a recuperação dos danos à árvore biliar necessita um tempo maior, quando comparado aos hepatócitos e endotélio, pois os ductos biliares sofrem efeitos retardados da reperfusão, com pobre recuperação funcional, descamação epitelial, invasão de polimorfonucleares e ação de sais biliares sobre o epitélio (CUTRIN et al., 1996).

Independentemente do papel exercido pelo diferentes tipos de células envolvidas na reperfusão, uma variedade de intermediários oxidantes são liberados, tais como o H_2O_2 , radicais $^{\circ}O_2^-$ e $^{\circ}OH^-$, peroxinitrito ($ONOO^-$) e ácido hipocloroso ($HOCl$). Esses RLO são componentes altamente reativos que se ligam a proteínas, quebram filamentos de DNA, reagem com componentes vitais e destroem as duplas ligações de ácidos graxos poliinsaturados embebidos na estrutura das membranas fosfolipídicas (BOMZON et al., 2001). A prevenção dos danos de reperfusão por componentes antioxidantes pode ser efetiva não somente para diminuir a taxa de disfunção dos enxertos, como também a incidência de rejeições agudas e crônicas (PIRENNE et al., 1997; RENTSCH et al., 2000).

Um dos métodos utilizados para prevenção da disfunção do enxerto é a utilização do Rinse da Carolina para a lavagem do enxerto imediatamente antes do implante. A reperfusão de fígados de ratos que utilizaram Rinse da Carolina quase que completamente impediu a morte celular após 24 horas de preservação em UW (CURRIN et al., 1996). Essa solução também reduziu a ativação das células de Kupffer e a formação de RLO. Dois pequenos ensaios clínicos confirmaram sua eficácia clinicamente, quando o enxerto foi lavado previamente à reperfusão (SANCHEZ-URDAZPAL et al., 1993; BACHMANN et al., 1997).

1.6 O Glutatião e a Lesão de Reperusão

O glutatião reduzido, mais comumente chamado apenas de glutatião, ou GSH, é uma pequena molécula de fase aquosa presente naturalmente em todas as células humanas. É um tripeptídeo formado pela L-glutamina, L-cisteína e glicina. Tecnicamente denominado N-L-gama-glutamil-cisteinil glicina ou L-glutatião, essa molécula tem um grupo sulfidríla (SH) na porção cisteinil, que responde pela sua forte capacidade de doação de elétrons, capaz de gerar grande força redutora (RODRÍGUEZ et al., 1998) (Figura 5).

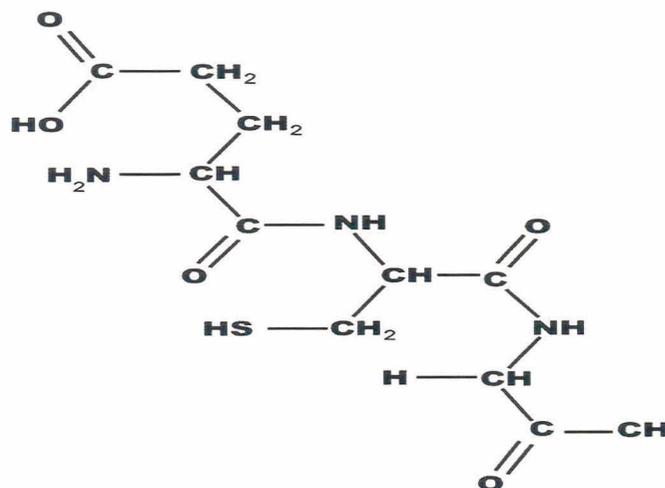


Figura 5 - Estrutura molecular do GSH

À medida que os elétrons são perdidos, a molécula de GSH torna-se oxidada. Duas dessas moléculas tornam-se então dimerizadas por uma ponte dissulfidril para formar o glutatião dissulfídeo ou oxidado (GSSG). Esta ligação não é irreversível podendo ocorrer uma redução a GSH. A homeostase é mantida sob estrito controle obedecendo a um balanço dinâmico entre síntese, utilização e reciclagem (KIDD et al., 1997).

A síntese envolve duas reações enzimáticas dependentes de ATP. Primeiramente, a cisteína e o glutamato são combinados pela gama glutamil cisteinil sintetase. Em segundo lugar, a GSH sintetase combina a gama glutamil-cisteína com a glicina para gerar GSH. O controle da síntese é limitado pelos níveis crescentes de GSH ou então pela disponibilidade de cisteína, etapa limitante da reação enzimática (ANDERSON et al., 1997).

A reciclagem é feita pela enzima glutatião dissulfideo redutase, que usa equivalentes de NADPH para converter uma molécula de GSSG a duas de GSH. Em situações de isquemia fria, a atividade desta enzima está diminuída, limitando a redução do GSSG a GSH (SHAN et al., 1990; MEISTER et al., 1995).



O GSH atua como co-fator de múltiplas enzimas de peroxidase para detoxificar peróxidos gerados pelo oxigênio que destroem moléculas biológicas. É co-fator de trans-hidrogenases que reduzem centros oxidativos sobre o DNA e proteínas e é co-fator também da glutatião S-transferase, que reduz substâncias exógenas (MONKS et al., 1994; MULDER et al., 1997; BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999).

O fígado é o maior reservatório de GSH, onde seus níveis alcançam valores entre 0,5 e 10 mmol/L. Nos canalículos biliares, a concentração está em torno de 3 mmol/L, enquanto no plasma as concentrações são aproximadamente mil vezes menores que dentro dos hepatócitos, da ordem de 5 µmol/L. Os hepatócitos sintetizam GSH para atuar no sistema de conjugação P450 e em numerosas outras demandas metabólicas. Após a síntese, ele é exportado como fonte sistêmica de força redutora via plasmática e biliar.

Todo o sistema redox das células é controlado pelos níveis de GSH e pela razão GSH/GSSG. Esse equilíbrio é crucial para a homeostase, facilitando a performance celular e a sua sobrevivência (BILZER et al., 1999; FILOMENI et al., 2002). Sob condições fisiológicas, o GSH é 10 a 100 vezes mais elevado que o GSSG. Evidências experimentais têm demonstrado que alterações na razão GSH/GSSG podem governar várias reações celulares envolvidas na transdução de sinais, na regulação do ciclo celular e em muitos outros processos. Somente quando o estresse oxidativo torna-se prolongado e os sistemas celulares não são mais capazes de combater os insultos provocados por RLO é que a quantidade de GSH livre diminui, levando a irreversível degeneração celular e morte (FILOMENI et al., 2002). O status do GSH é um indicador altamente sensível da funcionalidade e viabilidade celular. À medida que seus níveis caem, a função da célula se deteriora progressivamente até a sua morte (KOEPEL et al., 1996; BILZER et al., 1999).

Alguns estudos clínicos utilizaram a droga para o tratamento da esteatose hepática, da hepatite alcoólica, na desintoxicação alcoólica e em pacientes críticos em UTI com bons resultados (NARDI et al., 1991; BRESCI et al., 1991; ORTOLANI et al., 1992; PISTELLI et al., 1992).

No transplante hepático, extensas evidências têm mostrado a participação do GSH como importante mecanismo de defesa das células hepáticas, devido à sua ação sobre RLO (STEIN et al., 1992). Durante a reperfusão do órgão, o ciclo redox do GSH, catalisado pela enzima glutatíon peroxidase, reduz o H_2O_2 , impedindo que o mesmo se transforme no altamente reativo radical $^{\circ}OH$. Além disso, age diretamente sobre o ânion $^{\circ}O_2^-$, atuando como detoxificador natural. Essa proteção às proteínas com grupos tiol é essencial para manter a integridade celular contra o estresse oxidativo (BILZER et al., 1999).

Em diversos experimentos, os autores concluíram que os danos hepáticos pós-reperusão surgem após a depleção dos estoques endógenos de GSH que ocorrem durante a preservação em solução (RODRÍGUEZ et al., 1998; BILZER et al., 1999; MAMPRÍM et al., 2000). Essa depleção é tempo dependente, não é compensada por síntese ou transporte e é basicamente devida ao processo catabólico (RODRÍGUEZ et al., 1998; RODRÍGUEZ et al., 2000).

A importância do estado de oxidação do GSH na solução de UW tornou-se aparente quando se percebeu que soluções com menor tempo de conservação apresentavam melhores resultados do que aquelas estocadas durante muito tempo, mostrando que o GSH assumia a forma oxidada durante o armazenamento. Em um modelo animal de transplante em cães, a adição de GSH às soluções que ficaram armazenadas por mais de 48 horas melhorou a sobrevivência dos animais (BOUDJEMA et al., 1991). Um estudo similar em humanos demonstrou diferença, porém sem significância estatística (BOUDJEMA et al., 1991). Outro modelo de transplante em suínos mostrou que o GSH encontrava-se depletado em 49% após um tempo médio de isquemia fria de 6,5 horas e que o consumo aumentou para 72% após 90 minutos de reperusão. Nesse estudo, os autores concluíram que o GSH presente na solução UW não impediu a perda de GSH hepático durante a preservação e reperusão (YANDZA et al., 1997).

Alguns relatos mostraram que a adição de GSH à solução de preservação diminui a taxa de sua perda pelas células, mas o mecanismo não é completamente entendido. Esses autores sugerem que a permeabilidade dos hepatócitos ao GSH pode estar aumentada em condições de hipotermia, ao contrário do que é visto na normotermia (RODRÍGUEZ et al., 1998).

A depleção de GSH durante a isquemia fria torna o fígado mais suscetível ao dano de reperfusão em estudos com animais, em virtude da queda dos níveis intracelulares (MAMPRÍN et al., 2000). Este efeito é prevenido através do tratamento com ésteres de GSH, que melhoram a função celular e detoxificam os RLO gerados no compartimento vascular (GRATTAGLIANO et al., 1999). O suplemento de ésteres de GSH em ratos submetidos a estresse oxidativo mostrou diminuição na permeabilidade das membranas mitocondriais, diminuição do edema dessas organelas, manutenção da homeostase do cálcio, menores lesões hepáticas e aumento da sobrevivência dos animais (LIU et al., 1994; UEDONO et al., 1997). Esses mesmos achados foram confirmados quando o fígado foi mantido em preservação fria com UW, ou quando o GSH foi adicionado a essa (JASSEM et al., 2000; MAMPRÍN et al., 2000). Assim, a manutenção de altos níveis de GSH mitocondrial é importante ao término da isquemia fria para neutralizar os efeitos dos RLO (JASSEM et al., 2000). O GSH mitocondrial é o principal antioxidante dessa organela, já que a mitocôndria não possui catalase. Altos níveis de GSH mitocondrial têm sido relacionados à melhora na produção de ATP, na produção e manutenção de adenina nucleotídeos, na manutenção da relação NAD/NADH e prevenção da morte celular por apoptose. Os níveis mitocondriais são mantidos através do transporte ativo do citosol, pois a mitocôndria não sintetiza GSH (VENDEMIALE et al., 1995).

Ainda, o uso de N-acetilcisteína, precursor do GSH, com o intuito de repor estoques depletados de GSH nas células hepáticas mostrou evidências experimentais de proteção (NASKANO et al., 1995; THIES et al., 1997). Esse efeito foi reproduzido também clinicamente, quando se utilizou essa droga em doadores de órgãos destinados a transplante de fígado (REGUEIRA et al., 1997). Animais que foram propositalmente depletados do GSH endógeno tornaram-se sensibilizados ao dano oxidativo, promovendo maiores deslocamentos de líquidos com importante edema hepatocitário e maior

peroxidação lipídica de suas membranas após a reperfusão (SUZUKI et al., 1994; ARMENI et al., 2000; VAIRETTI et al., 2001). O tratamento de fígados preservados em UW por 24 horas com GSH melhorou a função hepática, medida pelo débito biliar, reduziu a resistência vascular hepática, medida pelas pressões portais e impediu o deslocamento do GSH intracelular, minimizando o estresse oxidativo. Da mesma forma, duas horas de reperfusão de fígados não tratados resultou em significativa redução do GSH intracelular, quando comparado aos fígados tratados. Os autores concluíram que o GSH deveria ser considerado como droga candidata à prevenção do estresse oxidativo no transplante hepático (BILZER et al., 1999). Em virtude dos efeitos benéficos atribuídos ao GSH na proteção contra o estresse oxidativo nos fenômenos de isquemia e reperfusão e devido à escassez de estudos clínicos nessa área, decidimos estudar o comportamento do glutatião e de suas frações no tecido hepático e demonstrar suas correlações com a lesão e função hepatocelulares encontradas nas primeiras horas de reperfusão do fígado e nos cinco primeiros dias que sucederam o transplante de fígado em humanos.

2 OBJETIVOS

2.1 Principal

Avaliar a existência de correlação entre os níveis teciduais de GSH e GSSG em enxertos ótimos e subótimos ao término da preservação hipotérmica e duas horas após a reperfusão com os danos hepatocelulares encontrados na reperfusão inicial e nos cinco dias subseqüentes ao transplante de fígado.

2.2 Secundários

- Avaliar a função hepática dos receptores de órgãos ótimos ou subótimos nos cinco dias subseqüentes ao transplante e suas correlações com os níveis de GSH e GSSG.

- Avaliar quais os fatores de risco do doador são independentes na promoção de lesão hepatocelular.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Alocação dos Doadores

3.1.1 *Critérios de inclusão*

No período de março a dezembro de 2002 foram alocados aleatoriamente 34 doadores de órgãos com o consentimento de seus familiares, notificados pela Central de Transplantes do Estado do Rio Grande do Sul. O diagnóstico de morte encefálica foi firmado de acordo com os critérios estabelecidos na legislação brasileira, lei nº 10.211 que determina o exame clínico realizado por dois médicos diferentes, um deles com título de especialista em neurologia, com intervalos de seis horas, e posteriormente confirmado por exame complementar de imagem (arteriografia de quatro vasos, ecodoppler de vasos cerebrais) ou EEG de trinta minutos. Simultaneamente foram realizados exames de marcadores de infecção viral (HCV, HBV, HIV, HTLV, CMV) e parasitária (Toxoplasmose, Chagas), provas de função hepática (AST, ALT, FA, BT, BD, γ GT) e renal (U,Cr), perfil de coagulação (TP), eletrólitos (Na^+ , K^+), hemograma, gasometria

arterial, glicemia e amilase. Uma vez aceito para a cirurgia de captação, a inclusão final era determinada pelo cirurgião durante a inspeção do órgão no início da cirurgia, auxiliado pelos exames complementares já realizados. Nas situações onde havia dúvidas quanto à viabilidade do enxerto, era realizada biópsia para análise por congelação.

3.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos os receptores que não consentiram com o estudo e os doadores que apresentaram nas biópsias de congelação evidências de:

1. Hepatite em atividade moderada (Ishak-Metavir ≥ 4) ou com evidência de fibrose.
2. Sinais de infecção bacteriana dentro do enxerto (infiltrado neutrofilico presente).

