

José Humberto Lacerda Rodrigues

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Mestrado, apresentada a Comissão de Pós-Graduação em Cirurgia da FCM/UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Cirurgia do médico:
JOSÉ HUMBERTO LACERDA RODRIGUES.
Campinas, 30 de julho de 1997.

Prof.Dr. GUILHERME BERENHAUSER LEITE
ORIENTADOR

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES NUCLEARES E
CITOPLASMÁTICAS NO HEPATÓCITO DE FÍGADO
OBTIDO PARA O TRANSPLANTE APÓS
PARALISAÇÃO DOS BATIMENTOS CARDÍACOS
DO DOADOR.**

Campinas, 1997

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
UNICAMP**

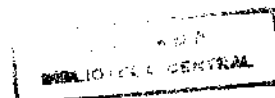
José Humberto Lacerda Rodrigues

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES NUCLEARES E
CITOPLASMÁTICAS NO HEPATÓCITO DE FÍGADO
OBTIDO PARA O TRANSPLANTE APÓS PARALISAÇÃO
DOS BATIMENTOS CARDÍACOS DO DOADOR.**

*Dissertação de Mestrado apresentada
ao curso de Pós-Graduação em Cirurgia, da
Faculdade de Ciências Médicas, da
Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do Título de Mestre em Cirurgia.*

Orientador : Prof. Dr. Guilherme Berenhauser Leite ✧
Co-orientador : Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal ✧

Campinas, 1997.



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
	Unicamp
	R618a
V.	EX.
TÍTULO	BC/ 3168+
PRIMEIRO	28/1/97
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	18/09/97
N.º CPD	

CM-00101236-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

R618a Rodrigues, José Humberto Lacerda
 Análise de alterações nucleares e citoplasmáticas no hepatócito de
 fígado obtido para o transplante após paralisação dos batimentos
 cardíacos do doador / José Humberto Laerda Rodrigues. Campinas,
 SP : [s.n.], 1997.

 Orientadores : Guilherme Berenhauser Leite e Benedicto de Campos
 Vidal
 Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Ciências Médicas.

 1. Fígado - transplante. 2. Doadores de órgãos. I. Guilherme
 Berenhauser Leite. II. Benedicto de Campos Vidal. III. Universidade
 Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Guilherme Benhamer Leite

MEMBROS:

1. *Prof. Dr. Carlos Fischer Leichter*

2. *Prof. Dr. Luiz Sergio Leonardi*

[Handwritten signatures]

Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

DATA: 30/07/97

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. GUILHERME BERENHAUSER LEITE, pelo estímulo e apoio como orientador, pela competência profissional e exemplo de conduta.

Ao Prof. Dr. BENEDICTO DE CAMPOS VIDAL, pela fé na ciência e pelo esforço incansável dos grandes mestres.

Ao Prof. Dr. LUIS SÉRGIO LEONARDI, pela honra do convívio e por me proporcionar a oportunidade de evoluir cientificamente.

Ao Prof. Dr. PLATÃO FISCHER-PÜHLER, pela visão e sensibilidade dos que caminham na vanguarda, pela dedicação à vida acadêmica e pelo privilégio de sua amizade.

Ao Prof. Dr. NELSON ANDREOLLO, pelo incentivo, pelos ensinamentos e pelo exemplo de humanidade.

Ao Prof. Dr. JOÃO JOSÉ FAGUNDES, pela acolhida, pelos aconselhamentos de amigo e por compartilhar seus conhecimentos.

À Srta. GRACINDA DE LOURDES JORGE, bióloga do Laboratório de Transplante Hepático do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, pelo auxílio incondicional, e sobretudo, pela amizade.

Ao Sr. MÁRIO BIANCHI, técnico do Laboratório de Morfometria, Análise de Imagens e Biologia dos Colágenos I e II, do Departamento de Biologia Celular, pela paciência e ajuda imprescindível.

À Srta. MARISA MONTEIRO MANTOVANI, pelo auxílio e tratamento cordial.

À Prof. RAQUEL MARIA DIAS, pela orientação em língua portuguesa, e aos demais funcionários da Seção de Apoio Didático, pela colaboração.

Ao grupo da TÉCNICA CIRÚRGICA E CIRURGIA EXPERIMENTAL DA FACULDADE FEDERAL DE MEDICINA DO TRIÂNGULO MINEIRO, do qual faço parte, pela compreensão e apoio.

Aos demais funcionários do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental e do Laboratório de Biologia Celular, pelo afetuoso convívio.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Transplante Hepático da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo, no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, e no Laboratório de Morfometria, Análise de Imagens e Biologia dos Colágenos I e II, do Departamento de Biologia Celular.

CAPES 04724

FAEP 0236/91

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

SUMÁRIO

RESUMO	i
1 - INTRODUÇÃO	01
2 - OBJETIVO	05
3 - MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 - O animal	08
3.2 - Procedimento cirúrgico	08
3.3 - Citoquímica para análise de imagens	14
3.4 - Análise do material obtido	
3.4.1 - Análise por microscopia óptica	17
3.4.2 - Análise morfométrica manual de imagens	17
3.4.3 - Análise morfométrica digital de imagens	19
4 - RESULTADOS	
4.1 - Análise dos animais estudados	22
4.2 - Análise do material obtido	
4.2.1 - Análise da gordura citoplasmática	23
4.2.2 - Análise morfométrica manual dos núcleos	25
4.2.3 - Análise morfométrica digital da gordura citoplasmática	27
4.2.4 - Análise morfométrica digital dos núcleos	30
5 - DISCUSSÃO	39
6 - CONCLUSÃO	51
7 - SUMMARY	53
8 -REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Estatística descritiva dos pesos, em gramas, dos animais utilizados no experimento.	22
QUADRO 2 - Estatística descritiva dos pesos, em gramas, dos figados utilizados no experimento, após a infusão da solução de preservação.	22
QUADRO 3 - Estatística descritiva dos valores de Área obtidos por morfometria manual, em pixel ² , dos núcleos dos hepatócitos.	25
QUADRO 4 - Estatística descritiva dos valores de Perímetro obtidos por morfometria manual, em pixel, dos núcleos dos hepatócitos.	25
QUADRO 5 - Estatística descritiva dos valores de Fator Forma obtidos por morfometria manual, dos núcleos dos hepatócitos.	26
QUADRO 6 - Valores, em pixel ² , de 100 μm^2 , obtidos pelo Kontron-Mop-Videoplan®	26
QUADRO 7 - Estatística descritiva dos valores de Área obtidos por morfometria digital, em μm^2 , da gordura citoplasmática dos hepatócitos.	27
QUADRO 8 - Estatística descritiva dos valores de Absorbância Média obtidos por morfometria digital, em níveis de cinza (Gav), das áreas contendo gordura nos citoplasmas dos hepatócitos.	27

QUADRO 9 - Histograma de frequência das Áreas, em μm^2 , de 200 núcleos de hepatócitos de figados do grupo Normal [GI (1)].	31
QUADRO 10 - Histograma de frequência das Áreas, em μm^2 , de 200 núcleos de hepatócitos de figados do grupo Normal [GI (2)].	31
QUADRO 11 - Histograma de frequência das Áreas, em μm^2 , de 200 núcleos de hepatócitos de figados do grupo Normal [GI (3)].	32
QUADRO 12 - Histograma de frequência das Áreas, em μm^2 , de 200 núcleos de hepatócitos de figados do grupo Parada [GII (1)].	32
QUADRO 13 - Histograma de frequência das Áreas, em μm^2 , de 200 núcleos de hepatócitos de figados do grupo Parada [GII (2)].	33
QUADRO 14 - Estatística descritiva dos valores de Área obtidos por morfometria digital, em μm^2 , dos núcleos dos hepatócitos.	34
QUADRO 15 - Análise de variância, baseada nos desvios padrões, dos valores de Área em μm^2 , obtidos por morfometria digital, dos núcleos dos hepatócitos.	34
QUADRO 16 - Estatística descritiva dos valores de Perímetro obtidos por morfometria digital, em μm , dos núcleos dos hepatócitos.	35
QUADRO 17 - Análise de variância, baseada nos desvios padrões, dos valores de Perímetro em μm , obtidos por morfometria digital, dos núcleos dos hepatócitos.	35

QUADRO 18 - Estatística descritiva dos valores de Absorbância Média, em níveis de cinza (Gav), obtidos por morfometria digital, dos núcleos dos hepatócitos.	36
QUADRO 19 - Análise de variância, baseada nos desvios padrões, dos vales de Absorbância Média, em níveis de cinza (Gav), obtidos por morfometria digital, dos núcleos dos hepatócitos.	36
QUADRO 20 - Estatística descritiva dos valores de Absorbância Total, obtidos por morfometria digital, dos núcleos dos hepatócitos.	37
QUADRO 21 - Análise de variância, baseada nos desvios padrões, dos valores de Absorbância Total, obtidos por morfometria digital, dos núcleos dos hepatócitos.	37
QUADRO 22 - Estatística descritiva dos valores de Fator Forma, obtidos por morfometria digital, dos núcleos dos hepatócitos.	38
QUADRO 23 - Análise de variância, baseada nos desvios padrões, dos valores de Fator Forma, obtidos por morfometria digital, dos núcleos dos hepatócitos.	38

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Administração de 50 U.I. de heparina, em veia cava inferior.	09
FIGURA 2 - Cateterização da veia porta.	09
FIGURA 3 - Perfusão do fígado	10
FIGURA 4 - Pesagem do fígado	11
FIGURA 5 - Permanência, do fígado, em solução de conservação por quatro horas	12
FIGURA 6 - Administração de 2 ml de KCl 19,1% em câmara cardíaca.	13
FIGURA 7 - Realização de decalques (“imprints”).	15
FIGURA 8 - Fixação em formol-cálcio.	16
FIGURA 09 - Lâmina de tecido hepático, obtido após perfusão padronizada e quatro horas de isquemia hipotérmica. Nota-se o espalhamento e a pouca quantidade de áreas enegrecidas contendo gordura (Sudan Black B) (x 250).	23
FIGURA 10 - Lâmina de tecido hepático, obtido após 30 minutos de isquemia normotérmica, perfusão padronizada e quatro horas de isquemia hipotérmica. As áreas enegrecidas, contendo gordura, apresentam-se em maior quantidade e mantêm-se acumuladas predominantemente em região centrolobular. Nota-se, ainda, a presença de hemácias em espaço vascular (Sudan Black B) (x 250).	24

- FIGURA 11 - Fotografia do monitor de vídeo, com áreas contendo gordura, demarcadas com pseudocores obtidas por tratamento de imagem, para análise morfométrica digital, em figados do G I. 28
- FIGURA 12 - Fotografia do monitor de vídeo, com áreas contendo gordura, demarcadas com pseudocores obtidas por tratamento de imagem, para análise morfométrica digital, em figados do G II. 29
- FIGURA 13 - Fotografia do monitor de vídeo, com núcleo demarcado com pseudocores obtidas por tratamento de imagem, para análise morfométrica digital. 30

RESUMO

O transplante, de fígado obtido após paralisação dos batimentos cardíacos do doador, é uma alternativa para a elevação do número de doadores.

Visando analisar o comportamento do órgão obtido nessas condições, este estudo teve por objetivo detectar variações da gordura citoplasmática e alterações do núcleo de hepatócitos de fígados submetidos a períodos distintos de isquemia normotérmica e idênticos de isquemia hipotérmica.

Foram utilizados 25 ratos da raça Wistar, de mesma idade e linhagem, divididos em dois grupos compostos por 12 (grupo I) e 13 (grupo II) animais, cujos pesos eram semelhantes ($p=0,0030$).

Os do grupo I foram submetidos a laparotomia e a procedimento padrão para obtenção de enxerto para transplante. O órgão foi retirado e mantido, por quatro horas, em solução de Euro-Collins a 4°C.

O mesmo procedimento foi realizado no grupo II, trinta minutos após a paralisação dos batimentos cardíacos.

A gordura citoplasmática foi analisada visualmente em cortes de fragmentos hepáticos, corados com solução de Sudan Black B, onde notou-se um maior acúmulo, no grupo II, predominantemente em região centrolobular.

Os núcleos foram avaliados por morfometria manual com equipamento Kontron-Mop-Videoplan ® aferindo-se Área, Perímetro e Fator Forma, em decalques (“imprints”) levados à reação de Feulgen. Constatou-se que os núcleos do grupo II apresentavam Área e Perímetro nucleares maiores ($p=0,0001$ e $p=0,0001$). Os valores de Fator Forma foram semelhantes ($p=0,1780$) e próximos da unidade (1), próprios de estruturas com forma esférica.

Visando substanciar matematicamente os dados obtidos visualmente sobre a gordura citoplasmática e confirmar os valores da medição manual dos núcleos dos hepatócitos, realizou-se análise morfométrica digital em algumas amostras ao acaso, com equipamento Global Lab Image ® medindo-se Área, Perímetro, Fator Forma e Absorbâncias Média (indicador de concentração) e Total (Absorbância Média x Área).

Os parâmetros avaliados sobre a gordura foram Área e Absorbância Média. A análise digital confirmou uma maior presença e concentração de gordura nos citoplasmas de hepatócitos do grupo II. A heterogeneidade das áreas dificulta uma aferição mais apurada, demonstrando que o método necessita de aperfeiçoamentos.

Quanto ao núcleo, a aferição digital de Área, Perímetro e Fator Forma confirmou os dados obtidos por morfometria manual. Os valores de Absorbância Média foram menores no grupo II e os de Absorbância Total considerados semelhantes entre os dois grupos, sugerindo não haver alteração no conteúdo nuclear.

Os resultados deste trabalho indicam que o hepatócito, de figados obtidos após 30 minutos de isquemia normotérmica e mantidos em solução de preservação a 4°C por quatro horas, contém uma quantidade superior de gordura em seu citoplasma, apresentando área e perímetro nuclear maiores, quando comparado ao de figados mantidos em solução de preservação a 4°C por quatro horas.

Os núcleos dos hepatócitos de ambos os grupos mantiveram a forma esférica.

1 . INTRODUÇÃO

O transplante de fígado é, atualmente, a única alternativa terapêutica para pacientes portadores de doenças hepáticas irreversíveis, crônicas ou agudas fulminantes

De 1963, ano da realização do primeiro transplante de fígado em humanos (STARZL, 1963), até os dias atuais, a evolução tem sido notável

Os grandes avanços obtidos na década de oitenta, como uma melhor compreensão dos eventos envolvidos na rejeição de órgãos; a introdução de novos agentes imunossuppressores, aliados à melhora da técnica de preservação do fígado; aperfeiçoamentos no ato operatório; progressos no campo da anestesia e no tratamento intensivo pós-operatório, elevaram a sobrevivência de um ano dos pacientes transplantados, de 30% para 60% a 90% (ASCHER, 1989; RAPAPORT & ANAISE, 1993) gerando um aumento na demanda por transplantes.

Paradoxalmente a este progresso exponencial, a baixa oferta de órgãos é um fato, chegando a ser reconhecida como a maior barreira à aplicação prática e desenvolvimento do transplante de fígado (MATSUNO *et al.*, 1993; RAPAPORT & ANAISE, 1993).

A reduzida quantidade de órgãos oferecidos para transplantes é um problema mundial. O número de mortes de pacientes que esperam pelo transplante de fígado pode chegar a um terço dos adultos e, aproximadamente, à metade das crianças com anomalias hepatobiliares congênitas na Europa e nos Estados Unidos (CAPLAN, 1992).

No Brasil, apesar dos dados sobre transplantes serem reduzidos, acredita-se que a falta de órgãos também é um fator limitante (COELHO *et al.*, 1994).

