



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL

JERÔNIMO DE AZEVEDO E SÁ JÚNIOR

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE SOLUÇÃO À BASE DE ÁGUA DE
COCO NA PRESERVAÇÃO DE TECIDOS VASCULARES

FORTALEZA – CEARÁ

2018

JERÔNIMO DE AZEVEDO E SÁ JÚNIOR

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE SOLUÇÃO À BASE DE ÁGUA DE COCO
NA PRESERVAÇÃO DE TECIDOS VASCULARES

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ivelise Regina Brasil

FORTALEZA – CEARÁ

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Sá Júnior, Jerônimo Azevedo e .

Desenvolvimento e validação de solução à base de água de coco na preservação de tecidos vasculares [recurso eletrônico] / Jerônimo Azevedo e Sá Júnior. - 2018.

1 CD-ROM: il.; 4 ¾ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 68 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Dissertação (mestrado profissional) – Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Fortaleza, 2018.

Área de concentração: Transplantes, Biotecnologia..
Orientação: Prof.ª Dra. Ivelise Regina Canito Brasil.

1. Transplante. . 2. Preservação de órgão. . 3. Enxerto Vascular. . I. Título.

JERÔNIMO DE AZEVEDO E SÁ JUNIOR

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE SOLUÇÃO À BASE DE ÁGUA DE COCO
NA PRESERVAÇÃO DE TECIDOS VASCULARES

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: 13 de junho de 2018.

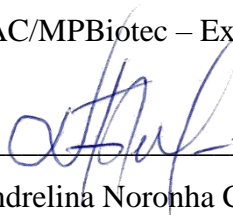
BANCA EXAMINADORA



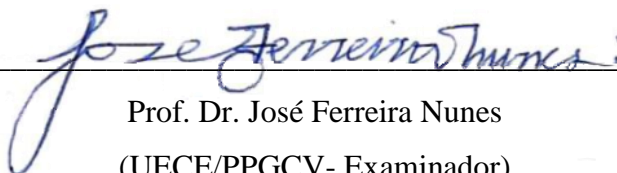
Prof.^a Dr.^a Ivelise Regina Brasil
(UECE/MPBiotec – Presidente)



Prof.^a Dr.^a Cristiane Clemente de Mello Salgueiro
(CESMAC/MPBiotec – Examinadora)



Prof.^a Dr.^a Andreлина Noronha Coelho de Souza
(UECE/PPGCF – Examinadora)



Prof. Dr. José Ferreira Nunes
(UECE/PPGCV- Examinador)

AGRADECIMENTOS

Nada seria possível sem a intuição e o interesse científico do Prof. **José Ferreira Nunes**, que há várias décadas vem desenvolvendo trabalhos de pesquisa na busca do aprimoramento do produto ora apresentado. Seu empenho acadêmico também encontra lugar na criação e manutenção do RENORBIO, centro de pesquisa e estudos em Biotecnologia e formação de mestres e doutores.

A elaboração da tese acadêmica e todo o incentivo para a empreitada deveu-se a Prof^ª. **Ivelise Regina Canito Brasil**, orientadora e mentora, conduzindo com serenidade e experiência os ditames do trabalho.

Compondo a banca e trazendo importante colaboração ao longo da preparação, seja nas aulas ministradas, seja na orientação das diretrizes da dissertação, a Prof^ª. **Cristiane Salgueiro de Melo** foi peça fundamental em todo processo.

Abrindo as portas do laboratório para a pesquisa, emprestando vasta experiência com conselhos e orientações, a Dra **Andreлина Noronha** colaborou de forma decisiva para o sucesso do trabalho.

Foi essencial na nossa formação a excelência do corpo docente, ao longo de dois anos emprestando o seu saber e sua expertise profissional e acadêmica na criação de ambiente favorável ao conhecimento, e gerando curiosidade na busca por novos descobrimentos.

O Dr **João Paulo Uchoa Fontenele**, patologista do Laboratório Argos, trabalhou com competência e dinamismo, com interesse e disposição para contribuir decididamente com importantes resultados e conclusões do projeto.

Incansável o trabalho da fisioterapeuta **Rutyleia Alves**, atuando na pesquisa, na bibliografia, com opiniões, com sua vivência de mestre e doutoranda, e com habilidade invejável contribuindo de forma inestimável na elaboração e desenvolvimento do trabalho de pesquisa.

Os acadêmicos de medicina, alunos de iniciação científica, sempre disponíveis para ajudar na pesquisa e nos levantamentos de artigos, **Lucas Medeiros Lopes e Antonio Higor Marques Aragão**.

A coordenação e organização das aulas, tarefas, atividades e toda logística para o andamento de todo o curso foi da competente **Celina Pinheiro**, trabalhando com equidade e colaboradores, recebe aqui também o nosso reconhecimento.

Por fim, mas não menos importante, todos os que contribuíram, direta ou indiretamente para a materialização desse tão desejado objetivo, como colegas de sala de aula, funcionários, amigos

e familiares que, simplesmente acompanharam e compartilharam momentos de angústia, dúvidas, incertezas, agora se comprazem com a alegria do cumprimento de mais uma etapa.

"É graça divina começar bem. Graça maior é persistir na caminhada certa. Mas a graça das graças é não desistir nunca."

(Dom Hélder Câmara)

"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê."

(Arthur Schopenhauer)

"A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos."