3.2 Seleção dos Receptores

Os pacientes apresentando insuficiência hepática progressiva e terminal, com suas múltiplas complicações, foram incluídos em protocolo de exames para confirmar o diagnóstico e avaliar as condições clínicas para tolerar o transplante, com ênfase nos sistemas cardiovascular e respiratório. Este protocolo também incluiu a pesquisa de anormalidades na circulação portal, do status viral e pesquisa de neoplasia hepática. Além disso, foi realizada avaliação psiquiátrica e das condições sócio-econômicas dos futuros candidatos. Não sendo identificada contra-indicação nesta avaliação, os candidatos assinavam os termos de consentimento para a realização do transplante e do estudo em questão. Seus nomes eram encaminhados à Central de Transplantes e então

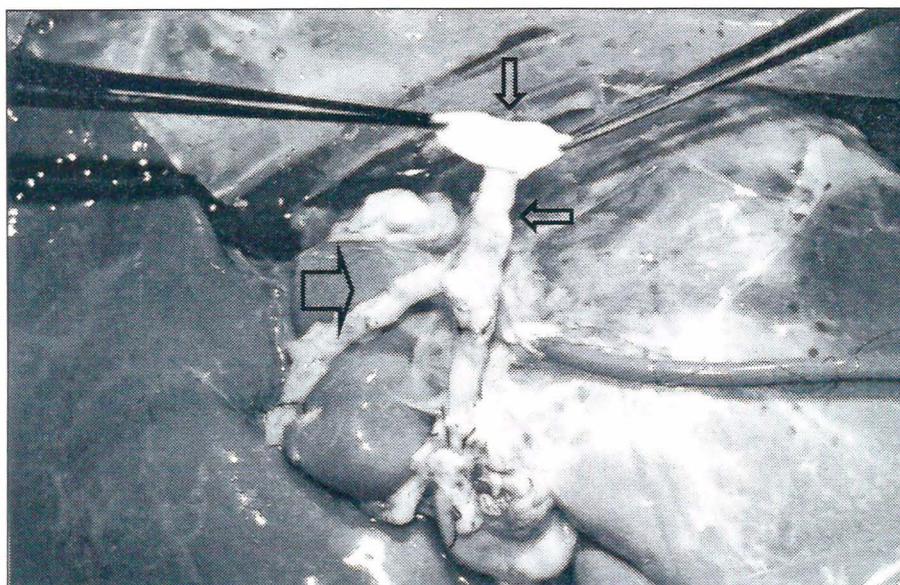
permaneciam em lista de espera, realizando visitas periódicas, até o surgimento de doador com compatibilidade sanguínea, conforme as diretrizes da lista única em vigor no país. Dessa forma, com o doador de múltiplos órgãos já alocado, o receptor era chamado para a internação hospitalar imediata. Na internação, eram realizados a anamnese e o exame físico completo, coleta de sangue para exames de bioquímica, hematologia, coagulação, marcadores virais e raio X de tórax. Todos os procedimentos relativos ao transplante foram realizados no complexo hospitalar da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre – ISCMPA.

3.3 Cirurgia de Captação e Seleção dos Grupos Ótimo e Subótimo

A cirurgia de captação de múltiplos órgãos foi realizada em hospitais da capital e do interior do Estado, utilizando uma técnica de ampla dissecação do pedículo hepático. Nas situações de grave instabilidade hemodinâmica, uma técnica de perfusão rápida era utilizada, evitando isquemia quente desnecessária.

Para profilaxia antibiótica foram utilizados cefalosporina de terceira geração (cefotaxime) e vancomicina, conforme protocolo utilizado pela equipe transplantadora. O procedimento cirúrgico era iniciado com uma laparotomia e esternotomia medianas, com hemostasia dos vasos da parede abdominal e do esterno. Seguia-se então a inspeção do tamanho, cor, textura e superfície dos lobos hepáticos, bem como a pesquisa de anormalidades como trauma e neoplasias na cavidade abdominal. Considerando o cirurgião o órgão como duvidoso, procedia-se à biópsia hepática para análise histopatológica por congelação. Caso contrário, era iniciado o procedimento com a secção dos ligamentos hepáticos, seguido da abertura do omento gastro-hepático, tomando-se o cuidado para reconhecer a presença eventual da artéria hepática esquerda

acessória, presente em 10% dos doadores. Após, os pilares diafragmáticos eram incisados, e a aorta supracelíaca cerclada. A seguir, mobilizava-se o cólon direito e o duodeno amplamente até a raiz da artéria mesentérica superior, expondo os grandes vasos do retroperitônio. A veia mesentérica superior era identificada na base do mesocólon e cerclada. Na seqüência procedia-se à dissecação do pedículo hepático por meio de ligaduras seqüenciais. A artéria hepática era individualizada e pesquisava-se a presença de artéria hepática direita acessória. A veia porta e a via biliar principal eram identificadas e isoladas. Como fase final era realizada a colecistectomia e lavagem das vias biliares com soro fisiológico. Após injeção de vinte mil unidades de heparina, procedia-se à canulação da aorta e da veia mesentérica superior. O clampeamento aórtico supracelíaco era realizado e, simultaneamente, era iniciada a perfusão dos órgãos abdominais com solução de UW, num volume de dois litros na aorta e um litro na veia porta. Ao mesmo tempo, os órgãos eram resfriados externamente com solução de Ringer Lactato. Ao término da perfusão realizava-se a dissecação minuciosa da artéria hepática até sua origem no tronco celíaco e desse, até sua origem na aorta, com ligadura das artérias gástrica esquerda e esplênica. Dessa forma, a aorta era seccionada, deixando um “patch” ligado ao tronco celíaco (Figura 6).



“Patch” de aorta (seta estreita vazia). Tronco celíaco (seta estreita cheia). Artéria hepática esquerda acessória (seta larga vazia)

Em

Figura 6 - Fotografia da artéria hepática dissecada

seguida, a

veia

porta era dissecada e seccionada junto à sua origem. A cava inferior igualmente era dissecada e seccionada acima das veias renais. As últimas conexões do fígado com o diafragma eram desfeitas, o órgão era removido da cavidade e novamente perfundido por via portal com um litro de UW. Após, o fígado era embalado em sacos plásticos estéreis. Finalmente, os vasos ilíacos eram retirados, embalados e acondicionados da mesma forma que o fígado, como possíveis enxertos vasculares caso necessário. Os dados epidemiológicos do doador, hemodinâmicos (dose de vasopressores, história de PCR), anatômicos (congestão e cianose hepáticos, tamanho e aspecto do órgão), exames laboratoriais (provas de função hepática, eletrólitos, marcadores virais) e intercorrências (presença de infecção, tempo de internação em UTI, trauma) foram anotados em formulário específico para posterior análise e estabelecimento do “Escore de Marginalidade”.

3.3.1 *Escore de Marginalidade*

O Escore de Marginalidade foi determinado pela presença de 14 fatores de risco relacionados ao doador, semelhante ao proposto por Briceño e Busquets. Foram considerados Subótimos e alocados para o grupo I os doadores que apresentassem pelo menos três critérios da lista abaixo. Com menos de três critérios, os doadores eram considerados Ótimos e alocados para o grupo II.

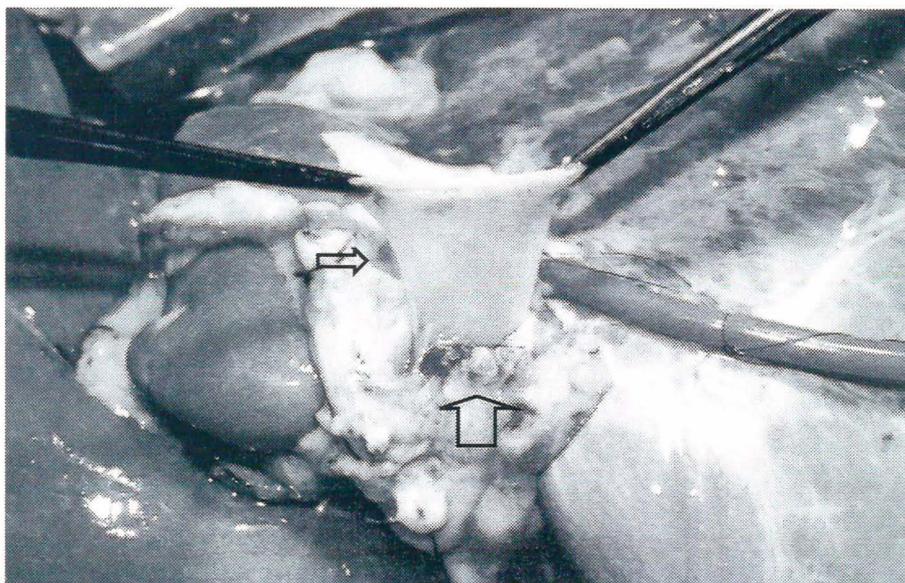
1. Idade maior que 65 anos.

2. Uso de vasopressor em doses altas:
 - a. Dopamina $> 10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$.
 - b. Noradrenalina $> 0.3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$.
 - c. Uso concomitante de 2 vasopressores.
3. Hipotensão nas 2 últimas horas (PAS $< 90 \text{ mm Hg}$).
4. Presença de infecção (febre, hemograma infeccioso e foco definido).
5. Hipernatremia ($\geq 170 \text{ meq/L}$).
6. Parada cardíaca, mesmo que revertida.
7. Hipoxemia ($\text{PO}_2 \leq 70 \text{ mmHg}$).
8. Congestão hepática na inspeção inicial.
9. Esteatose hepática ($\geq 30\%$ em biópsia).
10. Hipotermia (temperatura $\leq 35^\circ \text{ C}$).
11. Internação prolongada em UTI (> 3 dias).
12. Alcoolismo ou drogadição confirmados.
13. Alterações das aminotransferases hepáticas (o dobro dos valores normais).
14. Tempo de isquemia fria > 14 horas.

3.4 Preparo para o Implante

Durante este procedimento, preparava-se a veia cava supra-hepática, liberando-se o excesso de tecido perivascular e ligando-se os orifícios das veias frênicas e supra-renal. O mesmo ocorria com a artéria hepática e veia porta, onde o excesso de tecido perivascular era retirado e os orifícios de pequenas ramificações ligados. Os linfonodos próximos à via biliar principal eram retirados e os linfáticos ligados, tomando-se o

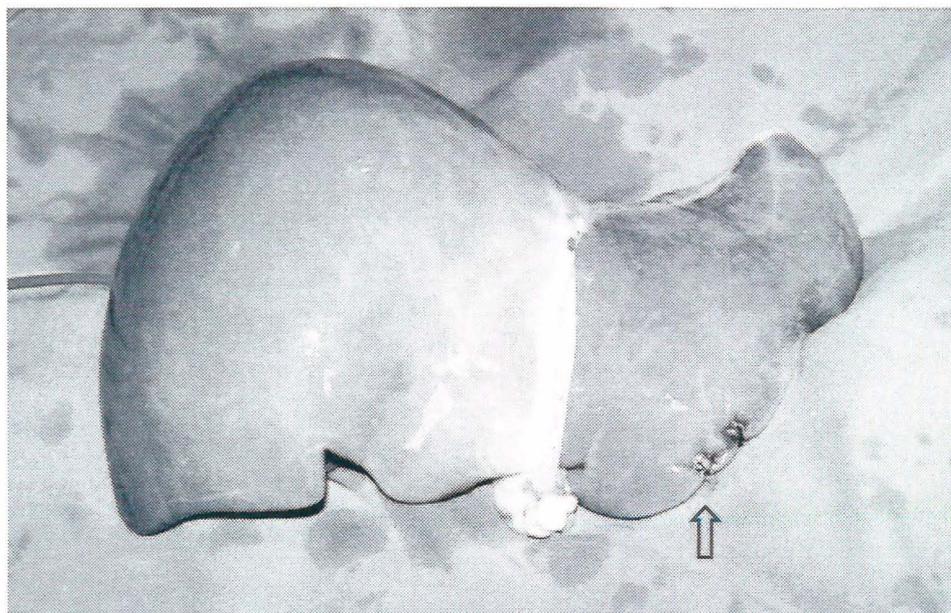
cuidado para não retirar tecido em excesso e desvascularizar a via biliar extra-hepática (Figura 7).



Fotografia mostrando a veia porta com o tecido perivascular retirado, preparada para o implante (seta estreita). Via biliar extra-hepática conservando o tecido perivascular (seta larga).

Figura 7 - Veia porta e via biliar dissecadas

O órgão, então, encontrava-se pronto para o implante no receptor (Figura 8).



Fotografia do fígado pronto para o implante e biópsias realizadas no lobo esquerdo (seta).

Figura 8 - Fígado ao término da isquemia fria

3.5 Transplante Hepático

3.5.1 *Hepatectomia total*

A incisão escolhida foi a subcostal bilateral, com extensão medial ao xifóide. Trabalhando junto à placa hilar, a via biliar extra-hepática era dissecada e ligada o mais proximal possível, enquanto que a artéria hepática era ligada nas suas ramificações direita e esquerda. A veia porta era preparada da mesma forma, porém, permanecia sem ligadura, mantendo fluxo ao fígado e evitando congestão esplâncnica a montante. Os ramos entre a veia cava e o fígado eram suturados, conforme a técnica de “Piggyback”, que permite a preservação da cava retro-hepática. Procedia-se ao clampeamento e à secção das veias hepáticas, criando-se após um óstio único para a anastomose com a cava do enxerto.

3.5.2 *Implante*

Com o enxerto no campo cirúrgico, o implante iniciava com a anastomose das veias hepáticas do receptor com a veia cava superior do enxerto de forma término-terminal. Após, a veia porta era anastomosada de forma término-terminal e o enxerto lavado com solução de Ringer Lactato para a retirada da solução de preservação. O enxerto era, então, reperfundido por via portal. Na seqüência realizava-se a anastomose da artéria hepática de forma também término-terminal e, com todas as anastomoses

vasculares concluídas, a via biliar principal era reconstruída através de anastomose término-terminal, sem drenagem externa. Na eventualidade de discrepância importante entre o calibre das vias biliares, era realizada uma anastomose em Y de Roux. A drenagem da cavidade era utilizada de maneira seletiva, conforme o perfil de coagulação e o julgamento do cirurgião do campo cirúrgico.

3.6 Pós-Operatório

Ao término do procedimento, o paciente era encaminhado à UTI para recuperação anestésica e acompanhamento da função inicial do enxerto, bem como o diagnóstico precoce de complicações. Realizavam-se as medidas de AST, ALT e TP durante cinco dias consecutivos e do fator V durante três dias consecutivos. A primeira amostra era coletada na primeira hora da chegada na UTI. A imunossupressão era realizada com esteróides, iniciados na fase anepática do receptor e com FK 506, iniciado no primeiro ou segundo dia de pós-operatório em todos os pacientes. Foi considerada como disfunção do enxerto a presença de pico de AST maior que 1500 U/L nos primeiros cinco dias, combinado a um TP menor que 50% ao término do quinto dia, semelhante ao proposto por Regueira.

3.7 Primeira Biópsia

Foi realizada biópsia em cunha do lobo esquerdo do fígado com aproximadamente 1 cm³ ao término do tempo de isquemia fria, durante o preparo na mesa gelada.

Imediatamente a amostra era congelada em nitrogênio líquido, rotulada e armazenada em congelador a - 80° C.

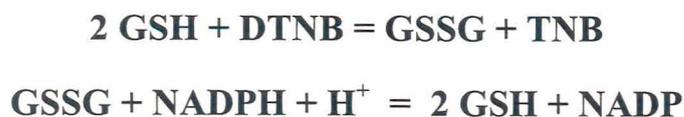
3.8 Segunda Biópsia

Ao término de duas horas da reperfusão venosa, foi coletada biópsia em cunha à direita da primeira, com aproximadamente 1 cm³. Esta biópsia era dividida em dois fragmentos, um colocado em formalina a 10% para análise anátomopatológica, e outro, que era imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado para posterior processamento, semelhante à primeira biópsia, visando às mensurações de GSH, GSSG e cálculo do índice de estresse oxidativo (GSSG/GSH).

3.9 Mensurações de GSH, GSSG, Enzimas Hepáticas e Provas de Coagulação

Os níveis de GSH e GSSG foram mensurados através de ensaio de reciclagem por ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) descrito a seguir:

O tecido hepático foi homogeneizado com ácido perclórico a 6% e centrifugado a 1500 rpm por 3 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado ácido 5,5'-ditiobis-nitrobenzóico (DTNB) e o produto lido a 412 nm em espectrofotômetro. O GSH é oxidado pelo DTNB para formar GSSG e ácido 5-tiobis-nitrobenzóico (TNB). O GSSG é então reduzido de volta a GSH pela NADPH em uma reação catalisada pela glutatíon dissulfideo redutase. Um ciclo entre o GSH e GSSG é criado, o qual é ligado à produção de TNB. A taxa de formação de TNB é proporcional à concentração de GSH e GSSG. Os resultados são expressos em $\mu\text{mol/g}$ de tecido.