Fatores legais, a conceituação de morte cerebral em conflito com questões filosóficas e culturais da família dos doadores (ANAISE *et al.*, 1989; MORPUGO *et al.*, 1993b) e até a falta de empenho da classe médica em identificá-los, solicitando, após a morte encefálica, a doação, fazem parte das causas do pequeno número de órgãos doados (TOLLE *et al.*, 1987; WALLER *et al.*, 1993).

Como uma decorrência da necessidade crescente de órgãos, esforços têm sido envidados no sentido de aumentar o número de potenciais doadores. Critérios extremamente rígidos de avaliação do doador, para a captação e utilização do fígado têm sido reavaliados, como idade entre dois e 45 anos; provas de função hepática normais; hematócrito acima de 30%; período curto de hipotensão; ausência de hipoxia, de parada cardíaca, de infecção, de trauma ou de isquemia hepáticos; doses de substâncias inotrópicas menores que 10 µg/Kg/min; ausência de antecedentes indicativos de lesão hepatobiliar (THIEL *et al.*, 1984), de antecedentes de alcoolismo, de obesidade e de esteatose hepática; mais de três dias de hospitalização e fígado com aspecto visual ruim (BUSUTTIL *et al.*, 1994).

Fígados de doadores que não se encaixavam nestes critérios, denominados “doadores marginais”, começaram a ser utilizados (VLIET *et al.*, 1980; ABOUNA *et al.*, 1983; ALEXANDER *et al.*, 1992; KRON *et al.*, 1993), sendo demonstrados alguns bons resultados.

O uso de órgãos obtidos após a parada dos batimentos cardíacos do doador tem sido relatado, com melhora expressiva dos resultados em transplantes renais (YOKOYAMA *et al.*, 1992; D’ALESSANDRO *et al.*, 1995; CASAVILLA *et al.*, 1995a), chegando a aumentar o número de transplantes de 8,6% a 40% (D’ALESSANDRO *et al.*, 1995; DAEMEN *et al.*, 1996). Protocolos tentando otimizar a obtenção de órgãos estão sendo apresentados (FUJITA *et al.*, 1989; KOZAKI *et al.*, 1991; BOOSTER *et al.*, 1993, GÓMEZ *et al.*, 1993; MATSUNO *et al.*, 1993; VARTY *et al.*, 1994; CASAVILLA *et al.*, 1995b).

No intuito de aumentar o número de órgãos ofertados, transplantes de fígados obtidos de doador em assistolia, isto é, exposto a períodos de isquemia normotérmica, começaram a ser relatados no final da década de 80 (ERICZON *et al.*, 1987; YANAGA *et al.*, 1990). Em comparação ao transplante renal, os resultados ainda são pobres (CASAVILLA *et al.*, 1995a), mostrando a necessidade de conhecimentos mais apurados sobre o fígado obtido nestas condições.

A análise das alterações dos componentes celulares citoplasmáticos e nucleares, de hepatócitos pode ter importância no estudo dos fatores que influiriam no sucesso do transplante de fígados obtidos após paralização dos batimentos cardíacos dos doadores, pois existem evidências de que os danos decorrentes de isquemia normotérmica acometem, preferencialmente os hepatócitos (IKEDA *et al.*, 1992).

Como a célula hepática, em certas condições, responde à agressão com um acúmulo patológico de gordura (esteatose), considera-se oportuno enfatizar a detecção de gordura citoplasmática nas condições experimentais do presente trabalho.

O núcleo atende às necessidades fisiológicas da célula e as alterações do mesmo, que seriam causadas por agressão isquêmica, podem ser constatadas com metodologia específica para este fim. Na presente pesquisa, a hipótese de trabalho é a de que o tamanho celular, mais que o DNA, sofre modificações.

2 . OBJETIVO

A proposta deste trabalho é detectar as variações da gordura citoplasmática e as alterações nucleares nos hepatócitos de fígados obtidos para o transplante após períodos distintos de isquemia normotérmica e períodos idênticos de isquemia hipotérmica.



3 . MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - O animal

Foram utilizados 25 ratos do sexo masculino, raça Wistar, divididos em dois grupos: Grupo I, denominado Normal, composto por 12 animais pesando entre 332 e 404 gramas (peso médio : 377 g) e Grupo II, denominado Parada, formado por 13 animais com pesos entre 318 e 407 gramas (peso médio de 387 g), todos com 100 dias de idade.

Os animais provieram do Biotério da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e foram sempre alimentados com ração própria para a espécie e água *ad libitum*.

A anestesia foi feita com éter sulfúrico e, após a tonsura dos pelos abdominais, realizada a anti-sepsia com álcool iodado a 2%. A via de acesso à cavidade peritoneal fez-se por meio de uma incisão transversa ampla.

3.2 - Procedimento cirúrgico

GRUPO I (G I) :

- Administração, por punção da veia cava inferior, de 50 U.I. (Unidade Internacional) de heparina sódica (Fig. 1).

- Dissecção da veia porta e introdução de um cateter de Teflon 20 G x 32 mm, fixando-o com fio de algodão 000 (Fig. 2).

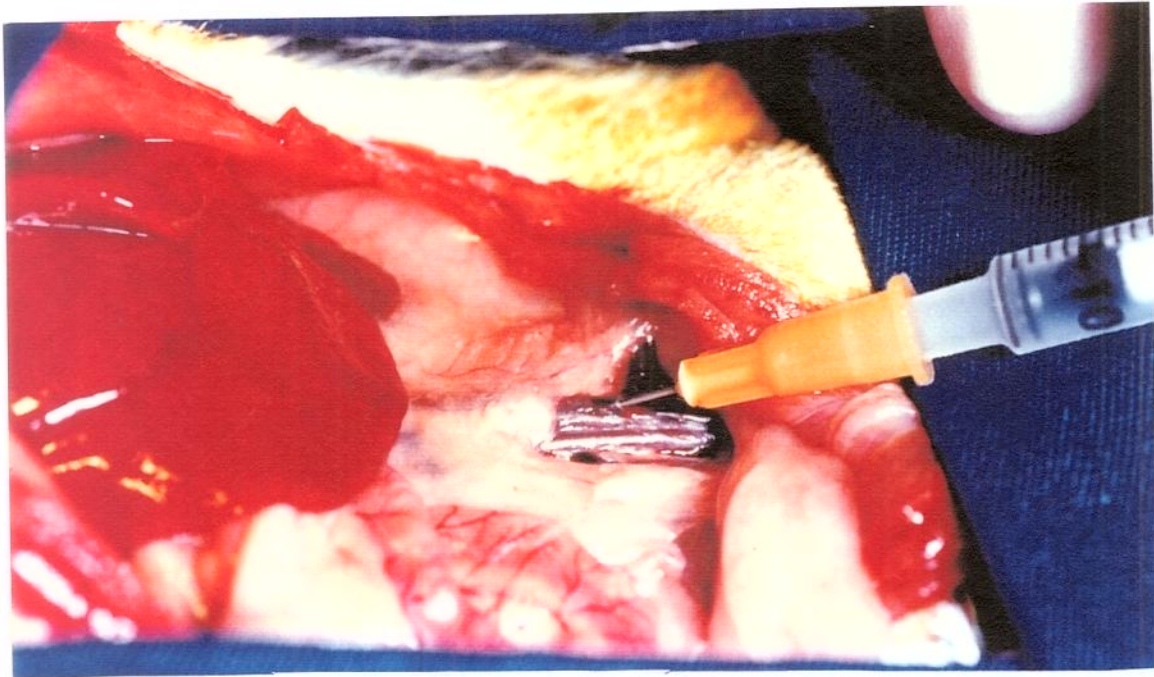


Figura 1 - Administração de 50 U.I. de heparina em veia cava inferior.



Figura 2 - Cateterização da veia porta.

- Perfusão do fígado, pela veia porta, de 5 ml de solução de Euro-Collins a 4° C, no intervalo de um minuto, após secção da veia cava inferior e aorta em suas porções no abdome inferior, no nível da bifurcação desta última (Fig. 3).

- Retirada imediata do fígado num período inferior a um minuto, pesagem (Fig. 4) e imersão do mesmo em solução de conservação (Euro-Collins) a 4° C, na qual foi mantido por quatro horas (Fig. 5).

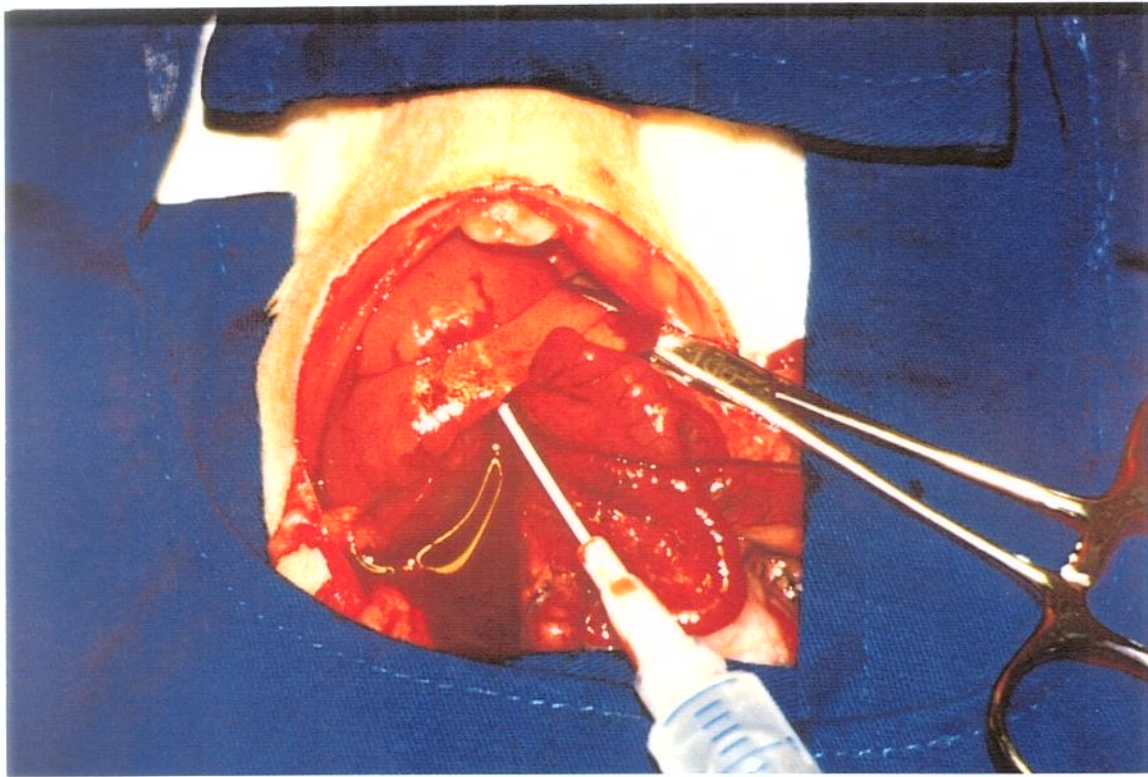


Figura 3 - Perfusão do fígado.

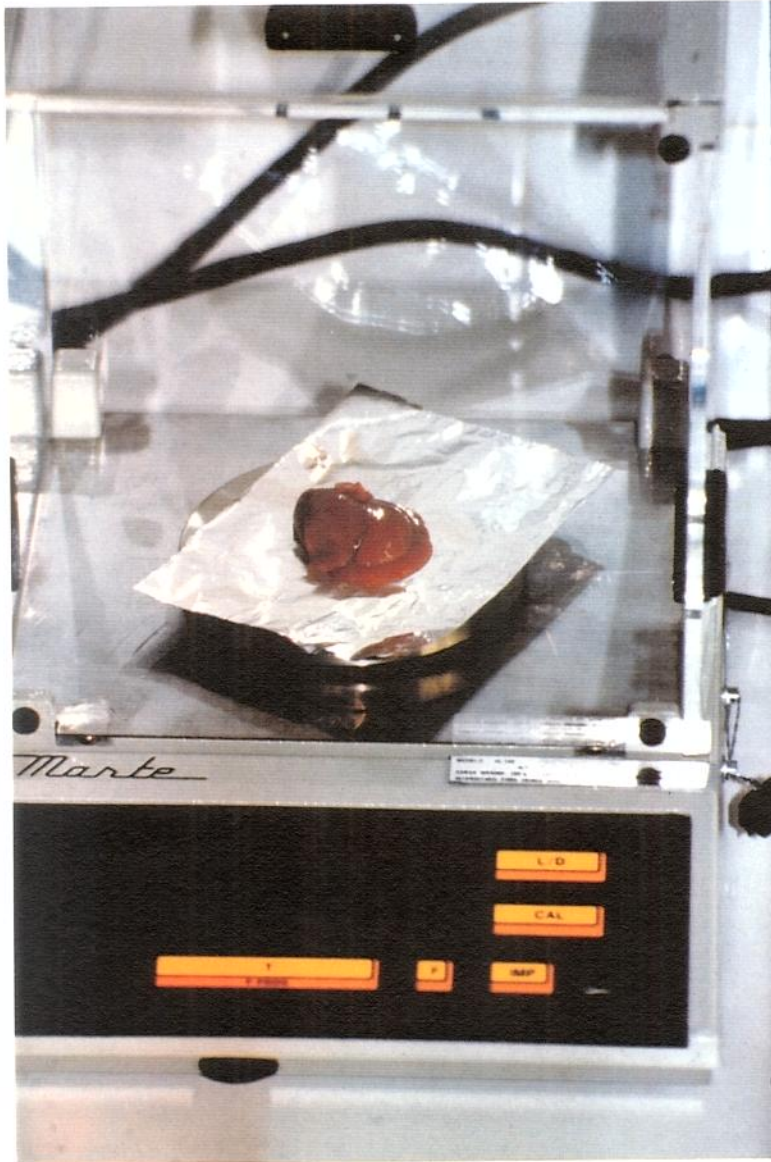


Figura 4 - Pesagem do fígado.

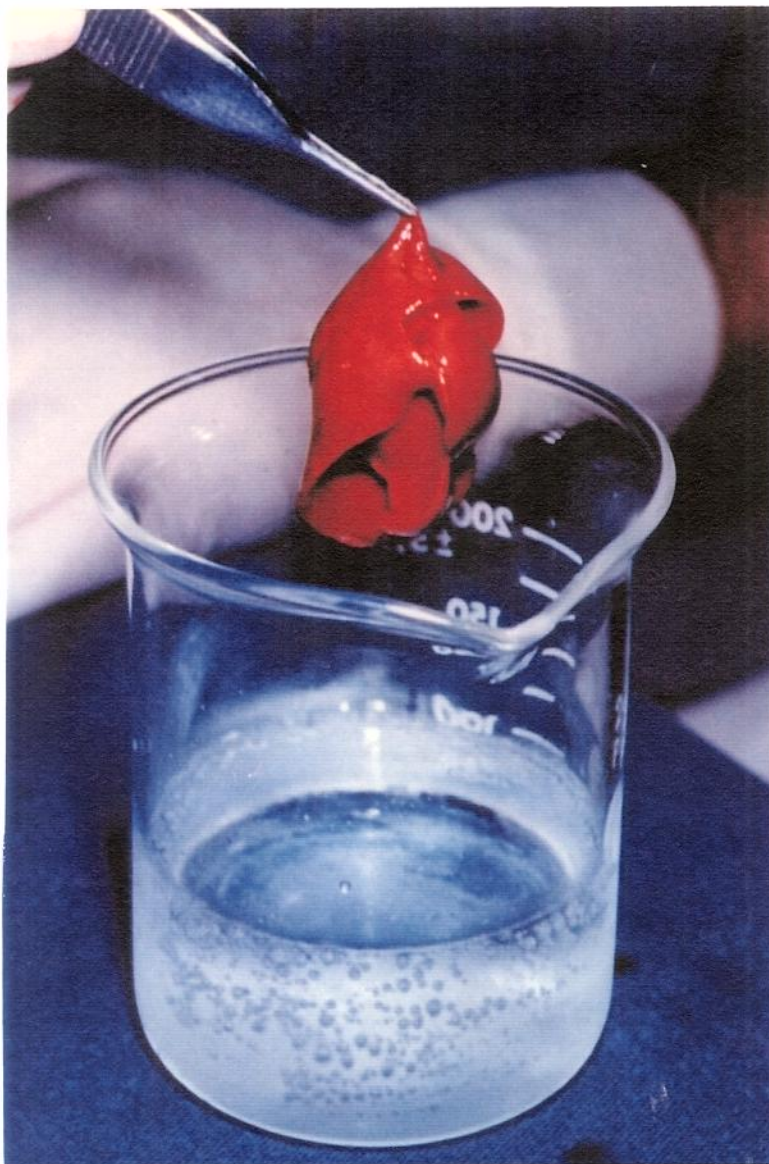


Figura 5 - Permanência, do fígado, em solução de conservação por 4 horas.