Os métodos e valores de referência das enzimas hepáticas e provas de coagulação estão especificados na tabela 3.

Tabela 3 - Equipamentos e métodos para a mensuração das provas hepáticas

Exames	Equipamentos	Método	Valores de Referência
AST	ADVIA 1650 - Bayer	Cinético automatizado	14 a 42 U/L
ALT	ADVIA 1650 - Bayer	Cinético automatizado	10 a 43 U/L
TP	ST4 - Bayer	Coagulométrico automatizado	70 a 120 %
Fator V	ST4 - Bayer	Coagulométrico automatizado	70 a 140 %

3.10 Análise Histopatológica

As biópsias hepáticas realizadas duas horas após a reperfusão foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE). A avaliação de cada espécime foi feita utilizando microscópio óptico, atribuindo-se um valor de zero a quatro para as alterações morfológicas observadas em relação à congestão sinusoidal, degeneração hidrópica, necrose e infiltração neutrofílica, e uma valor de zero a três para a esteatose, de forma similar às escalas propostas por Suzuki et al, 1995 e Markin et al,1993. A análise foi realizada por patologista experiente na área hepática, sem o conhecimento do grupo a que cada amostra pertencia. Um total de três cortes de cada amostra foi avaliado

integralmente. O escore final de lesão histopatológica foi determinado pela soma dos escores de todos os parâmetros avaliados. A graduação de cada parâmetro escolhido para avaliar os danos de reperfusão e a sua correspondência histológica é apresentada na Tabela 4.

3.11 Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo “software” SPSS, versão 10.0. As comparações dos níveis de GSH, GSSG, GSH/GSSG, AST, ALT, TP e fator V entre os grupos foram realizadas pelo teste “U” de Mann-Whitney. A análise dos níveis de GSH, GSSG e GSH/GSSG nos grupos pré e pós-reperfusão foi realizada através do teste “T” de Wilcoxon. A correlação das variáveis do doador e dos níveis de GSH, GSSG e GSH/GSSG com o escore de lesão histopatológica, AST, ALT, TP e fator V pós-reperfusão foi realizada através de análise bivariada, calculada pelo coeficiente de correlação de Spearman (r_s) e também por regressão multivariada. O nível de significância utilizado foi de 0,05.

Tabela 4 - Quantificação da lesão isquêmica

	Congestão sinusoidal	Degeneração hidrópica	Necrose	Infiltrado neutrofilico	Esteatose
0	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
1	Dilatação de veia centrilobular	Mínima	Necrose focal de células isoladas	Mínimo	Leve (< 30%)
2	Dilatação de veia centrilobular e de sinusóides em algumas zonas 3	Leve	Necrose confluyente envolvendo hepatócitos adjacentes (< 30%)	Leve	Moderada (30 a 60%)
3	Dilatação de veia centrilobular e de sinusóides na maioria das zonas 3.	Moderada	Necrose zonal envolvendo hepatócitos adjacentes. (30 a 60%)	Moderado	Grave (> 60%)
4	Dilatação de veia centrilobular e de sinusóides em zonas 2 e 3.	Grave	Necrose generalizada	Grave	

4 RESULTADOS

4.1 Doadores

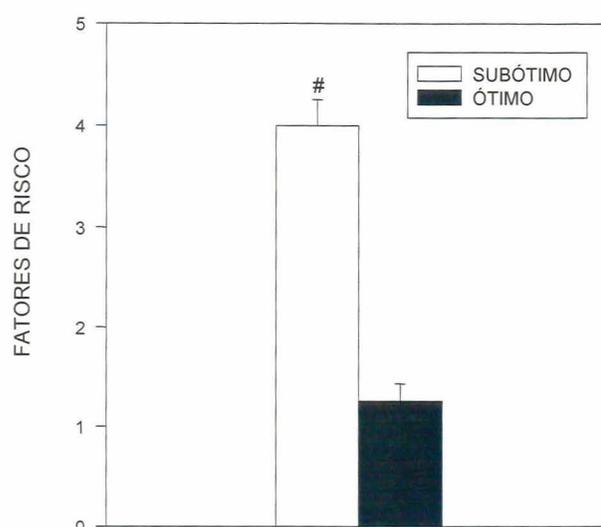
De um total de 45 casos coletados, 11 foram descartados por motivos diversos, restando um número de 34 para a análise final. Quinze casos (44,2%) foram arrolados para o grupo Subótimo (I), e dezenove casos (55,8%) foram arrolados para o grupo Ótimo (II). A média de idade dos doadores foi idêntica em ambos os grupos (37,9 anos). Houve um predomínio do sexo feminino, 18 (52,9%) em relação ao masculino, 16 (47,1%). Quanto à localidade onde foi realizada a captação do órgão, 18 (52,9%) foram do interior e 16 (47,1%) da capital. A média de permanência em UTI dos doadores foi de 5,6 dias para o grupo Subótimo e 3,58 dias para o grupo Ótimo. Apenas dois doadores (5,88%) não utilizavam vasopressores por ocasião da captação. Anomalias arteriais foram encontradas em 10 doadores (29,4%).

Os fatores de risco para disfunção hepática encontrados nos doadores, que determinaram a alocação para os grupos Subótimo e Ótimo são discriminados de acordo com a frequência absoluta e percentuais na tabela 5.

Tabela 5 - Fatores de risco em doadores Subótimos e Ótimos

Fatores de risco do doador	Subótimo (I)	Ótimo (II)
N= 34 (100%)	N=15 (44,2%)	N=19 (55,8%)
Idade doador > 65	0 (0%)	1 (6,66%)
UTI > 3 dias	9 (60%)	5 (26,3%)
Vasopressor em dose alta	7 (46,7%)	6 (31,6%)
Hipotensão	8 (53,3%)	3 (15,8%)
PCR	4 (26,7%)	1 (5,3 %)
Sódio \geq 170meq/L	2 (13,3%)	3 (15,8%)
Aminotransferases > 2 X	3 (20%)	1 (5,3 %)
Esteatose > 30%	4 (26,7%)	1 (5,3%)
Congestão inicial	0 (0%)	0 (0%)
Hipoxemia	0 (0%)	0 (0%)
Alcoolismo	1 (6,7%)	1 (5,3%)
Drogadição	1 (6,7%)	1 (5,3%)
Infecção	8 (53,3%)	4 (21,1%)
Isquemia fria > 14 horas	5 (33,3%)	0 (0%)
Hipotermia	0 (0%)	0 (0%)

Os Escores de Marginalidade dos grupos Subótimo e Ótimo, calculados pelo número de fatores de risco do doador foram de $4 \pm 0,26$ e $1,26 \pm 0,17$ respectivamente ($p < 0,001$), conforme se observa na figura 9.



$p < 0,001$ em relação ao grupo Ótimo. (Teste U de Mann Whitney). Dados em médias \pm EP.

Figura 9 - Escore de Marginalidade nos grupos Subótimo e Ótimo indicados como número de fatores de risco para disfunção hepática encontrados no doador

4.2 Receptores

Os receptores foram escolhidos aleatoriamente de acordo com programa de computador da Central de Transplantes. A média de idade foi de 48,8 anos (18 — 68). Houve um predomínio do sexo masculino (76,5%) em relação ao feminino (23,5%) e os escores das condições clínicas, de acordo com a classificação de Child, na data do

transplante foram os seguintes: A (26,5%), B (44,1%) e C (29,4%). A patologia mais freqüente que indicou o transplante foi a cirrose pelo vírus C (44,1%), seguida pela cirrose pelo vírus C associada ao álcool e alcoólica isolada (11,8%). Na seqüência, os outros casos mais freqüentes foram de cirrose pelo vírus B, amiloidose, hemocromatose e criptogênica (5,9% cada); vírus B, C e álcool combinados, autoimune e hepatite fulminante (2,9% cada). Foram diagnosticados 4 casos concomitantes de carcinoma hepatocelular (11,8%). Os tempos de isquemia fria e total foram de 712 ± 49 e 759 ± 51 minutos no grupo Subótimo e de 610 ± 27 e 662 ± 28 minutos no grupo Ótimo.

A distribuição da idade, escore de Child e etiologia da cirrose nos grupos Subótimo e Ótimo é mostrada na tabela 6.

Tabela 6 - Variáveis dos receptores segundo distribuição nos grupos Subótimo e Ótimo

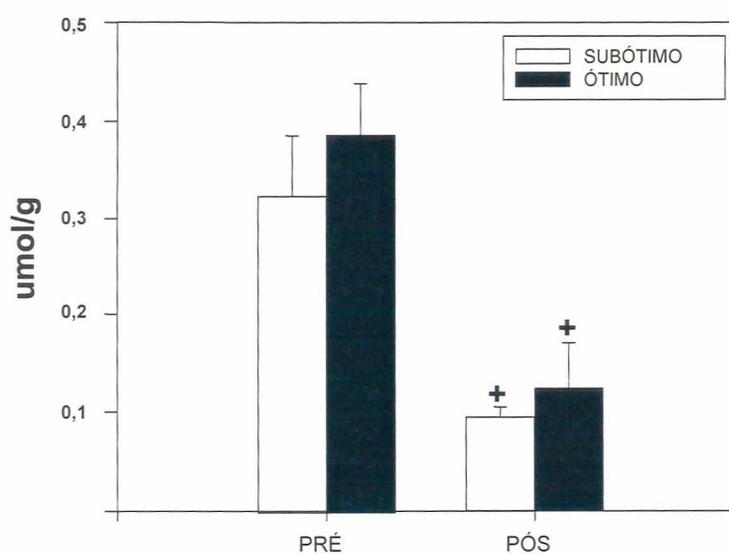
Características dos Receptores (n=34)		Subótimo (I) (n=15)	Ótimo (II) (n=19)
Idade (média)		50,33	47,2
Sexo	M	10 (66,7%)	16 (84,2%)
	F	5 (33,3%)	3 (15,8%)
Child	A	2 (13,3%)	7 (36,8%)
	B	9 (60%)	6 (31,6%)
	C	4 (26,7%)	6 (31,6%)
Etiologia da cirrose			

Alcoólica	4 (26,7%)	6 (31,6%)
HCV	9 (60%)	10 (52,6%)
HBV	2 (13,3%)	2 (10,5%)
CHC	3 (20%)	1 (5,26%)
Miscelânea	2 (13,3%)	6 (31,6%)

Nota: Os casos de cirrose combinada foram computados em mais de uma etiologia. HCV- cirrose pós hepatite C, HBV- cirrose pós hepatite B, CHC- Cirrose com hepatocarcinoma associado. Miscelânea: amiloidose, hemocromatose, hepatite fulminante, cirrose autoimune e cirrose criptogênica.

4.3 GSH Tecidual

Ao término do período de preservação hipotérmica, a média das concentrações teciduais de GSH foi de $0,323 \pm 0,062 \mu\text{mol/g}$ e $0,386 \pm 0,052 \mu\text{mol/g}$ nos grupos Subótimo e Ótimo respectivamente. Após duas horas de reperfusão, houve uma queda significativa das concentrações de GSH, atingindo níveis de $0,095 \pm 0,01 \mu\text{mol/g}$ e $0,124 \pm 0,046 \mu\text{mol/g}$ nos grupos Subótimo e Ótimo respectivamente ($p < 0,01$). Não foram demonstradas diferenças nas concentrações de GSH entre os grupos ao término da



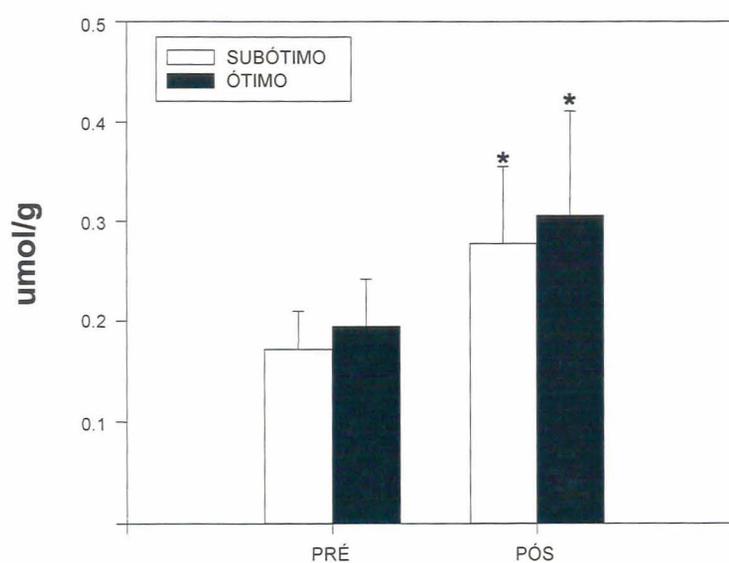
preservação fria e 2 horas após a reperfusão(Figura 10).

+ $p < 0,01$ em relação aos valores pré-reperfusão (Teste T de Wilcoxon).
Dados em média \pm EP.

Figura 10 - Variações dos níveis de GSH pré e pós-reperfusão nos grupos Subótimo e Ótimo

4.4 GSSG Tecidual

Ao término do período de preservação hipotérmica, a média das concentrações teciduais de GSSG foi de $0,172 \pm 0,038 \mu\text{mol/g}$ e $0,195 \pm 0,047 \mu\text{mol/g}$ nos grupos Subótimo e Ótimo respectivamente. Após duas horas de reperfusão, houve um aumento significativo das concentrações de GSSG, atingindo níveis de $0,278 \pm 0,077 \mu\text{mol/g}$ e $0,306 \pm 0,105 \mu\text{mol/g}$ nos grupos Subótimo e Ótimo respectivamente ($p < 0,05$). Não foram demonstradas diferenças significativas nas concentrações de GSSG entre os grupos ao término da preservação fria e 2 horas após a reperfusão (Figura 11).

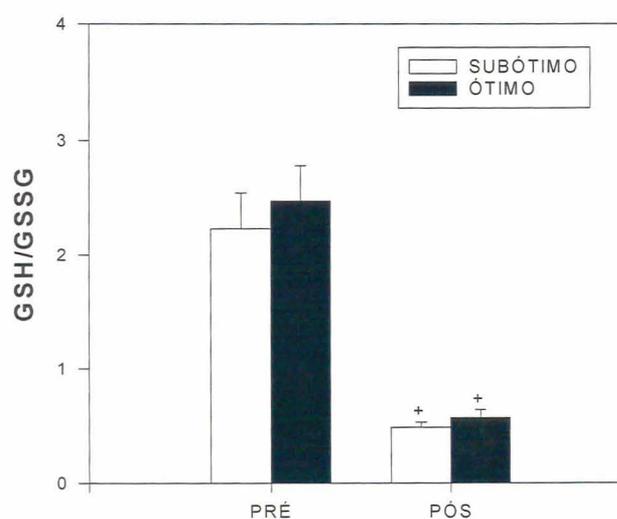


* $p < 0,05$ em relação aos valores pré-reperfusão (Teste T de Wilcoxon).
Dados expressos em média \pm EP.

Figura 11 - Variações dos níveis de GSSG pré e pós-reperfusão nos grupos Subótimo e Ótimo

4.5 GSH/GSSG

Ao término do período de preservação hipotérmica, a relação GSH/GSSG foi de $2,23 \pm 0,312$ e $2,62 \pm 0,334$ nos grupos Subótimo e Ótimo respectivamente. Após duas horas de reperfusão, houve uma redução significativa da relação GSH/GSSG para $0,482 \pm 0,042$ e $0,552 \pm 0,064$ nos grupos Subótimo e Ótimo ($p < 0,01$). Não foram demonstradas diferenças significativas nas concentrações de GSH/GSSG entre os grupos ao término da preservação fria e 2 horas após a reperfusão (Figura 12).



+ $p < 0,01$ em relação aos valores pré-reperfusion. (Teste T de Wilcoxon) Dados expressos em média \pm EP.

Figura 12 - Variações do índice de estresse oxidativo pré e pós-reperfusion nos grupos Subótimo e Ótimo

4.6 Lesão Histopatológica

A quantificação dos danos de reperfusão através dos escores individuais de cada parâmetro histológico e sua soma para determinar o escore final de lesão hepatocelular são apresentados na tabela 8, divididos nos grupos Ótimo e Subótimo. Após duas horas de reperfusão, os escores médios de lesão hepatocelular entre os grupos Subótimo e Ótimo foram de $5,26 \pm 1,3$ e $6,46 \pm 0,4$ respectivamente ($p < 0,05$) (Figura 13).

* $p < 0,05$ (Teste U de Mann Whitney). Dados expressos em média \pm DP

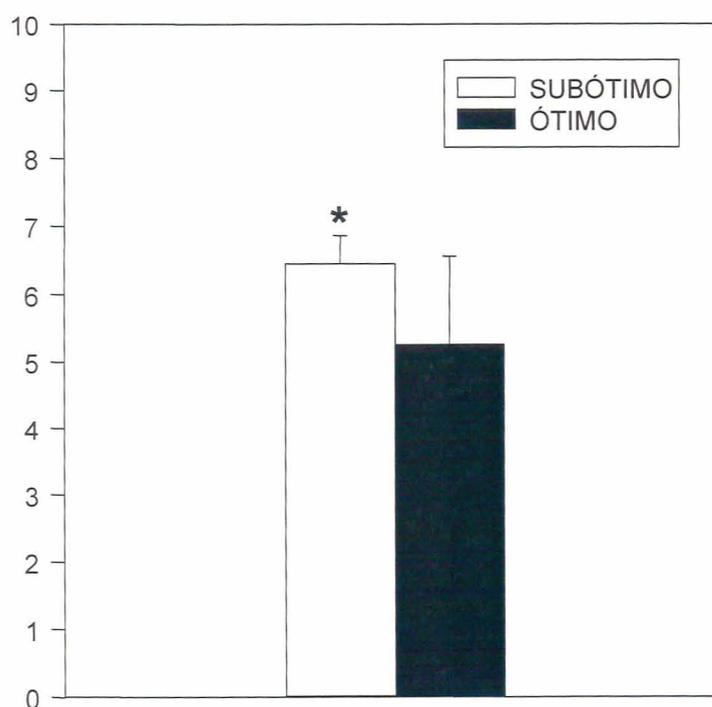


Figura 13 - Escore de lesão histopatológica nos grupos Subótimo e Ótimo

Tabela 7 - Escores de lesão histopatológica nos grupos Subótimo e Ótimo

Amostra	Congestão	Degeneração hidrópica	Necrose	Infiltrado neutrofílico	Esteatose	Escore de lesão histopatológica
Ótimo (n=19)						
6	0	0	1	1	1	3
7	0	1	2	1	1	5
10	1	1	1	2	1	6
11	0	3	1	1	1	6
12	0	0	0	1	1	2
13	0	1	1	2	1	5
14	1	1	1	1	1	5
22	1	2	3	1	1	8
23	1	1	1	1	1	5
24	0	1	2	1	1	5
25	0	2	2	1	1	6
29	1	1	1	2	1	6
30	0	2	1	1	1	5
32	0	1	1	2	1	5
33	1	1	1	1	1	5
38	0	2	1	1	1	5
39	0	2	2	1	1	6
42	0	2	3	1	1	7
44	1	1	1	1	1	5
Média±DP						5,26 ± 1,3
Subótimos (n=15)						
8	2	2	1	1	1	7
9	0	1	1	1	1	4
15	1	1	2	1	1	6
20	0	2	2	2	1	7
21	1	1	1	1	2	6
26	2	2	2	1	1	8
27	1	2	1	1	1	6
28	1	1	1	1	1	5
31	1	1	1	2	2	7
34	0	1	2	1	1	5
35	0	1	3	1	0	5
36	0	2	3	2	1	8
40	1	1	1	2	2	7
41	0	1	2	2	2	7
45	1	2	2	3	1	9
Média±DP						6,46 ± 0,4

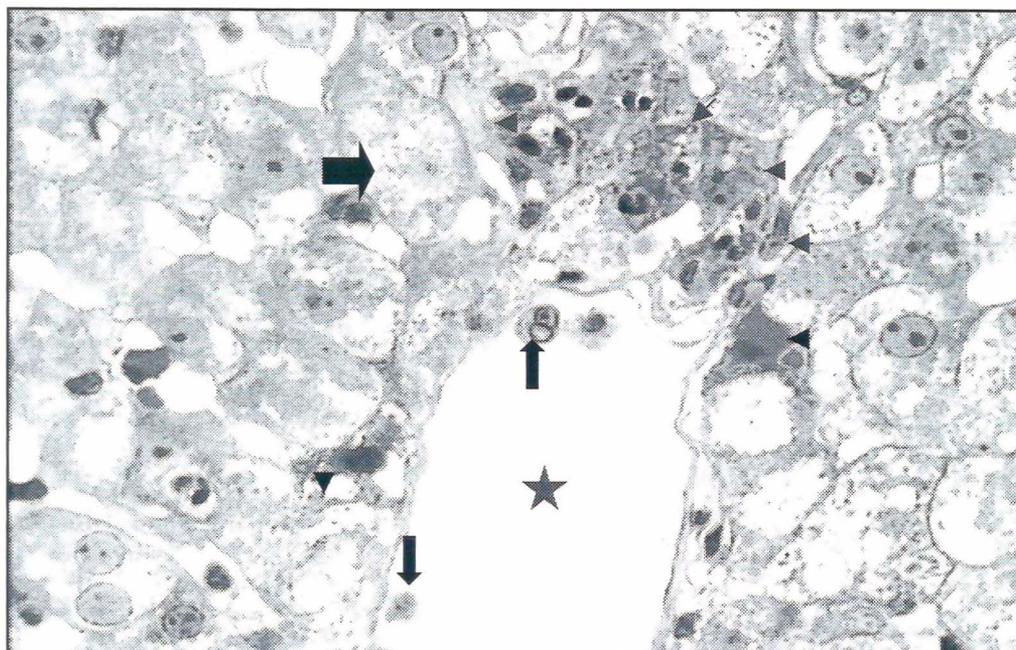
A degeneração hidrópica, a necrose e os infiltrados neutrofílicos foram as alterações celulares observadas com maior frequência e intensidade na fase inicial da reperfusão, que compreende as primeiras duas horas. Algum grau de esteatose apareceu

em todos os órgãos examinados. A congestão sinusoidal foi mínima na maioria dos casos. A frequência relativa dos graus de congestão sinusoidal, degeneração hidrópica, necrose, infiltrado neutrofilico e esteatose nos grupos demonstrou que os maiores graus de lesão foram mais frequentes no grupo Subótimo e que a ocorrência de escores altos compatíveis com lesões importantes foi mínima.

Tabela 8 - Frequência dos graus de lesão nos grupos Subótimo e Ótimo

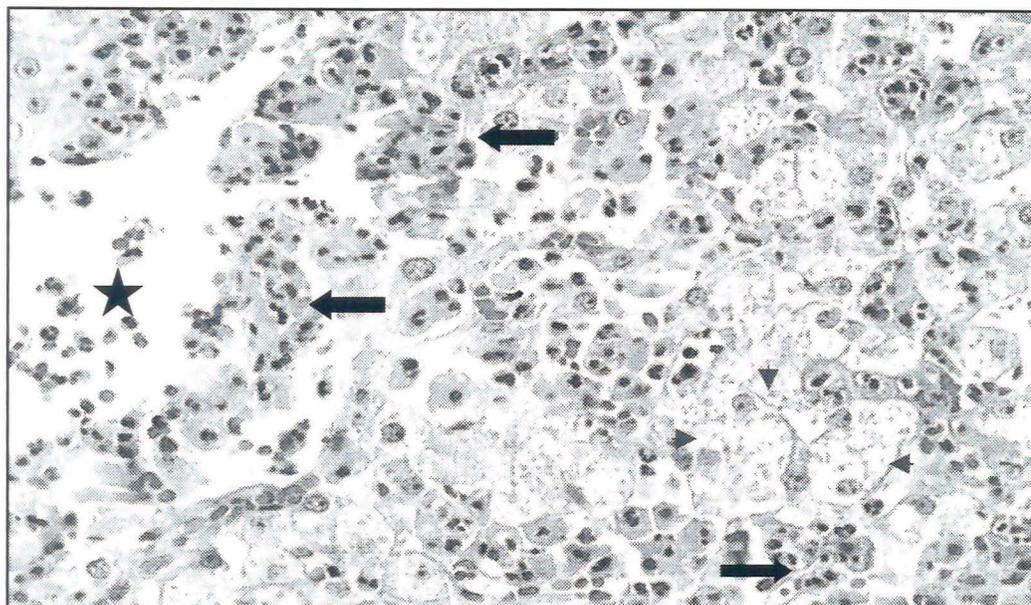
	Grau	Subótimo (n=15) (%)	Ótimo (n= 19) (%)	Total (n=34) (%)
Congestão	0	40	63,1	52,9
	1	46,6	36,8	41,2
	2	13,3	0	5,9
	3	0	0	0
Degeneração hidrópica	0	0	5,88	5,88
	1	60	52,6	55,8
	2	40	31,6	35,2
	3	0	5,26	2,94
Necrose	0	0	5,26	2,9
	1	46,7	63,1	55,9
	2	40	21,1	29,4
	3	13,3	10,5	11,8
Infiltrado neutrofilico	0	0	0	0
	1	60	78,9	70,6
	2	33,3	21,1	26,5
	3	6,7	0	2,9
Esteatose	0	6,7	0	2,9
	1	66,7	100	85,3
	2	26,6	0	11,7
	3	0	0	0

Nenhum dos parâmetros avaliados foi individualmente o responsável pela significância estatística entre os graus de lesão nos grupos. Os achados histopatológicos típicos da reperfusão são apresentados abaixo.



Caso nº 28. Uma veia centrilobular de aspecto normal é mostrada ao centro (estrela). Dentro dela, neutrófilos encontram-se em contato com o endotélio, que tem aparência normal (seta estreita cheia) Os hepatócitos mostram irregularidade e aumento de volume do citoplasma, compatíveis com degeneração hidrópica. (seta larga cheia). Células com o citoplasma fortemente eosinofílico característico da necrose são mostrada próximas à veia centrilobular e esparsas no parênquima (cabeças de seta). Aumento: 200 X

Figura 14 - Fotomicrografia do fígado duas horas após a reperfusão



Caso nº 45. Uma veia centrilobular com o revestimento endotelial comprometido e presença de diversos neutrófilos em sua luz é vista à esquerda (estrela). Intenso infiltrado neutrofilico é visualizado difusamente. (setas estreitas). Células com degeneração hidrópica esparsas são vistas (cabeças de seta). Aumento: 200 X.

Figura 15 - Fotomicrografia do fígado duas horas após a reperfusão

Houve uma elevação nos níveis de aminotransferases em ambos os grupos no primeiro dia pós-transplante, com tendência a queda progressiva nos dias subseqüentes. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

O grau de lesão hepatocelular medido através dos níveis plasmáticos de ALT nos primeiros cinco dias variou de $846,9 \pm 261,1$ U/L a $504,8 \pm 151,0$ U/L no grupo Subótimo enquanto que no grupo Ótimo a variação foi de $585,1 \pm 114,4$ U/L a $331,7 \pm 73,4$ U/L. O grau de lesão hepatocelular medido através dos níveis plasmáticos de AST nos primeiros cinco dias variou de $1423,5 \pm 505,5$ U/L a $298,2 \pm 94,4$ U/L no grupo Subótimo, enquanto que no grupo Ótimo a variação foi de $959,7 \pm 229,7$ U/L a $138,6 \pm 36,1$ U/L.

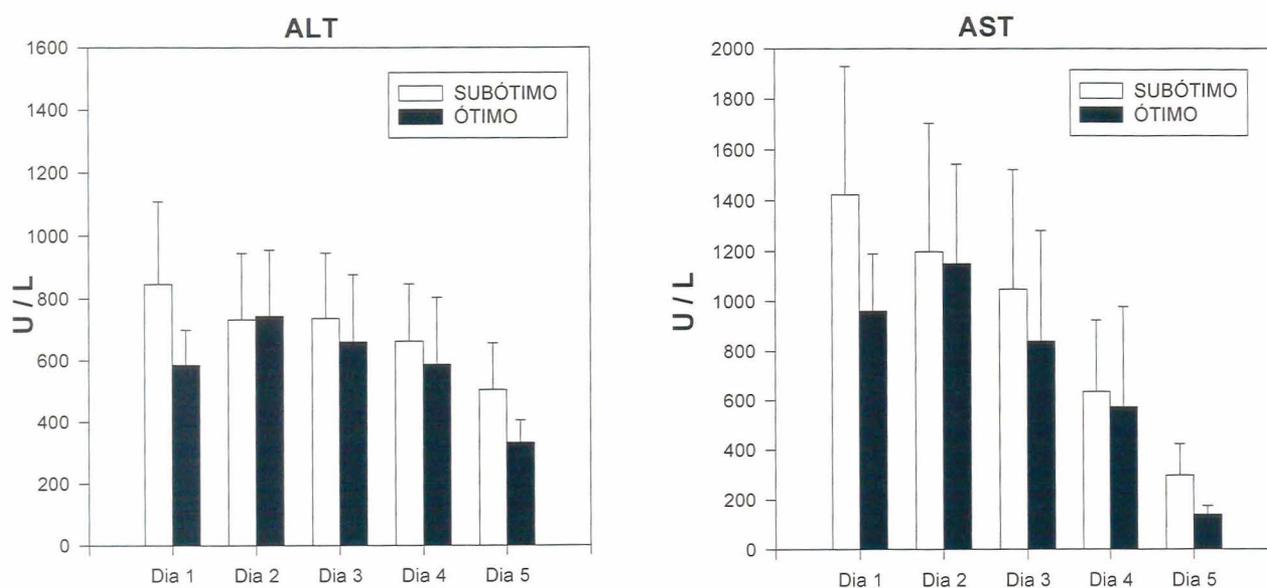
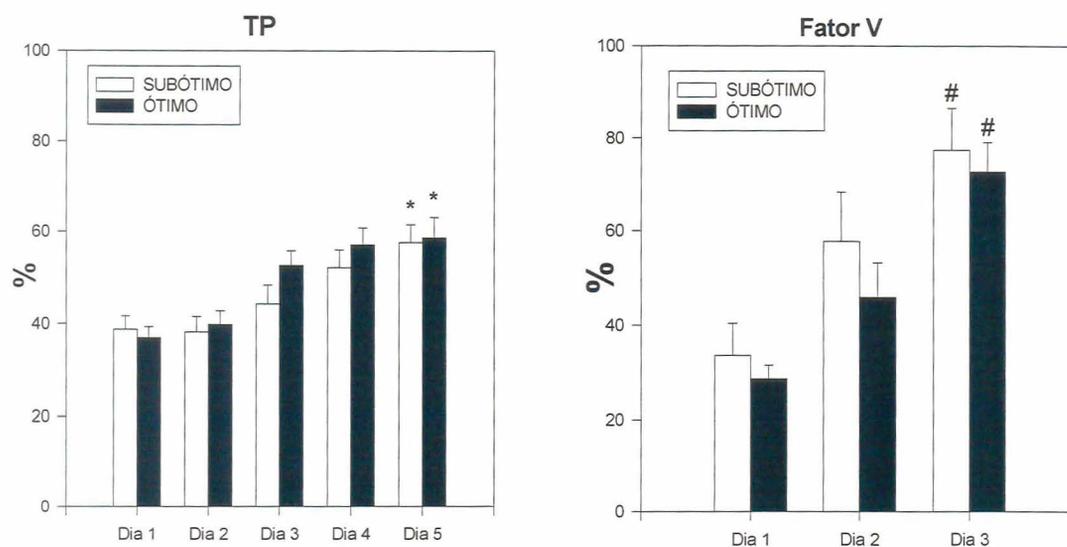


Figura 16 - Variações nos níveis plasmáticos de ALT e AST nos cinco primeiros dias após o transplante

4.7 Função Hepática

A função hepática apresentou uma melhora nos dias subsequentes ao transplante, caracterizada pela elevação progressiva dos níveis do TP e do fator V. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. O TP apresentou uma variação média entre $38,8 \pm 2,9\%$ e $57,6 \pm 3,9\%$ no grupo Subótimo, enquanto que a variação foi de $37 \pm 2,4\%$ e $58,7 \pm 4,4\%$ no grupo Ótimo. O fator V apresentou uma variação média de $33,6 \pm 6,8\%$ e $77,3 \pm 9,2\%$ no grupo Subótimo, enquanto que a variação foi de $28,7 \pm 2,9\%$ e $72,6 \pm 6,5\%$ no grupo Ótimo. Houve um aumento significativo nos níveis de TP quando comparado o primeiro com o quinto dia em ambos os grupos ($p < 0,05$) e um aumento significativo nos níveis do Fator V quando comparados o primeiro com o terceiro dia em ambos os grupos ($p < 0,01$).