GRUPO II (G II) :

- Administração, por punção, de 2 ml de solução de Cloreto de Potássio (KCl) 19,1% em câmara cardíaca (Fig. 6).
- Após 30 minutos da parada dos batimentos cardíacos, realizou-se todo o procedimento descrito para o GI.

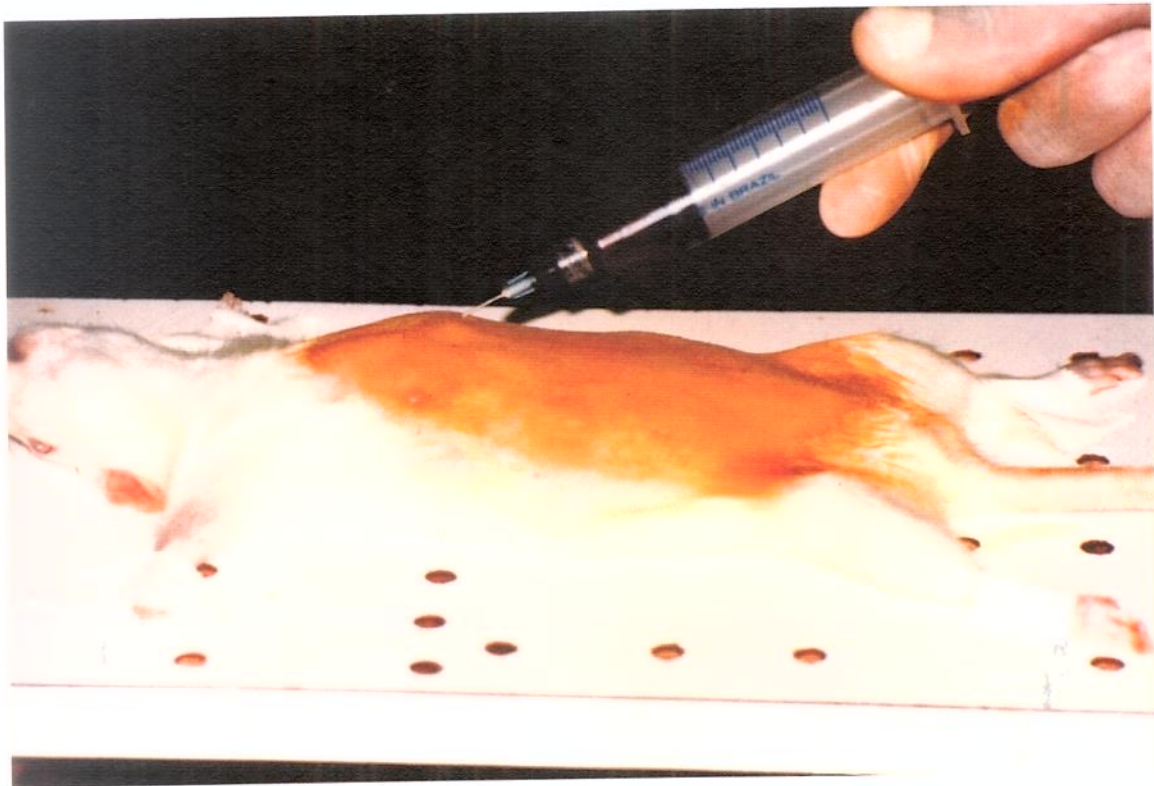


Figura 6 - Administração de 2 ml de KCl 19,1% em câmara cardíaca.

3.3 - Citoquímica para análise de imagens :

Os figados obtidos em razão do procedimento cirúrgico foram analisados após fixação em :

a) Etanol-ácido acético (3:1) e álcool 70% para obtenção de decalques (“imprints”) a serem submetidos à reação de Feulgen (Fig. 7).

Reação de Feulgen :

- 1 - hidrolisar o material em solução de HCl 4N, a 28° C, durante 90 minutos;
- 2 - lavar com HCl 0,1N gelado;
- 3 - tratar com reativo de Schiff, à temperatura ambiente, durante 40 minutos;
- 4 - lavar três vezes em água sulfurosa (metabissulfito de sódio : HCl 1N : água destilada, 1:1:18);
- 5 - lavar em água destilada;
- 6 - desidratar e diafanizar;
- 7 - montar em bálsamo vegetal do Canadá, com índice de refração igual a 1,54.

b) Formol-cálcio, para a obtenção de cortes por congelação e coloração com solução de Sudan Black B (Fig. 8).

Coloração de Sudan Black B :

- 1 - levar os cortes em congelação da água para o etanol 55% por 30 segundos;
- 2 - corar de 15 a 45 minutos numa solução de Sudan Black B em etanol 55%;
- 3 - lavar durante 30 segundos em etanol a 50%;
- 4 - transferir os cortes para a água;
- 5 - montar em geléia glicerinada.

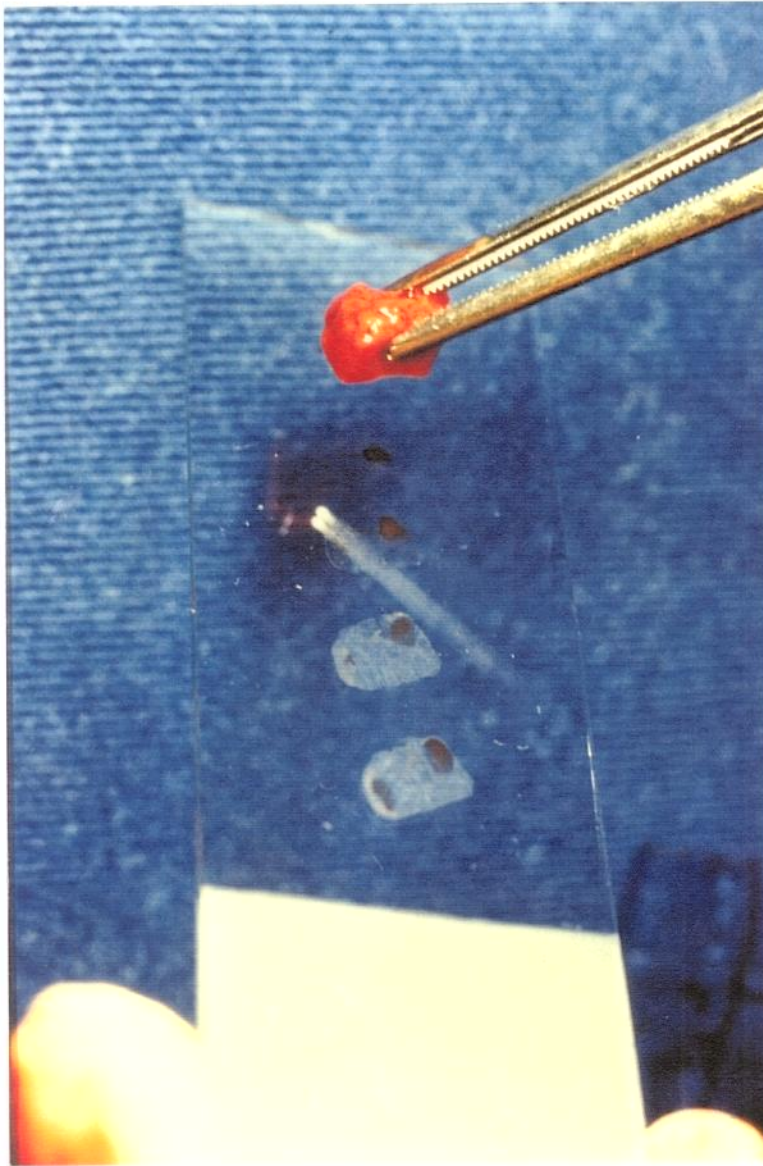


Figura 7 - Realização de decalques (“imprints”).

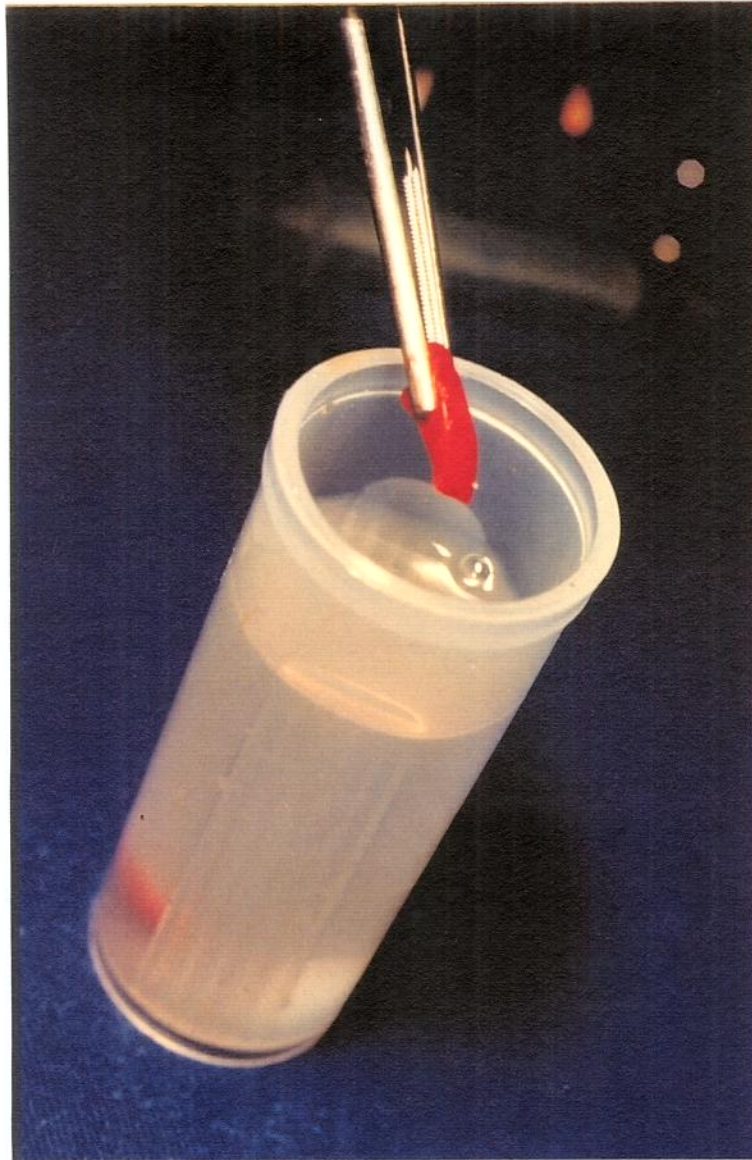


Figura 8 - Fixação em formol-cálcio.

3.4 - Análise do material obtido

3.4.1 - Análise por microscopia óptica

As lâminas coradas com solução de Sudan Black B foram analisadas por microscopia óptica, para o estudo da quantidade e disposição da gordura citoplasmática. Ainda foi avaliado o comportamento desta gordura diante da propriedade da birrefringência.

3.4.2 - Análise morfométrica manual de imagens

A análise morfométrica manual foi realizada com o equipamento Kontron-Mop-Videoplan ® (The Manual Image Analysis System), analisando-se lâminas com decalques de tecido hepático de todos os animais, por meio de campos visuais obtidos ao acaso (quatro por lâmina), sendo avaliados os seguintes descritores, em relação aos núcleos dos hepatócitos corados pela reação de Feulgen :

- Área em pixel²;
- Perímetro em pixel;
- Fator Forma.

O parâmetro Fator Forma expressa a característica geométrica da estrutura estudada. Valores obtidos, próximos da unidade (1), indicam estruturas com forma esférica.

Na análise das variáveis por esse método, utilizou-se do seguinte procedimento :

- escolha, ao acaso, de campo visual em lâminas contendo decalques de tecido hepático e coradas pela reação de Feulgen, em microscópio Carl Zeiss ®, com aumento de 40 vezes;

- fotografia com filme Tmax TM KODAK ® , ASA 100, com abertura da lente ocular por três segundos e filtro de cor verde;

- revelação do filme e projeção sobre superfície branca, com suporte ampliador (FUJI ® Enlarger S99), usando-se lente FUJI ® Photo Optical 1:45:90, a uma altura de 55 cm;

- desenho, sobre papel, dos núcleos projetados, com grafite 0.5 mm ;

- contorno, com cursor, sobre a imagem desenhada, utilizando-se o equipamento Kontron-Mop-Videoplan ® , obtendo-se os descritores citados acima, tendo, como unidade, o valor de um pixel.

Para a transformação dos valores obtidos em pixel² para μm^2 , foi fotografada uma lâmina micrométrica, segundo o padrão previamente descrito, e realizadas 15 medidas de 100 μm^2 em pixel². Com a média destas medidas e cálculos matemáticos simples, chegou-se a uma constante de transformação dos valores em pixel² para μm^2 .

3.4.3 - Análise morfométrica digital de imagens

A análise digital de imagens, realizada para corroborar as informações obtidas visualmente e por análise morfométrica manual, foi feita em Computador Pessoal Pentium® 133, com “software” Global Lab Image® (Image Processing and Analysis Software for Microsoft Windows®).

Com o intuito de se substanciar as informações obtidas visualmente sobre a gordura citoplasmática, substituindo-as por dados matemáticos passíveis de tratamento estatístico, tomaram-se lâminas, ao acaso, contendo tecido hepático e mediu-se, digitalmente, esta gordura. Em campos visuais, também obtidos ao acaso, aferiram-se 500 áreas, em uma lâmina do Grupo I (GI), e 1.498 áreas, em três lâminas do Grupo II (GII 1, GII 2 e GII 3), contendo gordura.

A análise manual dos núcleos foi confirmada pela medição digital dos mesmos, todos obtidos em campos visuais ao acaso. Foram medidos 600, em três lâminas do Grupo I (GI 1, GI 2 e GI 3), e 400, em duas lâminas do Grupo II (GII 1 e GII 2).

Consideraram-se os níveis de cinza entre 0 (mínimo) e 101 (máximo), com objetiva 25 e 1.25 “optovar”, dos quais foram levantados os seguintes descritores:

a) No material tratado com Sudan Black B, as áreas coradas nos citoplasmas dos hepatócitos (gorduras) foram segmentadas e medidas:

- Área Total em μm^2 ;
- Absorbância Média.

b) Entre os decalques corados pela reação de Feulgen, os núcleos dos hepatócitos foram analisados e medidos :

- Área em μm^2 ;
- Perímetro em μm ;
- Absorbância Média;
- Absorbância Total;
- Fator Forma.