* $p < 0,05$ em relação ao Dia 1. # $p < 0,001$ em relação ao Dia 1. (Teste T de Wilcoxon, correção de Bonferroni).

Figura 17 - Variações dos níveis de TP e Fator V nos primeiros cinco dias pós-transplante nos grupos Subótimo e Ótimo

As correlações encontradas entre fatores do doador, GSH, lesão hepatocelular e função foram realizadas por análise bivariada nos grupos Subótimo, Ótimo e no total da amostra.

Tabela 9 - Análise bivariada nos grupos Subótimo e Ótimo

Correlações	Subótimo (I)	Ótimo (II)	Total
GSH 1 X TP	0,524*	0,289	0,305
GSH 1 X ALT	-0,375	-0,260	-0,103
GSH 2 X TP	0,368	0,289	0,155
ELH X Idade	0,549*	-0,029	0,173
ELH X TP	-0,374	-0,386*	-0,466*
ELH X FV	-0,223	-0,496*	-0,333
ELH X ALT	0,122	0,145	0,189
ELH X Esteatose	0,603*	0,358	0,386*
ELH X UTI	0,488	0,222	0,197

Nota: GSH 1 - Glutatião reduzido pré-reperusão, GSH 2 - Glutatião reduzido pós-reperusão ELH - Escore de lesão histopatológica, UTI - Permanência em UTI, TP - Tempo de protrombina. FV - Fator V. * $p < 0,05$ (Índice de correlação de Spearman)

5 DISCUSSÃO

5.1 Mecanismos da Isquemia e Reperusão

A carência de órgãos permanece um obstáculo ao progresso do transplante hepático. Apesar do constante aumento do número de transplantes de fígado, o número de pacientes e de mortes nas listas de espera têm aumentado continuamente, de acordo com dados da United Network for Organ Sharing (UNOS) (SMITH et al., 1999). Em virtude disso, tem-se selecionado com freqüência cada vez maior doadores com idade avançada, esteatose moderada a grave, utilizando doses altas de vasopressores ou mesmo com hipotensão persistente. Apesar das características desfavoráveis, um número considerável destes enxertos têm sido transplantados com sucesso (OKAMOTO et al., 1999).

Entretanto, doadores com estes critérios expandidos de aceitação ou “subótimos” podem estar em risco de disfunção pós-transplante. Desta forma, a utilização desses fígados continua a ser matéria de debate. A aceitação desses órgãos muitas vezes passa pela experiência pessoal de cada grupo ou pela necessidade de se obter um órgão com a máxima urgência. Uma estratégia clara para o uso desses órgãos pode definir uma política para alocação e priorização desses enxertos, estabelecer o exato ponto de corte

para sua aceitação, e permitir a análise das inter-relações dos critérios de marginalidade e suas contribuições individuais em um mesmo doador, tentando assegurar uma adequada sobrevida dos pacientes e dos enxertos, juntamente com uma função aceitável no pós-operatório. As principais dificuldades residem no fato de existirem poucos relatos prospectivos randomizados, com pequeno número de pacientes, poucos estudos de seguimento e falta de consenso quanto aos critérios de marginalidade (BRICEÑO et al., 2001).

A discussão dos danos de preservação em enxertos hepáticos pode ser subdividida em quatro componentes:

- I. danos de pré-preservação (morte encefálica e isquemia quente no doador).
- II. danos de isquemia fria (alterações na função energética celular e da microcirculação durante a preservação).
- III. danos de reaquecimento (isquemia quente durante o implante).
- IV. danos de reperfusão (ação de RLO na fase inicial e de leucócitos na fase tardia).

Estes quatro elementos estão inter-relacionados e podem ser referidos como os danos de isquemia e reperfusão no contexto do transplante hepático.

Os mecanismos exatos que provocam disfunção nos enxertos não estão completamente definidos, bem como o grau de participação de cada um deles. Acredita-se, porém, que os enxertos subótimos podem mostrar uma sensibilidade aumentada aos danos de isquemia e reperfusão (TULLIUS et al., 2001). Alguns relatos têm relacionado

os danos iniciais de reperfusão graves com a ocorrência de disfunção e perda do enxerto no pós-operatório (GAFFEY et al., 1997; BILBAO et al., 1997). Esta susceptibilidade presumivelmente ocorre devido aos danos provocados pelo estresse oxidativo e RLO liberados na reperfusão do órgão (NISHIZAWA et al., 1997) e também pela interação entre neutrófilos e endotélio, que determina a liberação de uma cascata de mediadores inflamatórios nas fases inicial e tardia. Muitos RLO são formados dentro dos hepatócitos durante a reperfusão pelo desdobramento da xantina desidrogenase a xantina oxidase. Por esta reação são formados os radicais superóxido e peróxido de hidrogênio. Este último, por sua vez, à medida que se acumula, facilita a formação dos radicais hidroxila, que tem a capacidade de oxidar qualquer molécula do organismo. Essa seqüência de eventos é bloqueada por um eficiente mecanismo antioxidante, que conta com a participação da catalase e da GSH peroxidase, que impedem a formação do peróxido de hidrogênio, e atuam também diretamente sobre radicais superóxido e ácido hipoclorídico. Estes dois sistemas de detoxificação são vitais para o funcionamento adequado das células. Por isso, a presença de altos níveis de GSH ao término da isquemia fria é importante para combater o estresse oxidativo intracelular (BILZER et al., 1999). Porém, diversos estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo mais intenso da reperfusão no transplante hepático não ocorre no meio intracelular, e sim no meio extracelular (JAESCHKE et al., 1991). Este estresse presumivelmente se deve à liberação de grande quantidade de RLO pelas células de Kupffer ativadas, com a participação secundária de RLO gerados por leucócitos e pelo endotélio. Desta forma, o GSH intracelular é exportado para o meio extracelular para combater o crescente estresse neste compartimento. O fígado é o grande produtor de GSH e exporta regularmente GSH no plasma e na bile. Entretanto, tem sido demonstrado que há uma perda considerável de GSH durante a preservação de órgãos em isquemia fria e que um enxerto privado deste

sistema de defesa pode apresentar lesões graves por ocasião da reperfusão (STEIN et al., 1992, GRATAGLIANO et al., 1999; MAMPRÍM et al., 2000). Estudos experimentais têm demonstrado que o tratamento com antioxidantes é capaz de atenuar os danos de reperfusão, melhorar a função e aumentar a sobrevida dos animais no pós-operatório do transplante hepático (KOEPEL et al., 1996). Os prováveis efeitos se devem à manutenção de níveis adequados de GSH nas mitocôndrias, diminuição da peroxidação lipídica das membranas, inativação de proteases, menor expressão de moléculas de adesão, prevenção da falha microcirculatória e preservação da estrutura do DNA (KUROKAWA et al., 1996; ARMENI et al., 2000).

5.2 GSH e o Estresse Oxidativo em Enxertos Subótimos

O GSH é um tripeptídeo essencial e possui um papel central de defesa contra RLO no transplante hepático. O tratamento de fígados preservados em solução com 2 ou 4 mmol/L de GSH impediu a perda intracelular, preveniu o dano aos hepatócitos e obteve melhora na circulação hepática (BILZER et al., 1999). Até o presente momento, apenas um estudo clínico demonstrou as variações do GSH e GSSG no tecido hepático pré e pós-reperfusão no transplante hepático em humanos (ARDITE et al., 1999).

O presente estudo avaliou os níveis de GSH e GSSG no tecido hepático ao término da preservação hipotérmica e após duas horas de reperfusão em enxertos considerados ótimos e subótimos. Nesta série, houve um intenso estresse oxidativo nos enxertos pós-reperfusão, refletido pela diminuição significativa na razão GSH/GSSG após a reoxigenação do órgão. Todavia, este estresse foi semelhante em ambos os grupos, não existindo diferenças nas médias dos níveis de GSH e GSSG entre os grupos Subótimo e Ótimo antes e após a reperfusão. Estes resultados estão em concordância com outros

autores (MAMPRÍM et al., 2000; RODRÍGUEZ et al., 2000; BILZER et al., 1999; BURKE et al., 2002), que constataram um consumo importante dos estoques de GSH durante a preservação e reperfusão. Entretanto, os resultados contrastam com Ardite et al., que realizaram biópsias hepáticas em diferentes momentos do transplante de fígado em humanos e não conseguiram demonstrar significativo estresse oxidativo antes e após a reperfusão do órgão. Possivelmente, neste estudo, não houve tempo suficiente para um consumo significativo do GSH e formação de GSSG, já que a maioria das biópsias foram realizadas cinco minutos após o enxerto ter sido revascularizado. Já foi demonstrado que 10 ou 30 minutos de reperfusão não são suficientes para alterar os níveis de GSH e GSSG (FUJIKAWA et al., 1994). Além disso, os doadores subótimos foram excluídos da amostra e a mediana de isquemia total foi de apenas 310 minutos. Assim, esses achados sugerem que a diminuição dos tempos de isquemia poderia reduzir também o estresse oxidativo sofrido pelos enxertos, devido à permanência de GSH dentro das células.

Nossos resultados não mostraram nenhum caso com lesões consideradas graves na reperfusão e também não foi encontrada correlação entre os níveis de GSH pré e pós-reperfusão com os danos histopatológicos como se havia postulado na hipótese de trabalho. Uma possível explicação para estes achados talvez seja que as células somente sofrem danos maiores quando todos os estoques de GSH tenham sido depletados (STEIN et al., 1992; FILOMENI et al., 2001). Estes autores concluíram que somente quando o estresse oxidativo é prolongado e as reservas de GSH encontram-se totalmente depletadas é que as células se tornam suscetíveis aos danos pelos RLO. Nossos achados demonstram que houve um alto consumo de GSH nas duas primeiras horas de reperfusão, sendo que em um número expressivo de casos, os níveis de GSH estiveram abaixo de $0,1 \mu\text{mol/g}$ ($n=19$), ou atingiram níveis entre $0,1$ e $0,2 \mu\text{mol/g}$ ($n=11$). É possível que estes valores reflitam os níveis mitocondriais de GSH, pois sob diferentes

condições experimentais, uma depleção quase total dos níveis citoplasmáticos de GSH foi demonstrada na reperfusão seguindo isquemia fria, enquanto que os níveis de GSH mitocondriais não foram afetados. O GSH mitocondrial é o último compartimento a ser totalmente depletado (KOBAYASHI et al., 1993).

Diversos estudos têm demonstrado que a perda do GSH mitocondrial pode ter efeitos deletérios com conseqüente quebra dos gradientes eletroquímicos das membranas, redução da produção de ATP, distúrbios no metabolismo do Ca^{++} , aumento da peroxidação lipídica, danos aos complexos da cadeia de transporte de elétrons e ao DNA, com conseqüente morte celular. Além disso, estudos clínicos têm demonstrado que fígados que desenvolvem PNF não são capazes de produzir ATP e manter a relação NAD/NADH. Estes dois últimos parâmetros são controlados pelas mitocôndrias (ARMENI et al., 2000; GRATTAGLIANO et al., 1999; KUROKAWA et al., 1996). Tem-se demonstrado que em tecidos cuja depleção de GSH está associada com danos celulares, as mitocôndrias apresentam edema importante, compatível com a disfunção dessa organela (WILL et al., 2000). Uma depleção grave de GSH citoplasmático ainda é compatível com a viabilidade celular, ao contrário da depleção mitocondrial (ARMENI et al., 2000).

Por outro lado, tem-se demonstrado que o estresse oxidativo permanece na segunda fase da reperfusão, mediada principalmente pelos leucócitos (BIASI et al., 1995). Este pode ser o momento em que há o esgotamento total das reservas de GSH, permitindo que haja uma quebra da homeostase e facilitação dos danos provocados pelos leucócitos, com comprometimento da microcirculação. Foi demonstrado em nível experimental que a liberação de RLO provocada pelas células de Kupffer duas horas após a reperfusão é a responsável pela falha microcirculatória que ocorre após o transplante, e que esta falha é coincidente com o aumento dos níveis de GSSG plasmáticos. Os autores sugerem que

os RLO parecem ser os principais agentes que determinam o início da fase tardia da reperfusão (SCHAUER et al., 2001). Neste mesmo estudo, a função hepática não sofreu alterações com o bloqueio funcional das células de Kupffer, sugerindo que a função hepática não possui correlação com a liberação de RLO na reperfusão inicial. Em nossa série, porém, foi demonstrada uma correlação entre os níveis de GSH pré-reperfusão com os níveis de TP no grupo Subótimo. Neste grupo, as taxas de disfunção também foram maiores. Esse achado sugere que os RLO liberados na reperfusão podem desempenhar um papel deletério nos enxertos subóticos e determinar uma perda de função desses enxertos nos dias subsequentes ao transplante. Entretanto, o presente estudo não conseguiu demonstrar uma correlação entre o GSH pós-reperfusão com os níveis de TP. Uma possível explicação seria um número amostral insuficiente para atingir a significância estatística, já que o GSH pós-reperfusão apresentou uma correlação próxima à significância com o TP no grupo Subótimo ($p = 0,088$).

Nossos resultados também indicam que possivelmente houve um consumo de GSH e aumento de GSSG durante a preservação hipotérmica, já que o GSSG representou 35% do glutatião total ao término da preservação e, em condições fisiológicas, o GSSG representa 1 a 10% da quantidade de glutatião total. Este efeito deve-se provavelmente à produção de RLO e consumo de GSH durante a preservação. Entretanto, pode ter havido uma contribuição do estresse oxidativo que ocorre no período pré-preservação, já que os níveis de GSH e GSSG podem sofrer alterações durante o período de morte encefálica (OKABE et al., 1994). Embora estes achados sugiram um estresse durante a morte encefálica e preservação, a quantificação destes efeitos não foi realizada. Alguns investigadores têm demonstrado experimentalmente em roedores que o processo de morte encefálica é um dos elementos responsáveis pela deterioração na viabilidade do enxerto e na sua disfunção (OKAMOTO et al., 1999; VAN DER HOEVEN et al., 2002).

Provavelmente existe uma participação da situação hemodinâmica, da microcirculação e da homeostase hormonal nesse contexto. Entretanto, estes achados não foram confirmados em um modelo experimental utilizando cães (COMPAGNON et al., 2002) e por isso, o papel da morte encefálica na disfunção dos enxertos continua indefinido.