Os parâmetros Absorbância Média e Absorbância Total , expressam respectivamente a concentração e a quantidade de DNA.

4 . RESULTADOS

4.1 - Análise dos animais estudados

Os animais estudados, divididos em dois grupos, o primeiro (GI), denominado Normal, e o segundo (GII), denominado Parada, são mostrados no Quadro 1.

Quadro 1 - Estatística descritiva dos pesos, em gramas, dos animais utilizados no experimento.

PESO DO ANIMAL (g)	n	Média	Desvio Padrão	Min	Max	Mediana
GRUPO I	12	359,7	18,2	332	404	357,5
GRUPO II	13	359,3	44,8	257	407	367

A análise estatística, realizada pelo teste de Wilcoxon, mostra que não há diferença significativa entre GI e GII quanto ao peso ($p = 0,5028$) ($p < 0,05$).

O Quadro 2 apresenta o peso, em gramas, dos fígados utilizados no experimento, após perfusão do fígado com solução de preservação (Euro-Collins) e procedimento padrão para obtenção de enxertos.

Quadro 2 - Estatística descritiva dos pesos em gramas dos fígados utilizados no experimento, após a infusão de solução de preservação.

PESO DO FÍGADO (g)	n	Média	Desvio Padrão	Min	Max	Mediana
GRUPO I	12	11,5	1,3	10,2	13,3	11,3
GRUPO II	13	13,3	0,9	11,3	15,6	13,7

A análise estatística, pelo teste de Wilcoxon, mostra que os fígados do GII, após a perfusão com a solução de conservação, apresentam peso significativamente maior ($p = 0,0030$) ($p < 0,05$).

4.2 - Análise do material obtido

4.2.1 - Análise da gordura citoplasmática

Visualmente, através de microscopia óptica das lâminas tratadas com Sudan Black B, notou-se um maior acúmulo de gordura, predominantemente em posição centrolobular, nos citoplasmas dos hepatócitos do grupo denominado Parada. Estas áreas apresentavam-se com aspecto bem mais concentrado, quando comparadas às do grupo Normal (Fig. 09). Observou-se, ainda no grupo Parada (Fig. 10), a presença de hemácias em quantidade nos espaços vasculares.

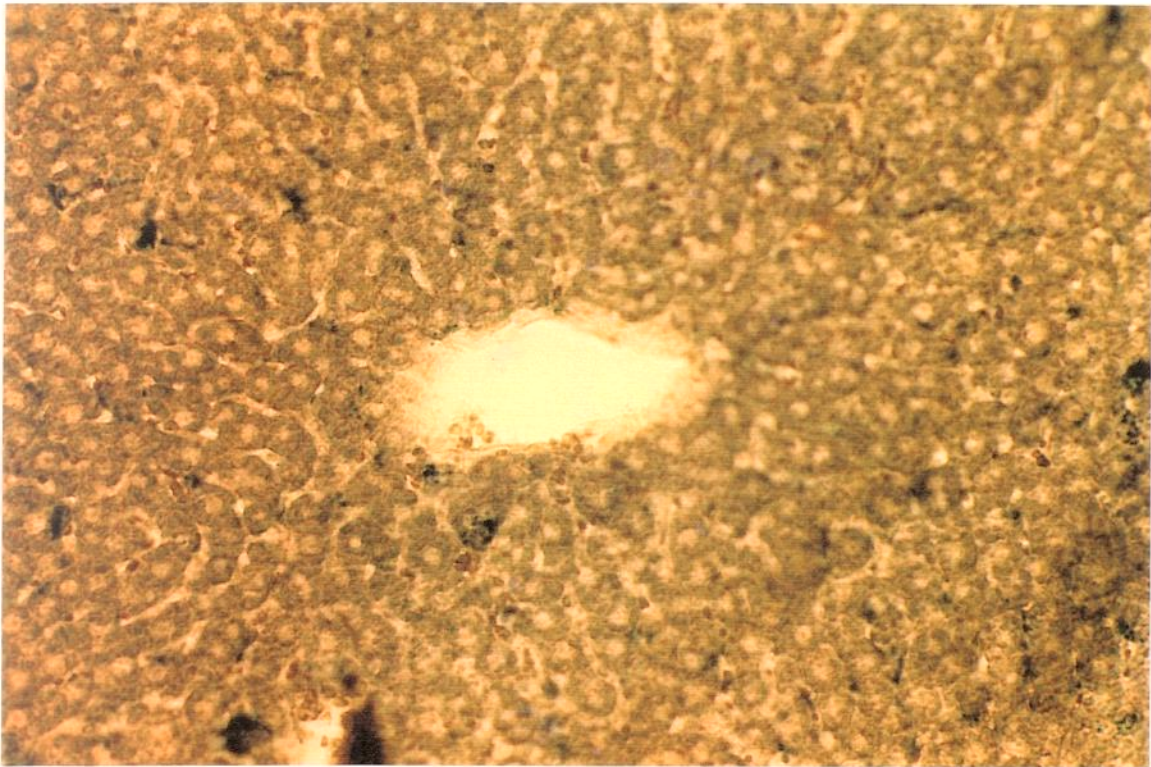


Figura 9 - Lâmina de tecido hepático, obtido após perfusão padronizada e quatro horas de isquemia hipotérmica. Nota-se o espalhamento e a pouca quantidade de áreas enegrecidas contendo gordura (Sudan Black B) (x 250).

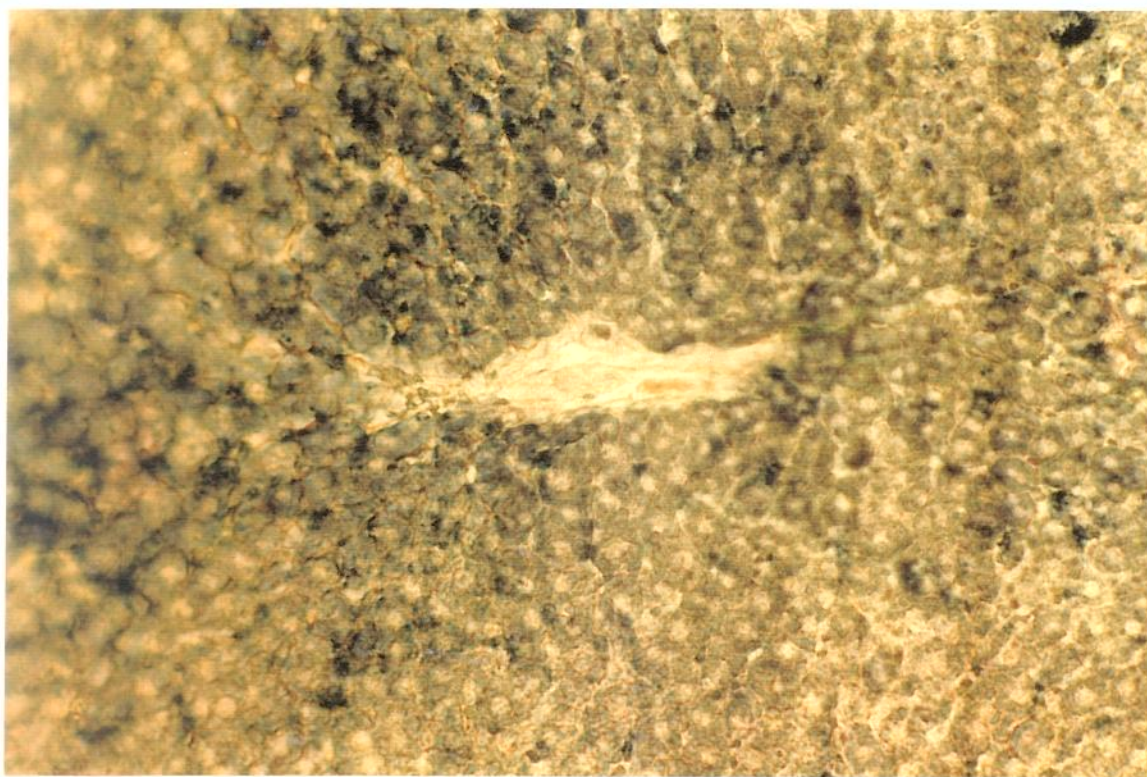


Figura 10 - Lâmina de tecido hepático, obtido após 30 minutos de isquemia normotérmica, perfusão padronizada e quatro horas de isquemia hipotérmica. As áreas enegrecidas, contendo gordura, apresentam-se em maior quantidade e mantêm-se acumuladas predominantemente em região centrolobular. Nota-se, ainda, a presença de hemácias em espaço vascular (Sudan Black B) (x 250).

A gordura do grupo II apresentou a propriedade da birrefringência, característica não notada na do grupo I, espalhada como poeira pelo citoplasma dos hepatócitos.

4.2.2 - Análise morfométrica manual dos núcleos

O Quadro 3 mostra os valores de Área, em pixel², dos núcleos dos hepatócitos.

Quadro 3 - Estatística descritiva dos valores de Área, em pixel², dos núcleos dos hepatócitos.

ÁREA (pixel ²)	n	Média	Desvio Padrão	Min	Max	Mediana
GRUPO I	500	390,37	181,50	109,65	999,28	352,62
GRUPO II	500	445,59	153,37	141,96	1009,90	442,88

A análise estatística, pelo Teste t, mostra que os valores de Área do grupo Parada são maiores que os do grupo Normal ($p= 0,0001$) ($p < 0,05$).

O Quadro 4 mostra os valores de Perímetro, em pixel, dos núcleos dos hepatócitos.

Quadro 4 - Estatística descritiva dos valores de Perímetro (Ppx) em pixel do núcleo dos hepatócitos.

PERÍMETRO (pixel)	n	Média	Desvio Padrão	Min	Max	Mediana
GRUPO I	500	69,49	16,20	32,59	113,40	68,01
GRUPO II	500	75,04	13,19	43,22	113,59	75,98

A análise estatística, pelo Teste t, mostra que o grupo Parada possui maiores valores de Perímetro que o grupo Normal ($p = 0,0001$) ($p < 0,05$).

O Quadro 5 mostra os valores de Fator Forma* dos núcleos dos hepatócitos

Quadro 5 - Estatística descritiva dos valores do Fator Forma dos núcleos dos hepatócitos.

FATOR FORMA	n	Média	Desvio Padrão	Min	Max	Mediana
GRUPO I	500	0,96	0,02	0,83	0,99	0,97
GRUPO II	500	0,96	0,02	0,81	0,99	0,97

$$*Fator\ Forma = 4 \pi A (\acute{a}rea) \div P^2 (\text{perímetro})$$

A análise estatística, pelo Teste t, não mostra diferenças significantes ($p = 0,1780$) em relação ao Fator Forma ($p < 0,05$).

O Quadro 6 apresenta os valores das medidas, em pixel², de 100 μm².

Quadro 6 - Valores, em pixel², de 100 μm², obtidos através do Kontron-Mop-Videoplan®.

MEDIDAS (100 μm ²)	VALORES EM PIXEL ²
1	470,47
2	474,00
3	468,16
4	477,60
5	478,79
6	478,02
7	471,59
8	475,26
9	475,59
10	479,24
11	479,05
12	477,10
13	471,03
14	477,84
15	473,65
MÉDIA	475,16

Através de cálculos matemáticos simples, admite-se que, neste estudo, 1 μm² é igual a 1 pixel², multiplicado pela constante 0,21.

4.2.3 - Análise morfométrica digital da gordura citoplasmática

O Quadro 7 mostra os resultados pertinentes a medidas de Área, em μm^2 , das gotículas de gordura presentes nos citoplasmas dos hepatócitos, pela análise de áreas escolhidas ao acaso: 500 no G I (Fig. 11) e 1498 no G II (Fig 12).

Quadro 7 - Estatística descritiva dos valores de Área obtidos por morfometria digital, em μm^2 , da gordura citoplasmática dos hepatócitos.

ÁREA (μm^2)	n	Média	Desvio Padrão	Min	Max	Mediana
GRUPO I	500	5,68	17,04	0,252	241,53	1,01
GRUPO II (1)	458	60,00	246,10	0,30	4270,00	13,00
GRUPO II (2)	500	4,49	26,55	0,25	401,64	0,91
GRUPO II (3)	500	3,46	14,63	0,25	300,73	0,96

A análise, pelo teste estatístico de Mann-Whitney, das áreas obtidas mostra que elas são maiores no G II (1) ($p = 0,0000$) e G II (2) ($p = 0,0092$), quando comparadas às do G I. Já com o G II (3), esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,1741$) ($p < 0,05$).

O Quadro 8 mostra os valores de Absorbância Média, em níveis de cinza (Gav), das áreas contendo gordura nos citoplasmas dos hepatócitos.

Quadro 8 - Estatística descritiva dos valores de Absorbância Média obtidos por morfometria digital, em níveis de cinza (Gav), das áreas contendo gordura nos citoplasmas dos hepatócitos.

ABSORBÂNCIA MÉDIA (Gav)	n	Média	Desvio Padrão	Min	Max	Mediana
GRUPO I	500	0,78	0,47	0,01	2,11	0,86
GRUPO II (1)	458	0,50	0,18	0,24	1,40	0,45
GRUPO II (2)	499	1,11	0,38	0,27	2,29	1,09
GRUPO II (3)	500	0,75	0,33	0,07	1,78	0,74

A análise estatística, pelo teste de Mann-Whitney, mostra que existem diferenças significativas entre os níveis de Absorbância Média. A comparação entre o G I e os G II (1) ($p = 0,000$), (2) ($p = 0,000$) e (3) ($p = 0,0310$), revela valores maiores no grupo Parada ($p < 0,05$).

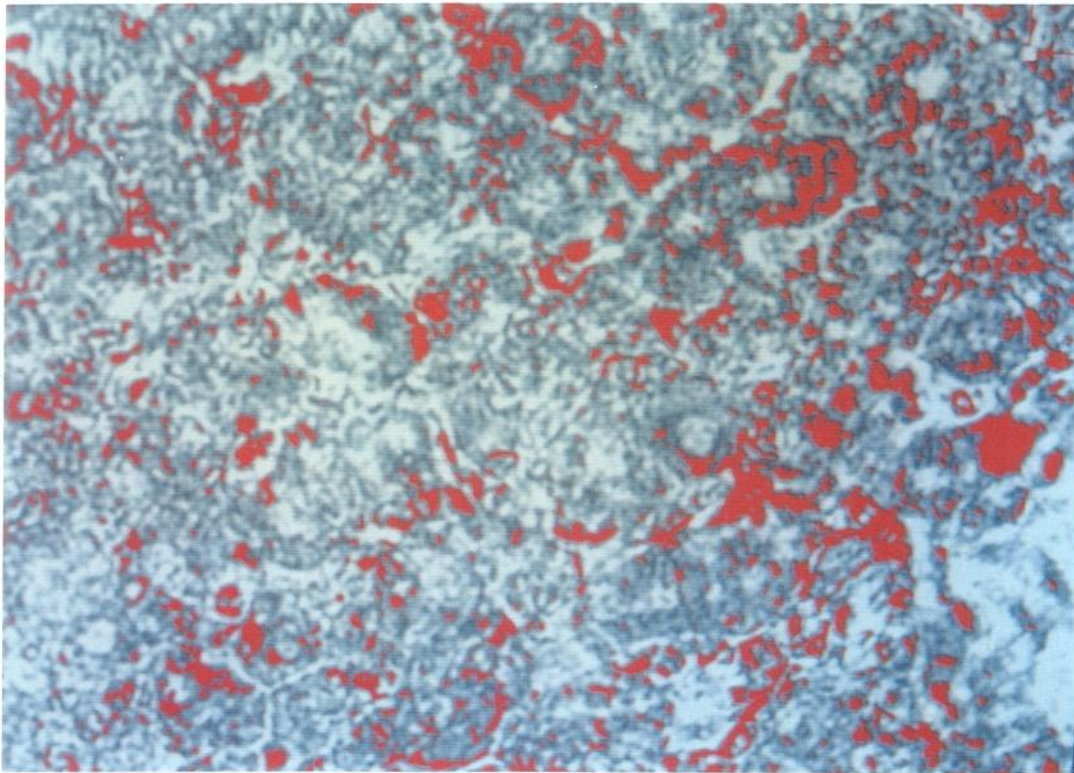


Figura 11 - Fotografia do monitor de vídeo, com áreas contendo gordura demarcadas com pseudocores obtidas por tratamento de imagem, para análise morfométrica digital, em fígados do G I.