5.3 Lesão Histopatológica

Em nossa série, os enxertos do grupo Subótimo mostraram escores de lesão histopatológica duas horas após a reperfusão significativamente maiores que os enxertos do grupo Ótimo. Este achado é um indício de que os enxertos subótimos são mais suscetíveis à ação dos RLO que os enxertos ótimos. Uma possível explicação para este achado é o acúmulo de fatores de risco no grupo Subótimo. Alguns relatos têm demonstrado que o acúmulo de critérios de marginalidade no doador é responsável por lesões mais intensas na reperfusão e por taxas de disfunção inaceitáveis (BRICEÑO et al., 2000). Em concordância com estes autores, nossos resultados mostraram uma frequência maior de disfunção no pós-operatório nos enxertos do grupo Subótimo. Três dos quatro casos de disfunção foram diagnosticados neste grupo. Porém, semelhante ao estudo de Briceño et al., o pequeno número de casos de disfunção em nossa série não foi suficiente para que se chegasse a uma conclusão definitiva sobre a repercussão dos danos de reperfusão histopatológicos sobre a elevação nas taxas de disfunção. Nossos resultados também constataram que as lesões histopatológicas apresentam correlação significativa com a idade e com a esteatose de graus moderado e grave no doador. Uma tendência semelhante ocorreu com a presença de hipotensão no doador. Quando a análise multivariada foi realizada, a presença de esteatose no doador foi o fator de risco que

contribuiu de forma mais significativa para o aumento dos escores de lesão histopatológica.

Entretanto, a análise individual dos parâmetros histopatológicos selecionados não revelou nenhum deles como responsável individualmente pela significância estatística atingida nos escores de lesão histopatológica entre os grupos Subótimo e Ótimo. Aparentemente houve uma contribuição de cada fator analisado no resultado final. Tem sido demonstrado que a presença de necrose focal grave e abundantes infiltrados neutrofílicos são os achados histopatológicos mais importantes para prever o surgimento de IPF no pós-operatório (BUSQUETS et al., 2002; GAFFEY et al., 1997). É possível que nos primeiros minutos de reperfusão exista uma condição de estresse generalizado seguido pela recuperação celular ou a evolução para necrose. Provavelmente, a maioria das células se recupera deste insulto e a função do fígado é completamente restaurada. Em contraposição, se o número de células necróticas é muito alto, uma falência irreversível da função poderia ocorrer (ARMENI et al., 2000).

Outros autores demonstraram que a realização de biópsias no doador ou então nas primeiras horas de reperfusão no receptor podem ser ferramentas úteis para predizer a função e os danos de preservação. Markin et al., 1993 conseguiram uma diminuição de 8,5% para 1,5% nas taxas de PNF realizando biópsias em todos os doadores, descartando principalmente os casos de esteatose moderada a grave e casos com fibrose periportal. Já Gaffey et al., 1997 concluíram que a realização de biópsias no período inicial da reperfusão podem predizer com segurança os danos de preservação e reperfusão nos primeiros dias de pós-operatório.

A isquemia fria maior que 12 horas também tem sido implicada com os danos de reperfusão graves (BILBAO et al., 1997). No presente estudo, as médias de isquemia fria

nos grupos Subótimo e Ótimo foram de 712 ± 49 e 610 ± 27 minutos, respectivamente, valores próximos a 12 horas. Cinco casos apresentaram tempos de isquemia fria maiores do que 14 horas, todos no grupo Subótimo. Entretanto, em apenas um deles o escore de lesão histopatológica alcançou uma pontuação compatível com danos considerados moderados. Apesar dos tempos de isquemia mais elevados no grupo Subótimo, não foram constatadas diferenças significativas entre os grupos. Estes achados sugerem que os tempos de isquemia não foram os responsáveis pelo aumento dos escores de lesão histopatológica no grupo Subótimo e que um ponto de corte de 12 horas pode não ser adequado para prever lesões graves nos enxertos, mesmo com o acúmulo de critérios de marginalidade. Estes resultados são semelhantes aos de Ploeg et al., que demonstrou clinicamente que a preservação de fígados por mais de 17 horas não aumentou as taxas de disfunção. Em situações especiais, entretanto, estes autores sugerem que estes resultados sejam interpretados com cautela. Na presença de um grande número de fatores de risco do doador e do receptor, o tempo de isquemia é a única variável que pode ser controlada e, portanto é prudente tentar diminuir os tempos de isquemia ao máximo. Na ausência de fatores de risco, estes autores consideram justificada a prática de tempos de preservação mais prolongados (PLOEG et al., 1993).

5.4 Variáveis do Doador Subótimo e os Danos de Reperusão

Fatores clínicos e biológicos de doadores hepáticos não têm mostrado afetar a sobrevida global. Se determinadas variáveis isoladas dos doadores e enxertos influenciam o resultado, e conseqüentemente, a sobrevida do enxerto, é uma questão ainda não resolvida. Evidências sugerem que as más condições do doador, independente da variável estudada, estão diretamente associadas com a disfunção do enxerto no pós-operatório.

Alguns relatos têm correlacionado as variáveis do doador com a gravidade dos danos de preservação e reperusão (PLOEG et al., 1993; BILBAO et al., 1997; BUSQUETS et al., 2002; BRICEÑO et al., 2002). Hipoteticamente, os fígados de doadores subótimos estão sujeitos a danos de preservação mais intensos, comparados àqueles de boa qualidade, e esse efeito deve se correlacionar com o número de critérios de marginalidade acumulados no doador. No presente estudo, a análise mostrou que a média do número de fatores de risco do doador entre os dois grupos foi significativa, o que se refletiu nos escores de lesão histopatológicos mais elevados no grupo que acumulou fatores de risco.

Briceño et al. relataram que cinco variáveis de doadores subótimos (infiltração gordurosa do fígado moderada a grave, altas doses de inotrópicos, tempo prolongado de internação em UTI, tempo prolongado de isquemia fria e idade avançada) estavam estritamente relacionadas com o desenvolvimento de dano de preservação moderado a grave com uma acurácia de 70% (BRICEÑO et al., 2001). Em outro estudo destes autores, a presença de três ou mais critérios de marginalidade em um mesmo doador, analisados por regressão logística, foi responsável pelo aparecimento de uma alta porcentagem de enxertos com danos de preservação e disfunção graves, considerados inaceitáveis. Da mesma forma, outros autores já haviam publicado a contribuição relativa de cada um dos fatores de risco do doador sobre a incidência de PNF ou IPF. Ploeg et al, analisando retrospectivamente 331 transplantes, demonstraram que o tempo de internação em UTI superior a três dias, a idade avançada e a esteatose resultaram em um aumento significativo na taxa de disfunção hepática inicial. Nos doadores com esteatose superior a 60%, a incidência de PNF também foi aumentada (PLOEG et al., 1993). Resultados semelhantes foram obtidos por Rull et al., que demonstraram que a idade acima de 65 anos e a presença de esteatose apresentavam um impacto negativo na sobrevida em dois anos (RULL et al., 2002).

Em nosso estudo, a idade do doador apresentou correlação moderada com o grau de lesão histopatológica encontrada duas horas após a reperfusão apenas no grupo Subótimo. Possivelmente este achado se deve ao acúmulo de critérios de marginalidade neste grupo, pois a média de idade foi idêntica para os doadores Ótimos e Subóticos e a análise multivariada não mostrou a idade como um dos principais determinantes do escore de lesão histopatológica. Em nossa série foi demonstrada uma correlação moderada entre a esteatose do doador e o grau de lesão histopatológica duas horas após a reperfusão quando toda a amostra foi avaliada. Esta correlação se tornou forte quando o grupo Subótimo foi avaliado isoladamente. Estes achados são semelhantes aos encontrados por Nardo et al., que demonstrou experimentalmente que fígados com infiltração gordurosa têm uma produção aumentada de RLO, maior peroxidação lipídica das membranas e uma tolerância reduzida à reperfusão do órgão (NARDO et al., 2001). Este efeito possivelmente está associado à depleção dos estoques de glicogênio (CARACENI et al., 1999) e redução das reações de fosforilação mitocondriais (RASHID et al., 1999). A análise multivariada demonstrou que a esteatose no doador foi o fator de maior importância para o aumento significativo do escore de lesão histopatológica em todo o grupo. Tem sido demonstrado que a esteatose macrovesicular acima de 30% ou a esteatose microvesicular acima de 60% são fatores de risco independentes para o surgimento de IPF. Porém, a sobrevivência a longo prazo desses enxertos não foi afetada (BUSQUETS et al., 2002). Da mesma forma, a permanência do doador em UTI acima de 5 dias também tem sido demonstrada como um fator independente para disfunção no pós-operatório. Outros autores constataram que fatores de risco do doador para lesão isquêmica grave, como a idade, alterações nas provas hepáticas, aspecto do fígado, instabilidade hemodinâmica, tempo de isquemia, sódio maior que 150 mmol/L e variáveis do receptor, tais como a idade, sexo, escore de Child, função renal prévia,

tempo cirúrgico, tempo de fase anepática e transfusão de hemoderivados não mostraram correlação com a presença de disfunção no pós-operatório (BILBAO et al., 1997). Em nosso estudo, houve uma correlação próxima à significância entre o escore de lesão histopatológica duas horas após a reperfusão com o tempo médio de internação do doador em UTI apenas no grupo Subótimo ($p= 0,065$). A média de permanência em UTI no grupo Subótimo foi de 5,6 dias. Independente dos fatores individuais que podem ser responsáveis por IPF, a associação de diversos fatores de risco parece ser mais importante do que critérios isolados (BRICEÑO et al., 2000).

Por esses achados torna-se claro que a seleção do doador tem um papel importante nos resultados. Entretanto, a capacidade de predizer a função de um órgão antes do transplante tem provado ser uma tarefa difícil. Não existe atualmente método ou ensaio objetivo capaz de avaliar a função potencial de um enxerto hepático, sendo o próprio transplante o único teste definitivo para testar a função do enxerto e sua viabilidade (COMPAGNON, 2002).

5.5 Lesão Hepatocelular e Função dos Enxertos

Tradicionalmente, os níveis de transaminases têm sido utilizados para acompanhar a evolução dos enxertos e diversos estudos estabelecem um pico de 1500 U/L de AST como disfunção inicial. Entretanto, estes testes são relativamente insensíveis e inespecíficos, pois expressam apenas as lesões dos hepatócitos periportais (TIAINEN et al., 1996). Embora seja assumido que a perda de função hepática se correlaciona com a liberação de enzimas, existe pouca evidência experimental para suportar esta hipótese. Uma possível explicação para a elevação súbita nas transaminases seria que as bolhas que surgem nas membranas durante a preservação, contendo enzimas citoplasmáticas,

são descartadas na circulação plasmática após a reperfusão (BAILEY, 2000). Em nosso estudo, as lesões teciduais na fase inicial de reperfusão não mostraram correlação com os níveis das aminotransferases nos dias subsequentes ao transplante. Estes achados são indícios de que as aminotransferases podem não aferir com fidedignidade a integridade do parênquima hepático e são semelhantes aos de outros autores, que demonstraram que as aminotransferases não foram úteis em predizer os danos de preservação e reperfusão no transplante hepático (GAFFEY et al., 1997). Porém, foi demonstrado que a sobrevida é influenciada pelos danos de reperfusão quando os níveis de AST são superiores a 5000 U/L. Estes níveis, considerados como lesões de reperfusão graves, foram responsáveis pelo aumento das taxas de PNF, retransplantes e conseqüentemente, do número de óbitos totais (ROSEN et al., 1998). Outros autores encontraram uma correlação fortemente positiva entre os níveis de transaminases ao término da preservação de fígados humanos, coletados no perfusado, com os casos que apresentaram disfunção no pós-operatório. Estes autores sugerem que quando a atividade enzimática é baixa ao término da preservação, as chances de disfunção são mínimas, enquanto que uma atividade alta não significa necessariamente que ocorrerá disfunção (LANGE et al., 1996).

No presente estudo, a função hepática avaliada pelo TP e Fator V mostrou uma recuperação semelhante em ambos os grupos, embora o TP tenha apresentado níveis médios considerados fora da variação normal ao término do quinto dia. Entretanto, a comparação entre o primeiro e quinto dia mostrou uma elevação significativa nos níveis de TP. Já o Fator V apresentou uma elevação progressiva, alcançando valores médios dentro da faixa normal no terceiro dia de pós-operatório. A comparação entre o primeiro e o terceiro dia também mostrou uma elevação significativa nos valores do Fator V. Estes achados demonstram que na ausência de lesões graves, os enxertos se recuperam de um modo satisfatório nos primeiros dias pós-transplante.

5.6 Perspectivas para o Uso de Antioxidantes no Transplante Hepático

Embora as causas que levam um enxerto a desenvolver PNF não tenham sido definidas, a capacidade de predizer disfunção ou não função antes do transplante tem o potencial para redução dos custos associados com órgãos disfuncionais. O risco para o receptor de ser implantado um órgão potencialmente disfuncional pode ser significativamente maior que o risco incorrido de não realizar um transplante precoce na história natural da doença do paciente. Por isso, o destino destes órgãos deve estar em constante avaliação. Alguns autores sugerem que os pacientes mais graves e mais idosos seriam os que mais se beneficiariam dos enxertos subótimos, pois estes pacientes têm maior mortalidade nas listas de espera. Outros, porém, sugerem que os melhores candidatos seriam aqueles mais jovens e com melhores condições clínicas, com reservas suficientes para tolerar uma possível disfunção do órgão na fase inicial (TULLIUS et al., 2001). No presente estudo, 11,8% dos enxertos apresentaram disfunção de acordo com os critérios adotados. A taxa de disfunção no grupo subótimo foi de 20%, enquanto a taxa de disfunção no grupo ótimo foi de 5,26%. Estas taxas de disfunção estão em concordância com outros relatos (PLOEG et al., 1993 REGUEIRA et al., 1997). O único caso de disfunção no grupo Ótimo foi em um paciente transplantado por hepatite fulminante. No pós-operatório, esta disfunção revelou-se posteriormente compatível com uma PNF e o paciente foi a óbito precocemente, o único deste estudo. A análise deste órgão, entretanto, não revelou alterações importantes no escore de lesão histopatológica. Este achado sugere que a disfunção grave ocorreu em função das condições precárias do receptor, e não em virtude da qualidade do enxerto. Um paciente foi retransplantado no vigésimo quinto dia em virtude de trombose da veia hepática direita. Apenas dois pacientes foram reintervidos para remoção de hematoma abdominal. Nenhuma fistula foi

diagnosticada durante o acompanhamento. Não houve diferença significativa no número de dias de permanência hospitalar entre os grupos Ótimo e Subótimo. A sobrevida até o momento é de 97,1%.

Este estudo relata pela segunda vez os níveis de GSH dentro do tecido hepático em diferentes momentos do processo de transplante, e pela primeira vez correlaciona estes níveis entre grupos distintos de doadores. Nossos resultados indicam a presença de um intenso estresse oxidativo nos enxertos durante a preservação e reperfusão. O emprego de estratégias que buscam evitar lesões cumulativas nos enxertos através do pré-tratamento do doador é uma alternativa atraente e diversos estudos têm sido conduzidos, principalmente em nível experimental. (HAYASHI et al., 1991; STEIN et al., 1992; ANTHUBER et al., 1996; NISHIZAWA et al., 1997; DUNNE et al., 1997). Ainda, o tratamento clínico com N-acetilcisteína (THIES et al., 1998), precursor do GSH, e experimental com ésteres de glutatião (GRATTAGLIANO et al., 1999) têm-se mostrado promissores. Este estudo revelou o comportamento dos níveis de GSH em duas populações diferentes de doadores no transplante de fígado humano, demonstrando que o acúmulo de critérios ou fatores de risco no doador podem ser responsáveis por um aumento nas lesões histopatológicas na reperfusão inicial, e possivelmente também das taxas de disfunção. Certamente, uma amostra mais significativa e um número maior de casos de disfunção poderiam responder esta questão com segurança.