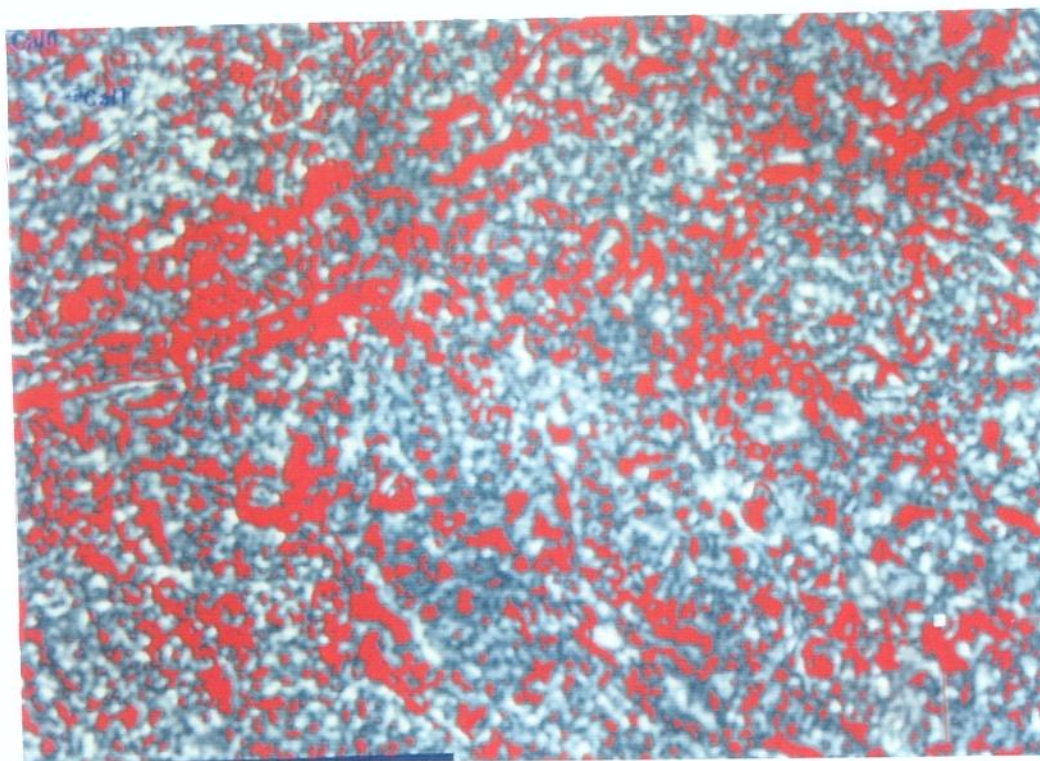


Figura 12 - Fotografia do monitor de vídeo, com áreas contendo gordura demarcadas com pseudocores obtidas por tratamento de imagem, para análise morfométrica digital, em figados do G II.

4.2.4 - Análise morfométrica digital dos núcleos

A análise dos núcleos dos hepatócitos e seu conteúdo genético, corados pela reação de Feulgen, foi realizada sobre áreas demarcadas digitalmente com pseudocores criadas pelo computador (Fig. 13).

Os quadros seguintes mostram os histogramas de frequência referentes às áreas aferidas no G I (1) (Quadro 9), G I (2) (Quadro 10), G I (3) (Quadro 11), G II (1) (Quadro 12) e G II (2) (Quadro 13).

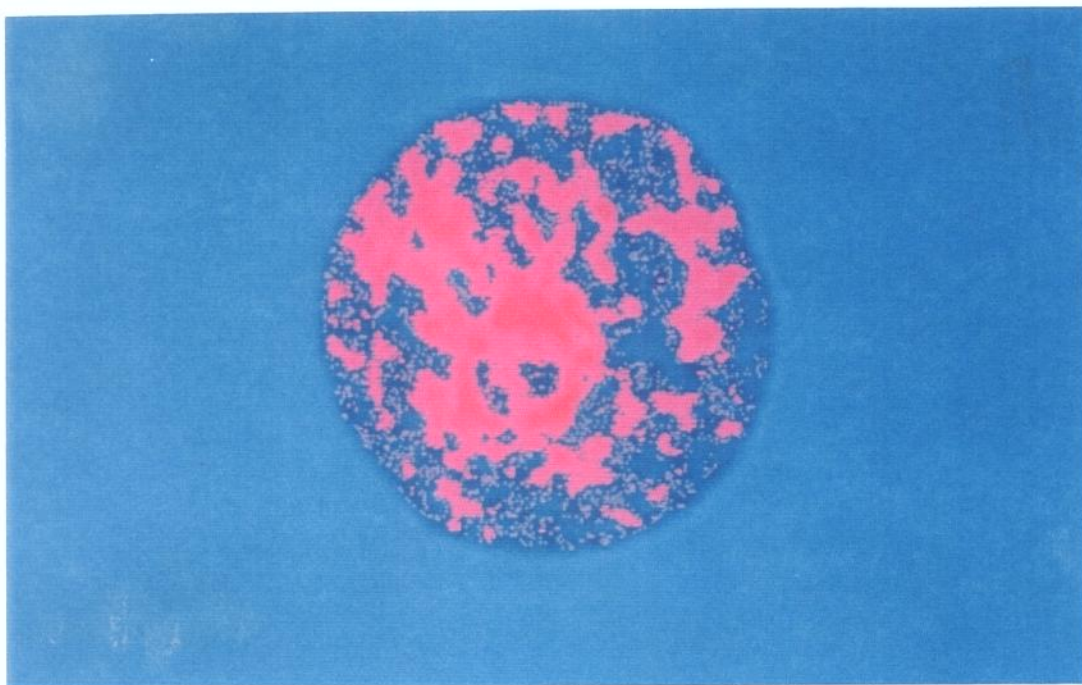


Figura 13 - Fotografia do monitor de vídeo, com núcleo demarcado com pseudocores obtidas por tratamento de imagem, para análise morfométrica digital.

Quadro 9 - Histograma de frequência das Áreas, em μm^2 , de 200 núcleos de hepatócitos, de figados do grupo Normal [GI (1)].

GRUPO I (1)

μm^2	n	
10	5	*****
20	15	*****
30	25	*****
40	28	*****
50	17	*****
60	33	*****
70	14	*****
80	15	*****
90	16	*****
100	18	*****
110	3	***
120	4	****
130	4	****
140	2	**
150	0	
160	0	
170	1	*

Quadro 10 - Histograma de frequência, em μm^2 , de 200 núcleos de hepatócitos, de figados do grupo Normal [GI (2)].

GRUPO I (2)

μm^2	n	
10	3	***
20	17	*****
30	19	*****
40	24	*****
50	29	*****
60	16	*****
70	12	*****
80	10	*****
90	10	*****
100	16	*****
110	21	*****
120	9	*****
130	8	*****
140	0	
150	3	***
160	1	*
170	0	
180	1	*

Quadro 11 - Histograma de frequência, em μm^2 , de 200 núcleos de hepatócitos, de figados do grupo Normal [GI (3)].

GRUPO I (3)

μm^2	n	
10	0	
20	2	**
30	15	*****
40	36	*****
50	26	*****
60	26	*****
70	29	*****
80	14	*****
90	20	*****
100	10	*****
110	5	*****
120	4	****
130	5	*****
140	2	**
150	4	****
160	2	**

Quadro 12 - Histograma de frequência, em μm^2 , de 200 núcleos de hepatócitos, de figados do grupo Parada [GII (1)].

GRUPO II (1)

μm^2	n	
10	2	**
20	1	*
30	4	****
40	15	*****
50	7	*****
60	28	*****
70	17	*****
80	10	*****
90	18	*****
100	22	*****
110	34	*****
120	7	*****
130	5	****
140	13	*****
150	5	****
160	5	****
170	1	*
180	2	**
190	2	**

Quadro 13 - Histograma de Frequência em μm^2 de 200 núcleos de hepatócitos de figados do grupo Parada [GII (2)].

GRUPO II (2)

μm^2	n	
10	0	
20	0	
30	10	*****
40	24	*****
50	14	*****
60	20	*****
70	15	*****
80	27	*****
90	21	*****
100	34	*****
110	17	*****
120	7	*****
130	5	*****
140	1	*
150	2	**
160	1	*
170	2	**

Por intermédio dos histogramas mostrados, constatou-se que, em relação às áreas, os núcleos dos hepatócitos do experimento, apesar de pequenas variações, conservam a característica trimodal, inerente aos ratos, cujos hepatócitos apresentam-se nas formas diplóide, tetraplóide e octoplóide.

O Quadro 14 mostra os valores de Área, em μm^2 , dos núcleos dos hepatócitos nos figados dos grupos I e II.

Quadro 14 - Estatística descritiva dos valores de Área obtidos por morfometria digital, em μm^2 , dos núcleos dos hepatócitos.

ÁREA (μm^2)	n	Média	Desvio Padrão	Min	Max	Mediana
GRUPO I (1)	200	60,52	30,13	13,70	172,81	57,63
GRUPO I (2)	200	60,90	37,72	12,99	231,06	58,71
GRUPO I (3)	200	67,72	29,82	21,19	161,09	63,23
GRUPO II (1)	200	93,00	38,82	5,03	237,96	93,51
GRUPO II (2)	200	80,00	29,75	25,68	173,53	81,65

Quadro 15 - Análise de variância, baseada nos desvios padrões, dos valores de Área em μm^2 , obtidos por morfometria digital, das núcleos dos hepatócitos.

Análise de Variância

	DF	SS	MS	F	p
Fator	4	126918	31729	28,27	0,000
Erro	995	1115868	1112		
Total	999	1243773			

	n	Média	Desvio Padrão	95% dos IC* por média Baseado no desvio padrão obtido
GI (1)	200	60,52	30,13	(--*---)
GI (2)	200	69,90	37,72	(---*---)
GI(3)	200	67,72	29,82	(--*---)
GII(1)	200	93,00	38,82	(---*---)
GII(2)	200	80,00	29,75	(---*---)

+-----+-----+-----+-----+
 60 72 84 96

Desvio Padrão obtido = 33,50

* IC = Intervalo de Confiança

O quadro 16 mostra os valores de Perímetro nuclear, em μm , dos hepatócitos.

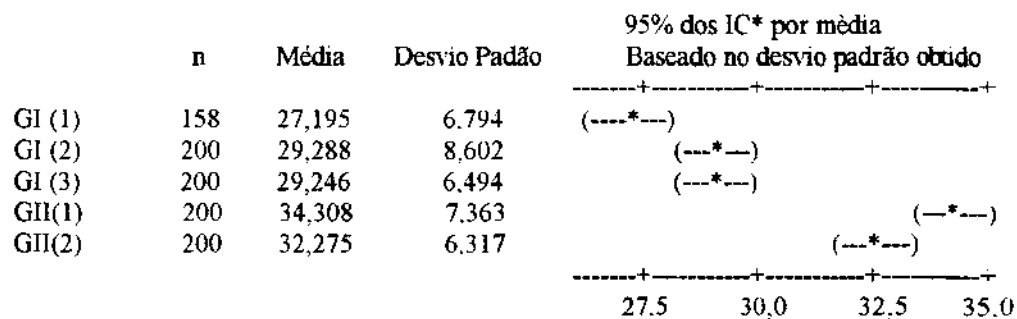
Quadro 16 - Estatística descritiva dos valores de Perímetro obtidos por morfometria digital, em μm , dos núcleos dos hepatócitos

PERÍMETRO (μm)	n	Média	Desvio Padrão	Min	Max	Mediana
GRUPO I (1)	158	27,19	6,79	13,40	42,69	27,18
GRUPO I (2)	200	29,29	8,60	13,01	71,92	28,08
GRUPO I (3)	200	29,25	6,45	16,39	48,42	28,87
GRUPO II (1)	200	34,31	7,36	12,63	55,84	35,04
GRUPO II (2)	200	32,27	6,31	17,97	48,07	33,03

Quadro 17 - Análise de variância, baseada nos desvios padrões, dos valores de Perímetro, em μm , obtidos por morfometria digital, dos núcleos dos hepatócitos.

Análise de Variância

	DF	SS	MS	F	p
Fator	4	5852,5	1463,1	28,40	0,000
Erro	953	49097,1	51,5		
Total	957	54949,6			



O Quadro 18 mostra os valores de Absorbância Média, em níveis de cinza (Gav), dos núcleos dos hepatócitos estudados.

Quadro 18 - Estatística descritiva dos valores de Absorbância Média, em níveis de cinza (Gav), obtidos por morfometria digital, dos núcleos dos hepatócitos.

ABSORBÂNCIA MÉDIA	n	Média	Desvio Padrão	Min	Max	Mediana
GRUPO I (1)	200	0,85	0,34	0,35	1,57	0,72
GRUPO I (2)	200	0,77	0,28	0,38	1,52	0,70
GRUPO I (3)	200	0,96	0,13	0,55	1,29	0,96
GRUPO II (1)	200	0,52	0,15	0,22	1,06	0,49
GRUPO II (2)	200	0,47	0,09	0,23	0,70	0,36

Quadro 19 - Análise de variância, baseada nos desvios padrões, dos valores de Absorbância Média, em níveis de cinza (Gav), obtidos por morfometria digital, dos núcleos dos hepatócitos.

Análise de Variância

	DF	SS	MS	F	p
Fator	4	46,4765	11,6191	241,45	0,000
Erro	995	47,8818	0,0481		
Total	999	94,3583			

	n	Média	Desvio Padrão	95% dos IC* por média Baseado no desvio padrão obtido
GI (1)	200	0,8522	0,3401	(-*)
GI (2)	200	0,7716	0,2793	(-*)
GI (3)	200	0,9588	0,1306	(-*)
GII(1)	200	0,5227	0,1491	(*-)
GII(2)	200	0,4748	0,0874	(-*)

Desvio Padrão obtido = 0,2194

* IC = Intervalo de Confiança

O Quadro 20 mostra os valores de Absorbância Total* dos núcleos dos hepatócitos estudados.

$$* \text{Absorbância Total} = \text{Absorbância Média} \times \text{Área}$$

Quadro 20 - Estatística descritiva dos valores de Absorbância Total, obtidos por morfometria digital, dos núcleos dos hepatócitos.

ABSORBÂNCIA TOTAL	n	Média	Desvio Padrão	Min	Max	Mediana
GRUPO I (1)	200	46,63	21,26	17,21	160,06	48,32
GRUPO I (2)	200	48,31	23,06	17,84	171,71	36,31
GRUPO I (3)	200	65,28	31,29	19,48	170,43	58,34
GRUPO II (1)	200	46,53	18,79	1,31	118,84	48,43
GRUPO II (2)	200	37,09	14,04	10,43	94,09	65,28

Quadro 21 - Análise de variância, baseada nos desvios padrões, dos valores de Absorbância Total, obtidos por morfometria digital, dos núcleos dos hepatócitos.

Análise de Variância

	DF	SS	MS	F	p
Fator	4	124319	31080	61,84	0,000
Erro	995	500107	503		
Total	999	624426			

	n	Média	Desvio Padão	95% dos IC* por média Baseado no desvio padrão obtido
GI (1)	200	46,63	21,26	-----+-----+----- (--*)
GI (2)	200	48,31	23,06	(-*--)
GI(3)	200	65,38	31,29	(-*--)
GII(1)	200	46,53	18,79	(--*)
GII(2)	200	37,09	14,04	(-*--)
				-----+-----+----- 36 48 60

Desvio Padrão obtido = 22,42

* IC = Intervalo de Confiança

O Quadro 22 mostra os valores de Fator Forma dos núcleos dos hepatócitos.

Quadro 22 - Estatística descritiva dos valores de Fator Forma, obtidos por morfometria digital, dos núcleos dos hepatócitos.

FATOR FORMA	n	Média	Desvio Padrão	Min	Max	Mediana
GRUPO I (1)	158	0,96	0,05	0,69	1,00	0,98
GRUPO I (2)	200	0,96	0,06	0,54	1,00	0,98
GRUPO I (3)	200	0,95	0,05	0,49	1,00	0,95
GRUPO II (1)	200	0,94	0,07	0,28	1,00	0,96
GRUPO II (2)	200	0,93	0,06	0,60	1,00	0,95

Quadro 23 - Análise de variância, baseada nos desvios padrões, dos valores do Fator Forma, obtidos por morfometria digital, dos núcleos dos hepatócitos.

Análise de Variância

	DF	SS	MS	F	p
Fator	4	0,09282	0,02320	5,99	0,000
Erro	953	3,69136	0,00387		
Total	957	3,78417			

	n	Média	Desvio Padrão	95% dos IC* por média Baseado no desvio padrão obtido
GI (1)	158	0,96	0,05	(-----*-----)
GI (2)	200	0,96	0,06	(-----*-----)
GI (3)	200	0,95	0,05	(-----*-----)
GII(1)	200	0,94	0,07	(-----*-----)
GII(2)	200	0,93	0,06	(-----*-----)
				-----+-----+-----+-----+-----
				0,930 0,945 0,960 0,975

Desvio Padrão obtido = 0,06224

* IC = Intervalo de Confiança

5 . DISCUSSÃO

A necessidade de órgãos para transplantes faz com que os pesquisadores direcionem esforços para soluções alternativas, como a utilização de doadores em assistolia, e avancem na fronteira do tempo limite de isquemia, um dos fatores mais importantes envolvidos na manutenção da vitalidade dos órgãos doados.

Apesar de vários grupos de cirurgiões transplantarem rins obtidos após a paralisação dos batimentos cardíacos (PBC) dos doadores (KOZAKI *et al.*, 1991; BOOSTER *et al.*, 1993; CASAVILLA *et al.*, 1995a; DAEMEN *et al.*, 1996) existe relutância em se estender a utilização deste tipo de doador para transplantes de outros órgãos.

De fato, o primeiro transplante cardíaco, realizado em 1967, na África do Sul, foi feito com órgão doado após paralisação dos batimentos cardíacos (BARNARD, 1967).

Quando os primeiros transplantes de fígado foram realizados, utilizaram-se, exclusivamente, doadores em assistolia e as técnicas para a obtenção do órgão requeriam um rápido resfriamento deste, logo após a PBC (CALNE & WILLIAMS, 1968; STARZL; GROTH; BRETTSCHEIDER, 1968). A maioria dos fígados transplantados nessa época apresentaram boa função, apesar das condições de obtenção dos mesmos.

Após a aceitação do conceito de morte cerebral nos Estados Unidos da América, em 1968, todos os órgãos passaram a ser obtidos com circulação sanguínea efetiva.

Sempre se acreditou que o fígado era extremamente sensível à isquemia. Mesmo após a descrição do clampeamento da tríade portal (PRINGLE, 1908), que facilitou os procedimentos cirúrgicos no órgão, pela diminuição do sangramento e, conseqüentemente, da morbidade e mortalidade, este método teve seu uso limitado.

Na década de 60, o período limite de oclusão da tríade portal era de 15 minutos (COUINAUD, 1966). Isto foi desafiado por outros autores através dos tempos. Atualmente, aceita-se que a oclusão vascular hepática pode ser feita por um período superior a 60 minutos, sem maiores danos para o órgão (HUGUET *et al.*, 1992; HANNOUN *et al.*, 1993).

Avanços no campo da cirurgia, levando a ressecções hepáticas mais complexas e extensas, trouxeram a necessidade de períodos longos de oclusão vascular. Entretanto, o limite entre a duração destes períodos e os conseqüentes danos isquêmicos em humanos permanece desconhecido (HANNOUN *et al.*, 1993).

Em animais de experimentação, o tempo limite de isquemia hepática encontra-se entre 60 e 120 minutos, em ratos (BASSI & BERNELLI-ZAZZERA, 1964). Em babuínos e porcos, de 90 a 120 minutos de isquemia são tolerados (HOLPER; OLGAY; KITAHAMA, 1974; NORDLINGER; DOUVIN; JAVAUDIN, 1980).

Os transplantes estão, inevitavelmente, associados à isquemia. Lesões celulares podem ocorrer durante o período isquêmico e após a reperfusão sangüínea. A oferta insuficiente de oxigênio e o acúmulo de metabólitos contribuem para o aparecimento destas lesões (HASSELGREN; BIBER; FORNANDER, 1987).

Apresentando características próprias, os períodos de isquemia do tipo normotérmica (tempo corrido da interrupção do suprimento sangüíneo até a administração da solução de preservação a 4° C) e hipotérmica (período que varia da administração da solução de preservação gelada até a reperfusão sangüínea), relatados nos transplantes, têm sido amplamente estudados.

A possibilidade de utilização de fígado obtido após PBC do doador foi reintroduzida em 1984, após demonstração da técnica de resfriamento, por infusão aórtica rápida de solução de conservação a 4° C. Desta maneira, por um resfriamento denominado central, múltiplos órgãos podem ser removidos no período de 30 a 60 minutos, com um tempo de isquemia normotérmica de, aproximadamente, 15 minutos (STARZL *et al.*, 1987).

Na Suécia, por meio desta técnica, ou de variantes dela, foi possível sistematizar a obtenção de bons fígados de doadores com parada cardíaca, antes da implementação do critério de morte cerebral naquele país (ERICZON *et al.*, 1987).

Entre novembro de 1984 e maio de 1987, foram transplantados 17 fígados obtidos após PBC do doador, pela técnica de resfriamento rápido *in situ*, com um índice de 6% de falência primária do enxerto, comparável ao de 2 a 12% citado na literatura para os órgãos obtidos de doadores com batimentos cardíacos.

Os pesquisadores da Universidade de Pittsburgh, relataram o uso de sete fígados obtidos após PBC, cinco deles durante ressuscitação cardiopulmonar, no período de outubro de 1987 a dezembro de 1988. A técnica de perfusão rápida *in situ* foi realizada através da aorta e da veia mesentérica inferior.

Os achados histológicos em tecido hepático pré-transplante foram discreta presença de neutrófilos em sinusóides e moderada esteatose centrolobular. Apesar disto, apenas um enxerto apresentou bom funcionamento nesta série (YANAGA *et al.*, 1990).

Outro grupo de Pittsburgh, relatou uma série de 12 fígados transplantados, obtidos de doadores com PBC, entre janeiro de 1989 e setembro de 1993 (CASAVILLA *et al.*, 1995a).

Os doadores foram divididos em dois grupos, sendo o primeiro (grupo 1) composto por pacientes cujos órgãos foram retirados após insucesso da ressuscitação cardiopulmonar (n=6) e, o segundo (grupo 2), formado por pacientes dos quais os órgãos foram retirados quando da parada cardíaca, após interrupção da ventilação mecânica em sala cirúrgica (n=6). Em ambos os grupos, foram administradas 30.000 UI de heparina, previamente à laparotomia, e a técnica de resfriamento rápido foi utilizada, perfundindo-se solução de conservação através da aorta distal e da veia mesentérica inferior.

No grupo 1, composto por doadores com parada cardíaca não-controlada, 33,3% dos enxertos apresentaram falência primária e três pacientes necessitaram de retransplante, devido à trombose de artéria hepática, fluxo portal inadequado e hepatite por citomegalovírus. Somente um dos seis fígados transplantados apresentou bom funcionamento após um ano.

No grupo 2, todos os enxertos funcionaram. Dois pacientes necessitaram de retransplante, por trombose da artéria hepática, após um período aproximado de um mês. O índice de aproveitamento dos enxertos após um ano era de 50%, à época do relato em questão.

Nele, concluiu-se que fígados obtidos de doadores com PBC controlada podiam ser utilizados, enquanto que os conseguidos após PBC não-controlada só deviam ser usados em casos muito bem selecionados (CASAVILLA *et al.*, 1995a).

No mesmo ano, o grupo descreveu mais dois pacientes transplantados com fígados retirados após parada controlada dos batimentos cardíacos, mantendo o nível de 100% de funcionamento para os enxertos obtidos nestas condições (CASAVILLA *et al.*, 1995b).

O trabalho de D'ALESSANDRO *et al.* (1995) relatou o transplante de cinco fígados obtidos de doadores com PBC controlada em sala cirúrgica, após cateterização de artéria e veia femorais para a administração de solução de conservação e resfriamento do órgão. Foi referido apenas um caso de falência primária, resultado de estenose da veia cava supra-hepática e compressão hepática pelo fechamento apertado da parede abdominal. O paciente foi retransplantado após 14 dias, com outro fígado obtido após PBC, vindo a falecer por complicações de um hemotórax, dois meses depois. Os demais apresentaram-se em bom estado, com uma média de, aproximadamente, 12 meses de seguimento pós-operatório.

As células do parênquima hepático, acreditava-se, eram o sítio primário de lesões decorrentes da isquemia. Atualmente as células dos sinusóides ganharam importância, com vários autores descrevendo alterações, nestes locais, decorrentes de isquemia fria (MOMII & KOGA, 1990; IKEDA *et al.*, 1992; OKOUCHI; SASAKY; TAMAKI, 1994).

Várias evidências experimentais sugerem que as células hepáticas não-parenquimatosas são mais vulneráveis a lesões induzidas pela hipotermia (XU *et al.*, 1992). Existem indícios de que o local das lesões decorrentes de isquemia normotérmica seria o hepatócito, enquanto que a isquemia fria estaria relacionada a danos nas células do endotélio (IKEDA *et al.*, 1992).

Este estudo analisa as alterações no citoplasma e no núcleo do hepatócito, que, teoricamente, poderiam ser notadas após agressão isquêmica normotérmica, imposta ao órgão obtido de doador em assistolia, preservado em solução padronizada a 4° C, por um período de quatro horas.

Foi interesse desta pesquisa, não só analisar alterações decorrentes da isquemia normotérmica, mas também reproduzir condições que, provavelmente, seriam encontradas no transplante clínico.

Para isso, o uso do rato neste experimento deveu-se a inúmeros motivos. A larga experiência da realização de transplante hepático neste animal, mostrada na literatura, e a facilidade de manuseio do mesmo foram os fatores primordiais.

O primeiro transplante ortotópico de fígado realizado em ratos foi relatado em 1973 e apresentou dificuldades devido à necessidade de se fazer anastomoses microvasculares entre veias cavas e portas e do ducto hepático no duodeno, exigindo, ainda, a descompressão esplâncnica (LEE *et al.*, 1973).

Técnicas simplificadas de transplante ortotópico de fígado, em ratos, foram descritas com razoável índice de sobrevida, dando novo impulso aos estudos das variáveis envolvidas neste procedimento cirúrgico, mas ainda esbarrando na quantidade e dificuldade de confecção das anastomoses microcirúrgicas (LEE, CHARTERS & ORLOFF, 1975).

Após o relato da utilização de cateteres na feitura destas anastomoses, reduzindo o tempo cirúrgico, o índice e o período de sobrevida dos animais aumentaram sensivelmente (KAMADA & CALNE, 1979).

Pequenas modificações e muitos estudos confirmaram a viabilidade do uso dos cateteres (MIYATA *et al.*, 1980; HASUIKE *et al.*, 1988; STEFFEN *et al.*, 1989; MARNI & FERRERO, 1988; KAMADA, SUMIMOTO, KANEDA, 1992; GAO *et al.*, 1993; KAMADA & CALNE, 1995) e consagraram esta técnica como padrão para o estudo do transplante hepático em ratos.

Na presente pesquisa, apesar da não-realização do transplante experimental, as condições técnicas para a obtenção do enxerto foram respeitadas, conforme descrições de KAMADA & CALNE (1988) e STEFFEN *et al.* (1989), com mínimas modificações.

Manteve-se a anestesia com éter e a laparotomia transversal ampla, o que facilita a manipulação das estruturas intra-abdominais. A administração de 50 U.I. de heparina foi feita pela veia cava inferior. O fígado foi, então, perfundido com 5 ml de solução de Euro-Collins pela veia porta, por um período de um minuto, enquanto era exsanguinado pela aorta e veia cava inferior, em suas porções no abdome inferior.

Estipulou-se o período de perfusão para se evitar grandes diferenças na pressão de administração da solução conservante.

Com a técnica cirúrgica em si, não houve maiores dificuldades. A dissecação para a identificação da aorta abdominal e da veia cava inferior foi facilitada pelo uso de hastes com pontas de algodão. A mudança de tonalidade do parênquima hepático foi notada quando da infusão da solução conservante pela veia porta.

Como o tempo gasto para a perfusão, retirada e pesagem do enxerto não ultrapassou dois minutos, o tempo de isquemia normotérmica do Grupo II foi praticamente nulo.

A escolha da solução de Euro-Collins foi baseada em sua unânime eficácia na preservação de enxertos em períodos curtos de isquemia fria (SUNDBERG *et al.*, 1990; IKEDA *et al.*, 1992). Não há mudanças na morfologia hepática até um período de quatro horas em solução de Euro-Collins (MOMII & KOGA, 1990).

O uso da solução de Euro-Collins, durante um período de quatro horas, não acarreta alterações importantes na morfologia hepática, mas a permanência do enxerto em solução de preservação a 4° C, obrigatória durante o transplante clínico, poderia interferir nas alterações celulares de hepatócitos submetidos à isquemia normotérmica.

Por isso, o grupo II foi submetido a um período de isquemia normotérmica e, os dois grupos, a um mesmo período de isquemia hipotérmica.

O uso da solução de cloreto de potássio a 19,1%, na indução da paralisação dos batimentos cardíacos nos ratos do grupo II, foi determinado pela ausência de dados que indicassem danos causados pela mesma às células hepáticas. Os efeitos deletérios sobre a atividade elétrica do coração representam as conseqüências mais importantes da hipercalemia (MUDGE & WEINER, 1991).

Os animais provenientes do Biotério da Universidade de Campinas tinham a mesma idade e pesos semelhantes, conforme os cálculos estatísticos apresentados.

Verificou-se valores maiores de peso dos enxertos do grupo Parada, após o procedimento padronizado para obtenção dos mesmos.

Isto poderia ser explicado pela grande quantidade de hemácias encontradas nos espaços vasculares. Este fato leva a crer que haveria a necessidade de infusão de um volume maior de solução de preservação, que promovesse a limpeza desses espaços vasculares.