Embora este estudo não tenha demonstrado claramente o benefício da manutenção dos níveis de GSH ao término da isquemia fria, podemos assumir que quando este consumo é excessivo as células estarão em risco no momento da reperfusão, devido ao intenso estresse oxidativo que é imposto aos enxertos, apesar da grande resistência que o fígado apresenta nas fases iniciais da reperfusão. Estes achados justificam o emprego de

métodos para o combate ao estresse oxidativo e preservação da função dos enxertos no transplante hepático.

6 CONCLUSÕES

- O estresse oxidativo nos enxertos hepáticos foi intenso e significativo após duas horas de reperfusão.
- Enxertos ótimos e subótimos apresentaram um comportamento semelhante frente ao estresse oxidativo.
- Os danos histopatológicos da reperfusão inicial foram significativamente maiores no grupo Subótimo.
- Não houve correlação entre os níveis de GSH, GSSG ou da razão GSH/GSSG com a lesão e função hepática duas horas após a reperfusão e nos primeiros cinco dias de transplante.
- Os escores de lesão histopatológica da reperfusão inicial apresentaram correlação com a função hepática (TP) no grupo total nos primeiros dias de pós-operatório.
- A esteatose no doador foi um fator de risco independente para predizer as lesões histopatológicas na reperfusão inicial.

REFERÊNCIAS

Adam R, Azoulay D, Astarcioglu I. Limits of MEGX test in the selection of liver grafts for transplantation. *Transplant Proc*, 1993a; 25(1): 1653-4.

Adam R, Reynes M, Bao YM. Impact of glycogen content of the donor liver in clinical transplantation. *Transplant Proc*, 1993b; 25(1) 1536-37.

Adam R, Bismuth H, Diamond T. Effect of extended cold ischemia with UW solution on graft function after liver transplantation. *Lancet*, 1992; 340(8832): 1373-6.

Anderson ME. Glutathione and glutathione delivery compounds. *Adv Pharmacol*, 1997; 38: 65-78.

Anthuber M, Farkas S, Rihl M, Menger MD, Jauch KW, Schildberg FW, Messmer K. Conditioning of liver grafts by donor bolus pretreatment with epoprostenol. *Transplantation*, 1996; 62(1): 13-17.

Ardite E, Ramos C, Rimola A, Grande A, Fernández-Checa JC. Hepatocellular oxidative stress and initial graft injury in human liver transplantation. *J Hepatology* 1999; 31:921-27.

Armeni T, Ghiselli R, et al. Glutathione and ultrastructural changes in inflow occlusion of rat liver. *J Surg Res*, 2000; 88: 207-214.

Bachmann S, Bechstein WO, Keck H . Pilot study: Carolina rinse solution improves graft function after orthotopic liver transplantation in humans. *Transplant Proc*, 1997; 29: 390-92.

Bailey SM; Reinke LA. Effect of low flow ischemia-reperfusion injury on liver function. *Life Sci*, 2000; 66(11): 1033-44.

Ben-Ari Z, Hochhauser E, Burstein I, Papo O, Kaganovski E, Krasnov T, Vamichkim A, Vidne BA. Role of anti-tumor necrosis factor alpha in ischemia/reperfusion injury in isolated rat liver in a blood-free environment. *Transplantation*, 2002; 73(12):1875-80.

- Belzer FO, Ashby BS, Dunphy JE. 24 hour and 72 hour preservation of canine kidneys. *Lancet* ii: 5363,1987.
- Biasi F, Bosco M, Chiappino I, Chiarpotto, Lanfranco G, Ottobrelli A, Massano G, Donadio PP, Poli G. Oxidative damage in human liver transplantation. *Free Rad Biol Med* 1995; 19(3): 311-17.
- Bilbao I, Charco E, Hidalgo, JL, Balsells E, Murio E, Margarit C. Risk factors for severe ischemic injury after liver transplantation. *Transplant Proc*, 1997; 29:368-70.
- Bilzer M, Gerbes, AL. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *J Hepatol*, 2000; 32:508-15.
- Bilzer M, Paumgartner G, Gerbes AL. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after hypothermic preservation. *Gastroenterology*, 1999; 117:200-12.
- Bilzer M, Lauterburg BH. Oxidant stress and potentiation of ischemia/reperfusion injury to the perfused rat liver by human polymorphonuclear leucocytes. *J Hepatol*, 1994; 20: 473-7.
- Bilzer M, Paumgartner G, Gerbes AL. Protein Kinase C (PKC) and prostaglandin mediate vasoconstriction during oxidative liver injury: a novel pathomechanism of portal hypertension. *Hepatology*, 1998; 28:1142A.
- Bomzon A, Ljubuncic P. Oxidative stress and vascular smooth muscle cell function in liver disease. *Pharmacol Therapeu*, 2001; 89: 295-308.
- Boudjema H, Ellero B, Barguil Y et al. Addition of reduced glutathione to UW solution: clinical impact in liver transplantation. *Transplant Proc*, 1991; 23 (5): 2341-43.
- Bresci G, Piccinocchi M, Banti S. L'impiego del glutathione ridotto nell'epatopatia alcolica. *Minerva Med* 1991; 82:753-5.
- Briceño J, Marchal T, padillo J, Solórzano G, Pera C. Influence of marginal donors on liver preservation injury. *Transplantation*, 2002; 74(4): 522-26.
- Briceño J, Pera-Rojas C, Juch M, et al. Intraoperative assessment of liver transplantation with marginal liver grafts. *Transplant Proc*, 2001; 33:903-05.
- Briceño J, Solórzano G, Pera C. A proposal for scoring marginal liver grafts. *Transpl Int*, 2000; 13: 249-52.
- Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Rad Biol Med*, 1999; 27(9/10):951-65.
- Burke A, FitzGerald G, Lucey M. A prospective analysis of oxidative stress and liver transplantation. *Transplantation*, 2002; 74(2): 217-21.
- Busquets J, Serrano T, Figueras J, Ramos E, Torras J, Rafecas A, Fabregat J, Xiol X, Lama C, Ibañez L, Jaurrieta E. Influence of donor postreperfusion changes on graft evolution after liver transplant. *Transplant Proc*, 2002; 34: 252-53.

Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Gao W, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Reperfusion injury to endothelial cells after storage of rat livers: protection by mildly acidic pH and lack of protection by antioxidants. *Transplant Int*, 1995; 8: 77-85.

Carini R, De Cesaris, MG, Bellomo G, Albano E. Intracellular Na⁺ accumulation and hepatocyte injury during cold storage. *Transplantation*, 1999; 68(2): 294-7.

Caraceni P, Nardo B, Domenicali M, Turi P, Vici M, Simoncini M. Ischemia-reperfusion injury in rat fatty liver: Role of nutritional status. *Hepatology*, 1999; 29:1139-46.

Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick, MD, Kunkel RG, Wilke CS, Strieter RM,. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology*, 1996; 23(3): 506-14.

Collins GM, Bravo-Sugarman M, Terasaki PI. Kidney preservation for transportation *Lancet I* : 1219,1969.

Compagnon P, Wang H, Lindell S, Ametani M, Mangino MJ, D'Alessandro, AM, Southard JH. Brain death does not affect hepatic allograft function and survival after orthotopic transplantation in a canine model. *Transplantation*, 2002; 73(8): 1218-27.

Corso CO, Okamoto S, Rüttinger D, Messmer K. Hypertonic saline dextran attenuates leucocyte accumulation in the liver after hemorrhagic shock and resuscitation. *J Trauma*, 1999; 46(3): 417-23.

Currin RT, Caldwell-Kenkel JC, Lichtmann SN et al. Protection by Caroline Rinse Solution, acidotic pH, e glycine against lethal reperfusion injury to sinusoidal cells of rat livers stored for transplantation. *Transplantation*, 1996; 62:1549-58.

Cutrin JC, Cantino D, Biasi F, Chiarpotto E Sallizzoni M, Andorno E, et al. Reperfusion damage to the bile canaliculi in transplants human liver. *Hepatology* 1996; 24: 1053-57.

Dunne JB, Piratvisuth T, Williams R, Tredger M. Treatment of experimental ischemia/reperfusion injury with s-adenosylmethionin. *Transplantation*,1997; 63(4): 500-06.

Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR. Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem Pharmacol*, 2002; 64:1057-64.

Fujikawa M, Kamike W, Hatanaka N, Shimizu S, Akashi A, Miyata M, Kurosawa S, Yoshida Y, Tagawa K, Matsuda H. Changes in biliary glutathione level during ischemia-reperfusion of rat liver. *J Surg Res*, 1994; 57: 569-73.

Gaffey MJ, Boyd JC, Traweek ST, Ali MA, Rezeig M, Caldwell SH, Iezzoni JC, McCullough C, Stevenson W, Khuroo NN, Ishitani MB, Pruett TL. Predictive value of intraoperative biopsies and liver function tests for preservation injury in orthotopic liver transplantation. *Hepatology*, 1997; 25(1): 184-89.

Gao W, Bentley RC, Madden JF, et al. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology* 1998; 27:1652-60.

- Gebhard MM, Kirlum HJ, Schlegel C. Organ Preservation with HTK and UW solutions. Update on clinical use and experimental studies. Ed. Pabst Science Publishers, Lengerich, 1999; Pg 75-87.
- Grattagliano I, Vendemiale G, Lauterburg H. Reperfusion injury of the liver: role of mitochondria and protection by glutathione ester. *J Surg Res*, 1999; 86: 2-8.
- Hayashi T, Nagasue N, Kohno H, Chang YC, Nakamura T. Beneficial effect of cyclosporine pretreatment in canine liver ischemia. *Transplantation*, 1991; 52(1): 116-21.
- Höckerstedt K, Harjula A. Atlas of Clinical Transplantation. 1st edition, 1995; Ed. Recallmed.
- Imamura H, Sutto F, Brault A, Huet P-M. Role of kupffer cells in cold ischemia/reperfusion injury of rat liver. *Gastroenterology*, 1995; 109: 189-197.
- Jaeschke H, Smith CV, Mitchell JR. Reactive oxygen species during ischemia-reperfusion injury in isolated perfused rat. *J Clin Invest* 1988; 81: 1240-6.
- Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and kupffer cells-induced oxydant stress and ischemia-reperfusion in the rat liver. *Am J Physiol* 1991; 260: 355-62.
- Jaeschke H. Preservation Injury: mechanisms, prevention and consequences. *J Hepatol*, 1996; 25:774-80.
- Jamieson NV, Lindell S, Sundberg R, Southard JH, Belzer. An analysis of the components in UW solution using the isolates perfused rabbit liver. *Transplantation*, 1988; 46(4): 512-16.
- Jamieson NV. An overview of abdominal organ preservation for transplantation. *Organ Preservation with HTK and UW solution*. Pg 19-36, 1999.
- Jassem W, Battino M, Cinti C, Norton SJ, Saba V, Principato G. Biochemical changes in transplanted rat liver stored in University of Winsconsin and Euro-Collins solutions. *J Surg Res*, 2000; 94, 68-73.
- Jassem W, Roake JA. The molecular and cellular basis of reperfusion injury following organ transplantation. *Transplant Rev*, 1998; 12:14.
- Kahan BD. The Jean Borel symposium. *Transplant Proc*, 1999;31(supl ½ A): 3-61.
- Kalayoglu M, Sollinger HW, D'Alessandro AM, et al. Successful extended preservation of the liver for clinical transplantation. *Lancet*, 1988;1 617-20.
- Kato Y, Tanaka J, Koyama K. Intralobular heterogeneity of oxidative stress and cell death in ischemia-reperfused rat liver. *J Surg Res*, 2001; 95:99-106.
- Keefe EB. Liver Transplantation. Current status and novel approaches to liver replacement. *Gastroenterology*, 2001; 120:749-62.
- Kidd PM. Glutathione: Systemic protectant against oxidative stress and free radical damage. *Altern Rev Med*, 1997; 1:155-76.

- Kobayashi H, Kurokawa T, Kitahora S, Nomami T, Hara A, Nakao A, et al. The effects of γ -glutamylcysteine ethyl ester; a prodrug of glutathione on ischemia-reperfusion induced injury in rats. *Transplantation*, 1993; 54: 414-18.
- Koeppel TA, Lehman TG, Thies JC, Gehrcke R, Gerhard MM, Herfarth C. Impact of N-acetylcysteine on the hepatic microcirculation after orthotopic liver transplantation. *Transplantation*, 1996; 1561(9):1397-402.
- Kohli V, Selzner M, Madden JF, Clavien PA. Endothelial cell and hepatocyte death occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation*, 1999a ; 67:1099-105.
- Kukan M, Vajdová K, Horecky J, Nagyová A, Mehendale HM. Effect of blockade of kupffer cells by gadolinium chloride on hepatobiliary function in cold ischemia-reperfusion injury of rat liver. *Hepatology* 1997, 26(5): 1250-57.
- Kukan M, Haddad PS. Role of hepatocytes and bile ducts in preservation-reperfusion injury of liver grafts. *Liver Transplant* 2001; 7(5): 381-400.
- Kurokawa T, Kobayashi H, Nonami T, Harada A, Nakao A, Takagi H. Mitochondrial glutathione redox and energy producing function during liver ischemia and reperfusion. *J Surg Res*, 1996; 66:1-5.
- Lange R, Jochen E, Rauen U, de Groot H, Wilhelm F. Determination of hepatocellular enzymes in effluent of human liver grafts for preoperative evaluation of transplant quality. *Transplantation*, 1996; 62(9):1255-59.
- Lemasters JJ, Thurmann RG. Reperfusion injury after liver preservation for transplantation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1997; 37: 327-38.
- Liu P, Fischer MA, Farhood A, Smith CY, Jaeschke H. Beneficial effects of extracellular glutathione against endotoxin-induced liver injury during ischemia and reperfusion. *Circ Shock*, 1994; 43: 64-70.
- Lutterová M, Szatmáry Z, Kukan M, Kuba D, Vajdová K. Marked difference in tumor necrosis factor α expression in warm ischemia and cold ischemia of the rat liver. *Cryobiology*, 2000; 41:301-14.
- Madrey WC, Schiff ER, Sorrel MF. *Transplantation of the Liver*. Editora Lippincot Williams & Wilkins – Philadelphia, 2001; 3a edição.
- Mamprím ME, Guibert EE, Rodriguez JV. Glutathione content during the rinsing and rewarming process of rat hepatocytes preserved in University of Wisconsin solution. *Cryobiology*, 2000; 40:270-76
- Markin RS, Wisecarver JL, Radio S, Stratta RJ, Langnas AN, Hirst K, Shaw BW. Frozen section evaluation of donor livers before transplantation. *Transplantation*, 1993; 56(6): 1403-09.
- Marubayashi S, Takenaka M, Dohl K, Ezaki H, Kawasaki T. Adenine nucleotide metabolism during hepatic ischemia and subsequent blood reflow periods and its relations to organ viability. *Transplantation*, 1980; 30:294-96.