Uma outra hipótese para o peso maior dos fígados do grupo Parada seria a tumefação celular aguda (edema celular), uma das manifestações mais precoces e comuns da lesão isquêmica. Ela é reversível e determinada por um distúrbio na regulação do volume celular pela membrana citoplasmática (CONTRAM; KUMAR; ROBINS, 1991).

A queda no fornecimento de oxigênio condiciona uma redução na oxidação dos ácidos graxos, conduzindo a uma diminuição do ATP. Estes e outros fatores acabam por levar a uma menor utilização de ácidos graxos, permitindo um acúmulo de lipídios no citoplasma dos hepatócitos. A manifestação morfológica mais comum dos transtornos do metabolismo das gorduras, em quaisquer dos vários níveis em que podem ocorrer, é representada pela esteatose hepática. Ela inicia-se no hepatócito, na parte adjacente ao sinusóide, pelo aparecimento de gotículas de gordura, triglicérides em grande parte (RASO & BOGLIOLO, 1987).

Constatam-se diferentes relatos após transplantes usando-se enxertos com esteatose. São descritos casos de disfunção primária do órgão (NEUHAUS *et al.*, 1984; D'ALESSANDRO *et al.*, 1991; MOR *et al.*, 1992; POST *et al.*, 1993) e de bons resultados dos implantes de fígados com moderada e grave esteatose (KARAYALÇIN *et al.*, 1994).

Na grave, a má função do enxerto ocorreria devido à obstrução dos sinusóides, pelo congelamento das gotículas de gordura durante o período de preservação (D'ALESSANDRO *et al.*, 1991). Existe a necessidade de estudos mais aprofundados que expliquem os resultados conflitantes.

Após análise, por microscopia óptica, do tecido hepático deste experimento, notou-se que houve um maior acúmulo de gordura citoplasmática no grupo Parada, predominantemente em posição centrolobular, enquanto que no grupo Normal, esta gordura apresentou-se em menor quantidade e espalhada por todo o citoplasma.

A presença de lipídios nos citoplasmas dos hepatócitos deste estudo vem de encontro ao descrito anteriormente e ao verificado por IKEDA *et al.* (1992). Estes pesquisadores relataram a presença de discreta esteatose microvesicular em áreas centrolobulares, após quatro horas de isquemia hipotérmica em solução de Ringer lactato, em contraste a grandes áreas de esteatose micro e macrovesicular nos hepatócitos, particularmente após 60 minutos de isquemia normotérmica.

As lâminas observadas sob a propriedade física da birrefringência mostraram um aspecto interessante : as áreas com gordura no citoplasma do hepatócito de fígados submetidos à isquemia normotérmica foram birrefringentes, efeito não notado no grupo Normal. Este aspecto, sugere uma diferença na constituição dessa gordura, que poderia ser confirmada por meio de provas histoquímicas.

A quantificação da gordura nos fígados com esteatose seria de interesse na avaliação dos mesmos e na tentativa de se estabelecer limites para o uso de enxertos nesta condição.

Métodos não-invasivos, como a Ressonância Magnética, são promissores (LEVENSON *et al.*, 1991; PETERSEN *et al.*, 1996).

As análises quantitativas de material obtido por biópsia também estão nos resultados preliminares. HALL *et al.* (1996) colaboradores descrevem um método com o uso de tetróxido de ósmio, microscopia óptica e noções de morfometria.

A esteatose notada visualmente foi quantificada no presente trabalho, por análise morfométrica digital (Global Lab Image ®), levando-se em conta os valores de Área e Absorbância Média (OD).

De fato, torna-se necessário que as descrições pseudoquantitativas sejam substituídas por dados matemáticos passíveis de tratamento estatístico (COTRIM *et al.*, 1990), objetivando uma comparação fidedigna.

A heterogeneidade das gotículas aferidas dificulta uma análise mais apurada. A comparação estatística entre a amostra do grupo Normal e duas amostras do grupo Parada confirmou uma maior presença de gordura no citoplasma de hepatócitos deste último, como foi notado visualmente. Comparando, ainda, o grupo Normal a uma terceira amostra do grupo Parada, esta diferença não foi estatisticamente significante.

Os maiores valores de OD nas áreas citoplasmáticas com gordura, foram encontrados nos hepatócitos do grupo Parada. Este parâmetro, que é medido por níveis de cinza, atesta uma maior concentração de lipídios nestas áreas.

Os resultados denotam que o método de quantificação aplicado necessita de aperfeiçoamentos para a avaliação da gordura citoplasmática.

Durante o período de isquemia, o nível de energia celular cai rapidamente e há distúrbios na função mitocondrial e da membrana celular, bem como redução na síntese protéica (FARBER; CHIEN; MITTNACHT, 1981; HASSELGREN *et al.*, 1983; FORNANDER *et al.*, 1985). Alterações do suco nuclear e da cromatina podem aparecer precocemente, mesmo sob a ação de agressões de pequena intensidade (TAFURI, 1987).

No intuito de realizar uma análise rigorosa do comportamento do hepatócito submetido às condições impostas pelo experimento, quanto ao núcleo, usou-se também a morfometria.

Neste trabalho, modificações no tamanho e no conteúdo nuclear dos hepatócitos submetidos a condições de isquemia normo e hipotérmica foram observados pelos processos manual e digital.

A análise manual pelo equipamento Kontron-Mop-Videoplan ® permitiu avaliar os parâmetros Área, Perímetro e Fator Forma dos núcleos de hepatócitos.

Em relação à Área e Perímetro, os maiores valores foram encontrados no grupo Parada, de forma estatisticamente significante.

O Fator Forma, parâmetro que se aproxima de 1 quanto mais próxima da forma esférica apresentar-se a estrutura avaliada, manteve-se com valores semelhantes para ambos os grupos. Estes valores ficaram bem próximos da unidade (1), mostrando que os núcleos permaneceram com a forma esférica.

Algumas hipóteses podem explicar o aumento da Área nuclear dos hepatócitos submetidos à trinta minutos de isquemia normotérmica. A absorção de líquidos, como dito anteriormente, levando à tumefação celular aguda, manifestação comum da lesão isquêmica, aumenta o volume celular.

Uma outra hipótese seria uma mudança na quantidade do conteúdo nuclear após a agressão. Na intenção de se estudar este parâmetro, retiraram-se algumas amostras para serem analisadas de maneira digital.

Esta análise dos núcleos pelo GLOBAL LAB Image ®, realizada a fim de confirmar os dados obtidos manualmente quanto à Área e de inferir mudanças na quantidade de cromatina, nos dá os parâmetros : Área em μm^2 , Perímetro em μm , Absorbância Média (OD), Absorbância Total (IOD), e Fator Forma.

Os núcleos dos hepatócitos de um rato apresentam-se nas formas diplóide, tetraplóide e octoplóide (VIDAL *et al.*, 1994), mostrando uma característica trimodal, quando analisados estatisticamente.

Apesar das condições isquêmicas impostas pela pesquisa, estes núcleos mantiveram a característica trimodal, conforme os histogramas mostrados nos Quadros 5, 6, 7, 8 e 9.

As amostras dos grupos I e II, quando comparadas, mostraram que os hepatócitos de fígados submetidos à isquemia normo e hipotérmica (GII) possuem Áreas nucleares maiores, confirmando os dados obtidos pelo sistema manual.

A Absorbância Média (OD) é a variável que indica a concentração do conteúdo nuclear. Foram encontrados maiores valores nos núcleos de hepatócitos submetidos apenas à isquemia hipotérmica (GI).

Levando-se em conta as áreas nucleares aferidas e suas respectivas concentrações, chegou-se à variável Absorbância Total (IOD), que pode indicar modificações distintas no DNA. Os índices de IOD nos grupos I e II foram considerados semelhantes, levando a crer que estas modificações no material genético não ocorreram.

Em relação ao Perímetro nuclear, este foi maior no grupo Parada, dado já esperado, e que confirma o descrito para a variável Área.

Os valores de Fator Forma, medidos pelo sistema digital, apresentaram-se bem próximos da unidade (1) e semelhantes entre os grupos. Isto demonstra que os núcleos estudados, pertencentes aos dois grupos, mantiveram a forma esférica, não alterada pela agressão isquêmica. Houve uma confirmação dos dados obtidos pela análise manual.

Pelo aparato manual, as unidades de área e perímetro são dadas em pixel, que corresponde a uma linha do conjunto que forma a imagem no monitor de vídeo.

Com o objetivo de correlacionar os valores obtidos e dotá-los de uma mesma unidade (μm), usou-se um artifício simples. Após alcançar-se a média, em pixel, de quinze medidas de $100 \mu\text{m}^2$, em lâmina micrométrica, chegou-se por regra de três, a uma constante.

Neste estudo, o valor de $1 \mu\text{m}^2$ é igual a 1 pixel^2 , multiplicado pela constante 0,21. Os valores em μm^2 das áreas nucleares medidas manualmente são semelhantes aos aferidos por processo digital, atestando a qualidade dos métodos.

O fígado é um órgão de grande complexidade, composto por sete tipos diferentes de células, com as quais realiza mais de 5000 funções (LaBRECQUE, 1994). Não existe, no momento, um parâmetro ou exame que prediga a função de um enxerto após o transplante e sabe-se da extrema dificuldade em se obtê-los.

Os estudos morfológicos podem contribuir para que se entenda o comportamento dos órgãos, nas diversas situações envolvidas nos transplantes. Aliados a dados clínicos, trarão respostas que definirão o futuro de milhares de pessoas.

6 . CONCLUSÃO

Este estudo permite concluir que :

1 - O hepatócito do fígado submetido a 30 minutos de isquemia normotérmica e a quatro horas de isquemia hipotérmica apresenta um maior acúmulo de gordura em seu citoplasma, preferencialmente ao redor dos vasos hepáticos (centrolobular), em comparação ao hepatócito do fígado submetido a quatro horas de isquemia hipotérmica.

2 - O hepatócito do fígado submetido a 30 minutos de isquemia normotérmica e quatro horas de isquemia hipotérmica (G II) apresenta Área e Perímetro nucleares maiores que o hepatócito de fígado submetido a quatro horas de isquemia hipotérmica (G I).

3 - O núcleo dos hepatócitos do G I e do G II mantêm a forma esférica.

4 - O hepatócito de fígado submetido a 30 minutos de isquemia normotérmica e a quatro horas de isquemia hipotérmica apresenta Área nuclear maior, porém, uma Absorbância Média menor, ao contrário daquele submetido a quatro horas de isquemia hipotérmica, o qual apresenta Área nuclear menor e Absorbância Média maior. Isto sugere que não há diferença na quantidade de cromatina entre os hepatócitos dos dois grupos.

7 . SUMMARY

Liver transplantation from non-heart-beating donor is an alternative for the rise of the donors' number.

With the intention of analyzing the behavior of the obtained organ in these conditions, this study aimed to detect variances of the cytoplasmic fat and alterations of hepatocytes nucleus of livers submitted to a distinct periods of the normothermic ischemia and identical of hypothermic ischemia.

Twenty-five Wistar rats were used, bearing the same age and strain, divided into two groups compounded by 12 (group I) and 13 (group II) animals, which weights were similar ($p=0,0030$).

Those from group I undergone laparotomy and the standard procedure for obtaining graft for transplantation. The organ was withdrawn and maintained, for four hours, in a Euro-Collins solution at 4°C.

The same procedure was performed in the group II, thirty minutes after the cardiac standstill.

The cytoplasmic fat was analyzed visually in cuts of hepatic fragments, stained with Sudan Black B solution, and a great accumulation was noted, in the group II, predominantly in the centrilobular region.

Nuclei were analyzed by manual morphometry with Kontron-Mop-Videoplan ® equipment checking Area, Perimeter and Roundness, in imprints taken to a Feulgen reaction. It was certified that the nuclei of the group II presented greater nuclear Area and Perimeter ($p=0,0001$, $p=0,0001$). Values of Roundness were similar ($p=0,1780$) and near the unit (1), private of the structures with spherical shape.

With the intention of emphasizing mathmatically the obtained data visually over the cytoplasmic fat, and certify the values of manual measurement of hepatocyt nuclei, digital morphometric analysis was performed in random samples, with Global Lab Image ® equipament measuring Area, Perimeter, Optical Density (concentration indicator), Integrated Optical Density (Optical Density x Area) and Roundness.

Parameters analysed over the fat were Area and Optical Density. The digital analysis confirmed a great presence and concentration of fat in the hepatocyte cytoplasms of group II. The heterogeneity of the areas makes a more accurate checking difficult, showing that the method needs improvement.

According to the nucleus, the digital checking of the Area, Perimeter and Roundness confirmed the obtained data by manual morphometry. The Optical Density values were smaller in the group II and those of Integrated Optical Density similar between the two groups, suggesting no alteration in the nuclear contents.

Work results indicate that the hepatocyte, from obtained livers, after thirty minutes of normothermic ischemia and maintained in a preservation solution at 4°C over four hours, comprise a higher quantity of fat in its cytoplasm, presenting greater nuclear Area and Perimeter, when compared to the livers maintained in a preservation solution at 4°C over four hours.

Hepatocyte nuclei of both groups maintained the spherical shape.

8 . REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

ABOUNA, G.M.; KREMER, G.D.; DADDAH, S.K.; AL-ADNANI, M.S.; KUMAR, S.A.; KUSMA, G. - Reversal of diabetic nephropathy in human cadaveric kidneys after transplantation into non-diabetic recipients. **Lancet**, **3**: 1274-1276, 1983.

ALEXANDER, J.W. - High-risk donors: diabetics, the elderly and others. **Transplant. Proc.**, **24**: 2221-2222, 1992.

ANAISE, D.; YLAND, M.J.; ISHIMARU, M.; SHABTAI, M.; HURLEY, S.; WALTZER, W.C.; RAPAPORT, F.T. - Organ procurement from non heart-beating cadaver donors. **Transplant. Proc.**, **21**: 1211-1214, 1989.

ASCHER, N.L. - Selection criteria for liver transplantation donor. **Transplant. Proc.**, **21**: 3482-3483, 1989.

BARNARD, C.N. - A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. **S. Afr. Med. J.**, **41**: 1271-1276, 1967.

BASSI, M. & BERNELLI-ZAZZERA, A. - Ultrastructural cytoplasmic changes of livers cells after reversible and irreversible ischemia. **Exp. Mol. Pathol.**, **3**: 332-350, 1964.

BOOSTER, M.H.; WIJNEN, R.M.H.; MING, Y.; VROEMEN, J.P.A.M.; KOOTSTRA, G. - In situ perfusion of kidneys from non-heart-beating donors: the Maastricht Protocol. **Transplant. Proc.**, **25**: 1503-1504, 1993.

BUSUTTIL, R.W.; SHAKED, A.; MILLIS, J.M.; JURIM, O.; COLQUHOUN, S.D.; SHACKLETON, M.D.; NUESSE, B.J.; CSETE, M.; GOLDSTEIN, L.I.; McDIARMID, S.W. - One thousand liver transplants. The lesson learned. **Ann. Surg.**, **219**(5): 490-499, 1994.

CALNE, R.Y. & WILLIAMS R. - Liver transplantation in man. I. Observation on technique and organization in five cases. **Br. Med. J.**, **4**: 535, 1968.

CAPLAN, A.L. - Is xenografting morally wrong? **Transplant. Proc.**, **24**: 722-727, 1992.

CASAVILLA, A.; RAMIREZ, C.; SHAPIRO, R.; NGHIEM, D.; MIRACLE, K.; BRONSTHER, O.; RANDHAWA, P.; BROZNICK, B.; FUNG, J.J.; STARZL, T.E. - Experience with liver and kidney allografts from non-heart-beating donors. **Transplantation**, **59**: 197-203, 1995a.

CASAVILLA, A.M.; RAMIREZ, C.; SHAPIRO, R.; NGHIEM, D.; MIRACLE, K.; STARZL, T.E. - Liver and kidney transplantation from non-heart beating donors: the Pittsburgh experience. **Transplant. Proc.**, **27**: 710-712, 1995b.

COELHO, J.C.U.; FONTAN, R.S.; PEREIRA, J.C.; WIEDERKEHR, J.C.; CAMPOS, A.C.L.; ZENI NETO, C. - Doação de órgãos: opinião e conhecimento de médicos intensivistas da cidade de Curitiba. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, **40**: 36-38, 1994.

CONTRAN, R.S.; KUMAR, V. & ROBBINS, S.L. - Lesão e Adaptação Celulares. In: --- - **Patologia Estrutural e Funcional**. 4. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991. p. 1-13.

COTRIM, A.E.I.; PARDI, P.C.; SAKUMOTO, S.; SIMÕES, M.J. - Morfometria e estereologia. Algumas considerações gerais. **Acta Cir. Bras.**, **5(1)**: 28-30, 1990.

COUINAUD, C. - Plaidoyer pour une segmentation hepaticque exacte et une technique anatomique de resection réglée du foie. Le clampage partiel du pédicule hépatique. **Press Med**, **74**: 2849-2852, 1966.

DAEMEN, J.H.C.; DE WIT, R.J.; BRONKHORST, M.W.G.A.; YIN, M.; HEINEMAN, E.; KOOTSTRA, G. - Non-heart-beating donor program contributes 40% of kidneys for transplantation. **Transplant. Proc.**, **28**: 105-106, 1996.

D'ALESSANDRO, A.M.; HOFFMANN, R.M.; KNECHTLE, S.J.; ECKHOFF, D.E.; LOVE, R.B.; KALAYOGLU, M.; SOLLINGER, H.W.; BELZER, F.O. - Successful extrarenal transplantation from non-heart-beating donors. **Transplantation**, **59**: 977-982, 1995.

D'ALESSANDRO, A.M.; KALAYOGLU, M.; SOLLINGER, H.W.; HOFFMANN, R.M.; REED, A.; KNECHTLE, S.J.; PIRCH, J.D.; HAFEZ, G.R.; LORENTZEN, D.; BELZER, F.O. - The predictive value of donor liver biopsies for the development of primary nonfunction after orthotopic liver transplantation. **Transplantation**, **51**: 157-163, 1991.

ERICZON, B.G.; LUNDGREN, G.; WILCZEK, H.; GROTH, C.G. - Experience with human liver grafts obtained after donor cardiac standstill. **Transplant. Proc.**, **19**: 3862-3863, 1987.

FARBER, J.L.; CHIEN, K.R.; MITTNACHT, S. - The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. **Am. J. Pathol.**, **102**: 271-281, 1981.

FORNANDER, J.; BERGMARK, J.; JAGENBURG, R.; HASSELGREN, P.O. - Evaluation of an in vitro method for the study of hepatic protein synthesis in liver ischemia. **Eur. Surg. Res.**, **17**: 91-100, 1985.

FUJITA, T.; MATSUI, M.; YANAOKA, M.; SHINODA, M.; NAIDE, Y. - Clinical application of in situ renal cooling: experience with 61 cardiac-arrest donors. **Transplant. Proc.**, **21**: 1215-1217, 1989.

GÓMEZ, M.; ALVAREZ, J.; ARIAS, J.; BARRIO, R.; MUGÜERZA, J.; BALIBREA, J.L.; MARTÍN, F. - Cardiopulmonary bypass and profound hypothermia as a means for obtaining kidney grafts from irreversible cardiac arrest donors: cooling technique. **Transplant. Proc.**, **25**: 1501-1502, 1993.

HALL, P.; GORMLEY, B.M.; JARVIS, L.R.; SMITH, R.D. - A staining method for the detection and measurement of fat droplets in hepatic tissue. **Pathology**, **12**: 605-608, 1980.

HANNOUN, L.; BORIE, D.; DELVA, E.; JONES, D.; VAILLANT, J.C.; NORDLINGER, B.; PARC, R. - Liver resection with normothermic ischaemia exceeding 1 h. **Br. J. Surg.**, **80**: 1161-1165, 1993.

HASSELGREN, P.O.; BIBER, B.; FORNANDER, J. - Improved blood flow and protein synthesis in the post-ischemic liver following infusion of dopamine. **J. Surg. Res.**, **34**: 44-52, 1983.

HASUIKE, Y.; MONDEN, M.; VALDIVIA, L.A.; KUBOTA, N.; GOTOH, M.; NAKANO, Y.; OKAMURA, J.; MORI, T. - A simple method for orthotopic liver transplantatin with arterial reconstruction in rats. **Transplantation**, **45**: 830-832, 1988.

HOLPER, K.; OLGAY, I.; KITAHAMA, A. - Effect of ischemia on hepatic parenchymal and reticuloendothelial function in the baboon. **Surgery**, **76**: 423-432, 1974.

HUGUET, C.; GRAVELLI, A.; CHIECO, P.A.; BONA, S.; HARB, J.; JOSEPH, J.M.; JOBARD, J.; GRAMAGLIA, M. - Liver ischemia for hepatic resection: where is the limit? **Surgery**, **11**: 251-259, 1992.

IKEDA T.; YANAGA, K.; KISHIKAWA, K.; KAKIZOE,S.; SHIMADA, M.; SUGIMASHI, K. - Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. **Hepatology**, **16**: 454-461, 1992.

KAMADA,N. & CALNE, R.Y. - Orthotopic liver transplantation in the rat. **Transplantation**, **28**: 47-50, 1979.

KAMADA, N.; SUMIMOTO, R.; KANEDA, K. - The value of hepatic artery reconstruction as a technique in rat liver transplantation. **Surgery**, **111**: 195-200, 1992.

KARAYALÇIN, K.; MIRZA, D.F.; HARRISON, R.F.; SILVA, R.F.; HUBSCHER, S.G.; MAYER, A.D.; BUCKELS, J.A.C.; McMASTER, P. - The role of dynamic and morfological studies in the assesment of potential liver donnors. **Transplantation**, **57**:1323-1327, 1994.

KOZAKI, M.; MATSUNO, N.; TAMAKI, T.; TANAKI, M.; KONO, K.; ITO, H.; UCHIYAMA, M.; TAMAKY, I.; SAKURAI, E. - Procurement of kidney grafts from non-heart-beating donors. **Transplant. Proc.**, **23**: 2575-2578, 1991.

KRON, I.L.; TRIBBLE, C.G.; KERN, J.A.; DANIEL, T.M.; ROSE, C.E.; TRUWIT, J.D.; BLACKBOURNE, L.H.; BERGIN, J.D. - Successful transplantation of marginally acceptable thoracic organs. **Ann. Surg.**, **217**: 518-524, 1993.

LaBRECQUE, D. - Liver regeneration a picture emerges from the puzzle. **Am. J. Gastroenterol.**, **89**: S86-96, 1994.

LEE, S.; CHARTERS, A.C.; CHANDLER, J.C.; ORLOFF, M.J. - A technique for orthotopic liver transplantation in the rat. - **Transplantation**, **16**: 664-669, 1973.

LEE, S.; CHARTERS III, A.C.; ORLOFF, M.J. - Simplified technic for orthotopic liver transplantation in the rat. **Am. J. Surg.**, **130**: 38-40, 1975.

LEVENSON, H.; GREENSITE, F.; HOEFS, J.; FRILOUX, L.; APPLGATE, G.; SILVA, E.; KANEL, G.; BUXTON, R. - Fatty infiltration of the liver: quantification with phase-contrast MR imaging at 1.5 vs biopsy. **AJR**, **156**: 307-312, 1991.

MARNI, A. & FERRERO, M.E. - A four-technique comparative study of orthotopic liver transplantation in the rat. **Am. J. Surg.**, **156**: 209-213, 1988.

MATSUNO, N.; KOZAKI, M.; SAKURAI, E.; UCHIYAMA, M.; IWAHORI, T.; KOZAKI, K.; KONO, K.; TANAKA, M.; TAMAKI, T.; TAMAKI, I. - Effect of combination in situ cooling and machine perfusion preservation on non-heart-beating donor kidney procurement. **Transplant. Proc.**, **25**: 1516-1517, 1993.

MILANO, A.; LIVI, U.; CASULA, R.; BORTOLOTTI, U.; GAMBINO, A.; ZENATI, M.; VALENTE, M.; ANGELINI, A.; THIENE, G.; CASAROTTO, D. - Influence of marginal donors on early results after heart transplantation. **Transplant. Proc.**, **25**: 3158-3159, 1993.

MIYATA, M.; FISCHER, J.H.; FUHS, M.; ISSELHARD, W.; KASAY, Y. - A simple method for orthotopic liver transplantation in the rat. **Transplantation**, **30**: 335-338, 1980

MOMII, S. & KOGA, A. - Time-related morphological changes in cold-stored rat livers. - **Transplantation**, **50**: 745-750, 1990.

MOR, E.; KLINTMALM, G.B.; GONWA, T.A.; SOLOMON, H.; HOLMAN, M.J.; GIBBS, J.F.; WATENBERG, L. GOLDSTEIN, R.H.; HUSBERG, Bo. S. - The use of marginal donors for liver transplantation - a retrospective study of 365 liver donors. **Transplantation**, **53**: 383-386, 1992.

MORPUGO, E.; RIGOTTI, P.; ANCONA, E. - Is warm ischemia the main limiting factor in the use of non-heart-beating donors in renal transplantation? **Transplant. Proc.**, **25**: 1509-1510, 1993a.

MORPUGO, E.; RIGOTTI, P.; CAPALBO, M.; BALDAN, N.; PITTONI, G.; VALENTE, M.L.; BINDOLI, A.; ANCONA, E. - Transplantation of warm ischemia damage kidneys: an experimental study in pigs. **Ren. Fail.**, **15**: 581-585, 1993b.

MUDGE, G.H. & WEINER, I.M. - Fármacos que afetam o volume e a composição dos líquidos corporais. In: GOODMAN, L.S. & GUILMAN, A.G. - **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991. p. 565-570.

NEUHAUS, P.; BRÖLSCH, C.; RINGE, B.; LAUCHART, W.; PICHLMAYR, R. - Experience with combined donor nephrectomy and hepatectomy. **Transplant. Proc.**, **16**: 235-237, 1984.

NORDLINGER, B.; DOUVIN, D.; JAVAUDIN, L. - An experimental study of survival after two hours of normothermic hepatic ischemia. **Surg. Gynecol. Obstet.**, **150**: 859-864, 1980.

OKOUCHI, Y.; SASAKI, K.; TAMAKI, T. - Ultrastructural changes in hepatocytes, sinusoidal endothelial cells and macrophages in hypothermic preservation of the rat liver with University of Wisconsin solution. **Virchows Archiv**, **424**: 477-484, 1994.

PETERSEN, K.F.; WEST, A.B.; REUBEN, A.; ROTHMAN, D.L.; SHULMAN, G.I. - Noninvasive assessment of hepatic triglyceride content in humans with ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Hepatology**, **24**: 114-117, 1996.

POST, J.; MILLER, C.M.; SCHWARTZ, M.E.; KADIAN, M. - Is it safe to liberalize donor criteria to include those over age 60 and those weighing over 90 Kg? **Transplant. Proc.**, **25**: 1570, 1993.

PRINGLE, J.H. - Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. **Ann. Surg.**, **48**: 541-549, 1908.

RASO P. & BOGLIOLO, L. - Fígado e Vias Biliares. In : BOGLIOLO, L. - **Patologia**. 4. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1987. p. 546-571.

RAPAPORT, F.T. & ANAISE, D. - Technical aspects of organ procurement from the non-heart-beating cadaver donor for clinical transplantation. **Transplant. Proc.**, **25**: 1507-1508, 1993.

STARZL, T.E.; GROTH, C.G.; BRETTSCHEIDER, L. - Orthotopic homotransplantation of human liver. **Ann. Surg.**, **168**: 392-415, 1968.

STARZL, T.E.; MARCHIORO, T.L.; VON KAULLA, K.N. - Homotransplantation of liver in humans. **Surg. Gynecol. Obstet.**, **117**: 659, 1963.

STARZL, T.E.; MILLER, C.; BROZNICK, B.; MAKOWKA, L. - An improved technique for multiple organ harvesting. **Surg. Gynecol. Obstet.**, **165**: 343-348, 1987.

STEFFEN, R.; FERGUSON, D.M.; KROM, R.A.F. - A new method for rat liver transplantation with arterial cuff anastomosis to the recipient common hepatic artery. **Transplantation**, **48**: 166-168, 1989.

- SUNDBERG, R.; ALUMETS, J.; AR'RAJAB, A.; AHRÉN, B.; BENGMARK, S. - Ultrastructure in liver preservation with Eurocollins an UW solutions. **Transplant. Proc.**, **22**: 176-179, 1990.
- TAFURI, W.L. - Alterações Morfofuncionais da Estrutura Celular. Regenerações. Morte Celular. Alterações do interstício. In: BOGLIOLO, L. - **Patologia**. 4 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1987. p.14-25.
- THIEL, D.H.V.; SCHADE, R.R.; HAKALA, T.R.; STARZL, T.E.; DENNY, D. - Liver procurement for orthotopic transplantation: an anlysis of the Pittsburgh experience. **Hepatology**, **4**: 66-71, 1984.
- TOLLE, S.W.; BENNETT, W.M.; HICKAM, D.H.; BENSON, J.A. - Responsibilities of a primary physicians in organ donation. **Ann. Intern. Med.**, **106**: 740-744, 1987.
- VARTY, K.; VEITCH, P.S.; MORGAN, J.D.T.; KEHINDE, E.O.; DONNELLY, P.K.; BELL, P.R.F. - Response to organ shortage: kidney retrieval programme using non-heart beating donors. **BMJ**, **308**: 575, 1994.
- VIDAL, B.C.; PLANDING, W.; MELLO, M.L.; SCHENCK, U. - Quantitative evaluation of AgNOR in liver cells by high-resolution image cytometry. **Anal. Cell. Pathol.**, **7**: 27-41, 1994.
- VLIET, J.A.V.D.; TIDOW, G.; KOOTSTRA, G.; SAENE, H.F.K.V.; KROM, R.A.F.; SLOOFF, M.J.H.; WEENING, J.J.; TEGZESS, A.M.; MEIJER, S.; BOVEN, P.L.V. - Transplantation of contaminated organs. **Br. J. Surg.**, **67**: 596-598, 1980.
- XU, H.; WANG, D.; PACE, R.C.; JONES, R.S. - Beneficial effects of prewarming the donor liver for rat liver transplantation. **Am. J. Surg.**, **163**: 164-168, 1992.

WALLER, J.A.; HAISCH, C.E.; SKELLY, J.M.; GOLDBERG, C.G. - Potential availability of transplantable organs and tissues in fatalities from injury and nontraumatic intracranial hemorrhage. **Transplantation**, **55**: 542-546, 1993.

YANAGA, K.; KAKIZOE, S.; IKEDA, T.; PODESTA, L.G.; DEMETRIS, A.J.; STARZL, T.E. - Procurement of liver allografts from non-heart beating donors. **Transplant. Proc.**, **22**: 275-278, 1990.

YOKOYAMA, I.; TZAKIS, A.G.; IMVENTARZA, O.; TODDO, T.; CASAVILLA, A.; LEGGIO, A.; STARZL, T.E. - Pediatric liver transplantation from neonatal donors. **Transpl. Int.** **5**: 205-208, 1992.