- Meister A, Larsson A. Glutathione synthetase deficiency and other disorders of the gamma-glutamyl cycle. The metabolic and molecular bases of inherited diseases. New York: McGraw-Hill; 1995:1461-1477.
- Meng W, Sakon M, Umeshita K, Okuyama M, Shiozaki K, Nagano H, Dohno K, Nakamori S, Monden M. Prednisolone suppress ischemia-reperfusion injury of the rat liver by reducing cytokine production and calpain activation. *J Hepatol*, 2001; 34: 278-83.
- Menger MD, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow". *Am J Physiol*, 1992a; 263:1892-900.
- Menger MD, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am J Physiol*, 1992b; 263:1901-06.
- Miyoshi H, Umeshita K, Sakon M, Imajoh-Omi S, Fujitani K, Gotoh M. Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tert-butyl induced hydroperoxide-induced rat hepatocyte injury. *Gastroenterology* 1996; 110: 1897-904.
- Monks TJ, Lau SS. Glutathione conjugation as a mechanism for the transport of reactive metabolites. *Adv Pharmacol* 1994; 27:183-205.
- Moore FD, Smith LL, Burnap TK et al. One-stage homotransplantation of the liver following total hepatectomy in dogs. *Transplant Bull* 6: 103-07, 1959.
- Mulder GJ, Ouwkerk-Mahadevan S. Modulation of glutathione conjugation in vivo: how to decrease glutathione conjugation in vivo or in intact cellular systems in vitro. *Chem-Biol Interact*, 1997; 105: 17-34.
- Nardi EA, Devito R, Tiburzi F, Ceccani M. Il glutathione ridotto ad alte dosi nella terapia dell'epatopatia alcolica. *La Clin Terapeu*, 1991; 136:47-51.
- Nardo B, Caraceni P, Pasini P, Domenicali M, Catena F, Cavallari G, Santoni B, Maiolini E, Grattagliano I, Vendemiale G, Trevisani F, Roda A, Bernardi M, Cavallari A. Increased generation of reactive oxygen species in isolated rat fatty liver during postischemic reoxygenation. *Transplantation*, 2001; 71(12): 1816-20.
- Naskano H, Boudjema K, Alexandre E, Imbs P, Chenard MP, Wolf P, Cinqualbre J, Jaeck D. Protective effects of N-acetylcysteine on hypothermic ischemia-reperfusion of rat liver. *Hepatology*, 1995; 22(5): 539-45.
- Nieminem A-L, Saylor AK, Hermann B, et al. ATP depletion rather than mitochondrial depolarization mediates hepatocyte killing after metabolic inhibition. *Am J Physiol*, 1994; 267: C67-74.
- Nishizawa H, Egawa H, Inomata Y, Uemoto S, Asonuma K, Kiuchi T, Yamaoka Y, Tanaka K. Efficiency of pentoxifylline in donor pretreatment in rat liver transplantation. *J Surg Res*, 1997; 72:170-76.
- Ortolani O, Gratino F, Leone D, Russo F, Tufano R. L'utilita della prevenzione Del danno ossiradicalico nel paziente critico attraverso la somministrazione parenterale de glutathione ridotto in alte dosi. *Boll Soc It Biol Sper*, 1992; 4(LXVIII): 239-44.

Okabe H, Irita K, Taniguchi S, Kurosawa K, Tagawa K, Yoshtake J, Takahashi S. Endotoxin causes early changes in glutathione concentrations in rabbit plasma and liver. *J Surg Res*, 1994; 57: 416-19.

Okamoto S, Corso C, Kondo T, Leiderer R, Rascher W, Yamamoto Y, Yamaoka Y, Messmer K. Changes in hepatic microcirculation and histomorphology in brain-dead organ donors: an experimental study in rats. *Eur J Surg*, 1999; 165: 759-66.

Okuda M, Lee HC, Chance B, Kumar C. Glutathione and ischemia-reperfusion injury in the perfused rat liver. *Free Rad Biol Med*, 1992; 12: 271-79.

Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechtle SJ et al (1993) Malfunction of the liver after transplantation: An analysis of potential risk factors. *Trans Proc*, 1993; 25 (1): 1659-61.

Pichlmayr R, Ringe B, Gubernatis G, Hauss J, Bunzendahl H. Transplantation of a donor liver to 2 recipients (splitting transplantation)-a new method in the further development of segmental liver transplantation. *Langenbecks Arch Chir*. 1988;373(2):127-30.

Pirenne J, Gunson B, Khaleef H, Afford S, McMaster P, Adams D. Influence of ischemia-reperfusion injury on rejection after liver transplantation. *Transplant Proc*, 1997; 29: 366-67.

Pistelli A, Di Simplicio P, Di Bello, MG, Raspanti S, Gambassi F, Botti LC, Peruzzi S, Smoriesi C, Zorn AM, Mannalioni PF. L'apporto di glutatone nella detossificazione dell'alcolismo. *Clin Ter*, 1992; 140: 461-71.

Post S, Palma P, Gonzales AP, Rentsch M, Menger MD. Microcirculatory events after reperfusion in liver transplantation. *Progress in Applied Microcirculation*. Ch. 21. *Microcirculation in Organ Transplantation*, 1995.

Post S, Palma P, Gonzalez AP, Rentsch M, Menger MD. Timing of arterialization in liver transplantation. *Ann Surg*, 1994; 220:691-98.

Post S, Palma S, Rentsch M, Gonzalez AP, Menger MD. Differential impact of Carolina rinse and University of Wisconsin solutions on microcirculation, leukocyte adhesion, Kupffer cell activity, and biliary excretion after liver. *Hepatology*, 1993;18(6): 1490-7.

Post S, Palma P, Gonzales AP, Rentsch M, Menger MD. Assessment of hepatic phagocytic activity by in vivo microscopy after liver transplantation in the rat. *Hepatology* 1992; 16:803-09.

Raia S, Nery JR, Mies S. Liver transplantation from living donors. *Lancet*, 1989; 26; 2(8661): 497.

Rashid A, Wu TC, Huang CC, Chen CH, Lin HZ, Yan SQ. Mitochondrial proteins that regulate apoptosis and necrosis are induced in mouse fatty liver. *Hepatology*, 1999; 29:1131-38.

- Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG, deGroot S. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J* 1999; 136:155-68.
- Reding R, Wallemacq P, de Ville de Goyet J et al. The unreliability of the lidocaine/monoethylglycinexylidide test for assessment of liver donors. *Transplantation*, 1993; 56(2): 323-26.
- Registro Brasileiro de Transplantes. Ano VIII (2)- Abril/Junho 2002. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos- ABTO.
- Regueira FM, Hernández JL, Sola I, Cienfuegos JA, Pardo F, Diez-Caballero A, Sierra E, Nwose E, Espí A, Baixaúli J, Rotellar F. Ischemic damage prevention by N-acetylcysteine treatment of the donor before orthotopic liver transplantation. *Transp Proc*, 1997; 29(8):3347-3349.
- Rentsch M, Post S, Palma P, Lang G, Menger D, Messmer K. Anti ICAM-1 blockade reduces postsinusoidal WBC adherence following cold ischemia and reperfusion, but does not improve early graft function in rat liver transplantation. *J Hepatol*, 2000; 32: 821-28.
- Rodríguez JV, Mamprín ME, Guibert EE. Glutathione Content during the rinsing and rewarming process of rat hepatocytes preserved in University of Wisconsin solution. *Cryobiology*, 2000; 40:270-76.
- Rodríguez JV, Mamprín M, Mediavilla M, Guibert E. Glutathione (GSH) movements during cold preservation of rat hepatocytes. *Cryobiology*, 1998; 36: 236-44.
- Rosen HR, Martin P, Goss J, Donovan J, Melinek J, Rudich S, Imagawa DK, Kinkhabwala M, Seu P, Busuttil RW, Shackelton CR. Significance of early aminotransferase elevation after liver transplantation. *Transplantation*, 1998; 65(1):68-72.
- Rull R, Garcia-Valdecasas JC, Mombian D, Grande L, Vidal O, Fuster J, González FX. Evaluation of potential liver donors: expanding donor criteria? *Transpl Proc*, 2002; 34: 229-30.
- Sanchez-Urdazpal L, Gores JG, Lemasters JJ, et al. Carolina rinse solution decreases liver injury during clinical liver transplantation. *Transplant Proc*, 1993; 25:1574-75.
- Sanchez -Urdazpal L, Gores GJ, Ward EM. Ischemic-type biliary complications after orthotopic liver transplantation. *Hepatology*, 1992; 16(1): 49-53.
- Sankary, HN, Chong A, Foster P, Brown E, Shen J, Kimura R, Rayudu G, Williams J. Inactivation of Kupffer cells after prolonged donor fasting improves viability of transplanted hepatic allografts. *Hepatology*, 1995; 22; 4: 1236-42.
- Sankary HN, Yin DP, Chong A, Lian-Li M, Blinder L, Shen JK, Foster P, Liu LP, Li C, Williams JW. The portosystemic shunt protects liver against ischemic reperfusion injury. *Transplantation*, 1999; 68(7): 958-63.

- Sasaki H, Matsumo T, Ishizawa T, Ishine N, Samadori H Yagi T. Activation of apoptosis during early phase of reperfusion after liver transplantation. *Transplant Proc*, 1997; 29: 406-7.
- Sasaki K, Johkura K, Ogiwara N, Liang Y, Cui L, Teng R, Okouchi Y, Anasuma K, Ishida O, Maruyama K. Three-dimensional morphological analysis of antigen-antibody reaction in hepatic sinusoids preserved in hypothermic UW solution. *Cryobiology*, 2001; 42: 145-50.
- Sawaya DE, Brown M, Minardi A, Bilton B, Burney D, Granger N, McDonald JC, Zibari GB. The role of ischemic preconditioning in the recruitment of rolling and adherent leucocytes in hepatic venules after ischemia/reperfusion. *J Surg Res*, 1999; 85:163-70.
- Schauer R, Bilzer M, Kalmuk S, Gerbes AL, Leiderer R, Schildberg FW, Messmer K. Microcirculatory failure after rat liver transplantation is related to Kupffer cell-derived oxidant stress but not involved in early graft dysfunction. *Transplantation*, 2001; 72(10): 1692-99.
- Serracino-Inglot F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg*, 2001; 181:160-66.
- Shan X, Tak YA, Jones DP. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmac. Ther*, 1990; 47:61-71.
- Smith CM, Davies BD, MacBride MA. Liver transplantation in the United States: a report from the UNOS Liver Transplant Registry. *Clin Transpl* 1999;:23-34.
- Starzl TE, Kaupp HAJ, Brock DR, Lazarus RE, Johnson RV(1960). Reconstructive problems in canine liver homotransplantations with special reference to the postoperative role of hepatic venous flow. *Surg Gynecol & Obstet*, 1960; 111:733.
- Starzl TE, Marchioro TL, Von Kaulla KN, et al. Homotransplantation of the liver in humans. *Surg Gynecol & Obstet*, 1963;117:659-76.
- Stein H, Oosthuizen M, Hinder MJ, Lamprechts H. Oxygen-free radical and glutathione in hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res*, 1992; 50: 398-404.
- Stein HJ, Oosthuizen MJ, Hinder RA, Lamprechts H. Effect of verapamil on hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am J Surg*; 1993, 165: 96-100.
- Stewart AG, Barker JE, Hickey MJ. Nitric oxide in ischaemia-reperfusion injury. 1st ed. Oxford: Blackwell Science, 1999, 180-95.
- Suzuki S, Toledo-Pereira LH, Rodriguez FJ, Cevaljo D. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia reperfusion injury. *Transplantation*, 1993; 55(6): 1265-72.
- Suzuki H, Robinson MK, et al. Glutathione deficiency accentuates hepatocellular fluid accumulation after ischemia-reperfusion. *J Surg Res*, 1994; 57: 632-639.

Thies JC, Koeppel TA, Lehman T, Schemmer P, Otto G, Post S. Efficacy of N-acetylcysteine as a hepatoprotective agent in liver transplantation: An experimental study. *Trans Proc*, 1997, 29,1326-27.

Tiainen P, Höckerstedt K, Rosenberg PH. Hepatocellular integrity in liver donors and recipients indicated by glutathione transferase alpha. *Transplantation*, 1996; 61(6): 904-08.

Tullius SG, Volk H-D, Neuhaus P. Transplantation of organs from marginal donors. *Transplantation*, 2001; 72(8): 1341-49.

Uedono Y, Takeyama N, Yamagami K, Tanaka T. Lipopolysaccharide-Mediated hepatic glutathione depletion and progressive mitochondrial damage in mice: protective effect of glutathione monoethyl ester. *J Surg Res*, 1997; 70: 49-54.

Upadhyaya GA, Strasberg SM. Glutathione, lactobionate, and histidine: Criptic inhibitors of matrix metalloproteinases contained in university of Wisconsin and histidine/triptophan/ketoglutarate liver preservation solutions. *Hepatology*, 2000; 31(5): 1115-22.

Urata K, Nguyen B, Brault A, Lavoie J, Rocheleau B, Huet P. Decreased survival in rat liver transplantation with extended cold preservation: Role of portal vein clamping time. *Hepatology*, 1998; 28: 366-73.

Van der Hoeven JAB, Lindell S, van Schilfgaarde R, Molema G, Ter Horst, GJ, Southard JH, Ploeg RJ. Donor brain death reduces survival after transplantation in rat livers preserved for 20 hr. *Transplantation*, 2001; 72(10): 1632-36.

Vairetti M, Griffini P, Pietrocola G, Richelmi P, Freitas I. Cold-Induced apoptosis in isolated rat hepatocytes: Protective role of glutathione. *Free Rad Biol Med*, 2001; 31(8): 954-61.

Vendemiale G, Guerrieri F, Grattagliano I, Didonna D, Muolo L, Altomare E. Mitochondrial oxidative phosphorylation and intracellular glutathione compartmentation during rat liver regeneration. *Hepatology*, 1995; 21(5): 1450-54.

Vollmar B, Richter S, Menger MD. Leucocyte stasis in hepatic sinusoids. *Am J Physiol*, 1996; 270:798-803.

Welch CS. A note on transplantation of the whole liver in dogs. *Transplant Bull*, 1955; 2: 54-55.

Will Y, Fischer KA, Horton RA, Kaetzel RS, Brown MK, Hedstrom O, Lieberman MW, Reed D. γ - glutamyltranspeptidase-deficient knockout mice as a model to study the relationship between glutathione status, mitochondrial functions and cellular function. *Hepatology*, 2000; 32(4): 740-49.

Yandza T, Msanika A, Huynh T, Lavoie JC, Champagne J, Lepage G, Chessex P. Glutathion intra-hépatique et stress oxydatif en transplantation du foie chez le cochon. *Ann Chir*, 1997; 51(8): 839-44.

Zahberelski G, Nieminem AL, Al-Ghoul K,. Progression of subcellular changes during chemical hypoxia to cultured rat hepatocytes: a laser scanning confocal microscopic study. *Hepatology*, 1995; 21:1361-72.

ANEXO

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAÇÃO EM ESTUDO CIENTÍFICO

Prezado Senhor(a),

Este termo tem por objetivo informar que o Senhor(a) foi selecionado para a participação em um estudo científico que irá permitir ao Grupo de Transplante Hepático da Santa Casa de Misericórdia obter maiores informações sobre a qualidade dos fígados que estão sendo transplantados neste serviço, visando futuras intervenções para melhorar as chances de sucesso no transplante.

Para tanto, serão necessárias a realização de duas biópsias, que consistem na retirada de pequenos fragmentos do fígado que o Senhor(a) irá receber durante a sua cirurgia, para análise no microscópio. Este procedimento é rotineiramente realizado pela equipe de transplante, possui pequenos riscos, particularmente de sangramentos, mas que já se mostraram seguros em outras oportunidades. Para que o Senhor(a) tenha uma idéia do que se trata, em torno de 60 a 70% dos pacientes têm que realizar este procedimento em algum momento depois do transplante, a fim de diagnosticar rejeição, por exemplo.

De qualquer maneira, a sua participação é voluntária, ou seja, o Senhor(a) não é obrigado a participar deste estudo científico e, caso decidir por não fazê-lo, não haverá nenhuma mudança no plano de tratamento que o Senhor(a) irá receber.

Declaro que compreendi todas as informações acima expostas, estou ciente dos riscos associados e estou disposto(a), sem nenhum tipo de coação ou constrangimento, a participar deste estudo científico. E assim, assino o presente termo, em duas vias de igual teor, na presença de duas testemunhas.

Porto Alegre,

___/___/_____.

1. _____

Paciente (nome legível) _____

2. _____

Responsável ou Familiar (nome legível) _____

P/ Grupo de Transplante Hepático (nome legível/ assinatura)

3. _____

Testemunha

4. _____

Testemunha



Rua Ramiro Barcelos, 2705 - 2º andar
E-mail: grafica@ufrgs.br