(Marcel Proust)

RESUMO

A conservação ou preservação de tecido durante transplante de órgãos tem sido um desafio ao longo da história. Os mais variados produtos e soluções e diferentes técnicas já foram estudadas e propostas para contornar este problema, com distintos resultados relacionados a eficácia e ao tempo da conservação dos tecidos. Artérias e veias recebem atenção especial devido a importância como substitutos em transplantes de órgãos, e na patologia obstrutiva arterial periférica descompensada. O objetivo do estudo foi testar e comparar a Solução de Água de Coco em Pó com uma solução padronizada, e de uso já consagrado, no entanto de custo elevado, a Solução de Belzer, desenvolvida na Universidade de Wisconsin. Para isso, foram coletados nove vasos de doadores cadáver, investigada a contratilidade muscular através de estudo de fisiologia e a morfologia celular em exame histológico, em análises desde o primeiro até o vigésimo oitavo dia, utilizando a solução pesquisada e comparando os resultados com o controle. Os resultados mostraram equivalência da capacidade de conservação entre as duas soluções até o sétimo dia nas análises histológicas e até o décimo quarto dia no estudo fisiológico da contratilidade muscular. Conclui-se pela confirmação da viabilidade do tecido vascular quando conservado em solução a base de água de coco nas mesmas condições do uso da solução padrão de Belzer.

Palavras-chave: Transplante. Preservação de órgão. Enxerto Vascular.

ABSTRACT

The preservation of tissue during transplantation of organs has been a challenge throughout history. The most varied products and solutions and different techniques have already been studied and proposed to overcome this problem, with different results related to the effectiveness and the time of the conservation of the tissues. Arteries and veins receive special attention due to their importance as substitutes in organ transplantation, and in complicated peripheral arterial obstructive pathology. The objective of the study was to test and compare the powdered coconut water solution with a standardized solution, and of already recognized use, however of high cost, the Belzer solution, developed at the University of Wisconsin. For this, nine vessels of cadaveric donors were collected, muscle contractility was investigated through a physiology study and cell morphology on histological examination, in analyzes from the first to the twenty-eighth day, using the researched solution and comparing the results with the control . The results showed equivalence of the storage capacity between the two solutions until the seventh day in the histological analyzes and until the fourteenth day in the physiological study of muscle contractility. It is concluded by the confirmation of the viability of the vascular tissue when stored in a solution of coconut water under the same conditions as the standard Belzer solution.

Keywords: Transplant. Organ preservation solutions. Vascular grafting.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Camadas dos vasos sanguíneos.....	19
Figura 2 –	Acoplamento excitação-contração no músculo liso	25
Figura 3 –	Resumo do mecanismo de contração da célula lisa muscular.....	27
Figura 4 –	Relaxamento do músculo liso	28
Figura 5 –	Resumo do mecanismo de relaxamento da célula lisa muscular	29
Figura 6 –	Setup de contração muscular (desenho esquemático 1)	42
Figura 7 –	Setup de contração muscular (desenho esquemático 2)	42
Figura 8 –	Figura representativa do protocolo experimental	44
Figura 9 –	Representação da anatomia da a. aorta e ramos mesentéricos	46
Figura 10 –	Distribuição do peso das amostras de AMS humana preservadas em solução ACP ou UW	49
Figura 11 –	Distribuição do diâmetro das amostras de AMS humana preservadas em solução ACP ou UW	49
Figura 12 –	Resposta da AMS preservada em solução ACP ou UW durante 28 dias ao estímulo eletromecânico por 60 mM de K⁺ (relatividade pelo peso da amostra)	50
Figura 13 –	Resposta da AMS preservada em solução ACP ou UW durante 28 dias ao estímulo eletromecânico por 60 mM de K⁺ (relatividade pelo diâmetro da amostra)	51
Figura 14 –	Resposta da AMS preservada em solução ACP ou UW durante 28 dias ao estímulo farmacomecânico por 60 mM de K⁺ (relatividade pelo peso da amostra)	52
Figura 15 –	Resposta da AMS preservada em solução ACP ou UW durante 28 dias ao estímulo eletromecânico por 60 mM de K⁺ (relatividade pelo diâmetro da amostra)	52
Figura 16 –	Verificação da integridade do endotélio em AMS preservado em solução ACP ou UW durante 28 dias	53
Figura 17 -	Análise morfológica de AMS preservada em solução ACP ou UW durante 28 dias.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Ca ²⁺] _i	Concentração intracelular de cálcio
AC	Água de coco
ACH	Acetilcolina
ACP	Água de coco em pó
ADP	Difosfato de adenosina
AMPc	Monofosfato de adenosina
AMS	Artéria mesentérica superior
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca ²⁺	Íons Calcio
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CaM	Calmodulina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DAG	Diacilglicerol
DAOP	Doença arterial obstrutiva periférica
E.P.M.	Erro padrão da média
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FDA	Food and Drug Administration
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
HCl	Ácido Clorídrico
HE	Hematoxilina-eosina
HES	Amido hidroxietílico
HGF	Hospital Geral de Fortaleza
HTK	Histidina-Triptofano-Ketoglutarato
IP3	Trifosfato de inositol
K60	Concentração de 60 mM de potássio
KCl	Cloreto de Potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio monobásico
KHB	Solução de Krebs Henseleit Buffer
LAFIEX	Laboratório de Fisiologia Experimental
M	Molar

MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de Magnésio Heptahidratado
MLCK	Quinase da cadeia leve da miosina
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NE	Norepinefrina
NO	Óxido nítrico
PSS	Solução salina fisiológica
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SERCA	Cálcio-ATPase do retículo sarcoplasmático
SESA	Secretaria de Saúde do Estado do Ceará
SPS-1	Static Preservation Solution SPS-1
UECE	Universidade Estadual de Ceará
UHT	Ultra high temperature
uM	Micromolar
UW	Solução da Universidade de Wisconsin/Solução de Belzer

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	HISTÓRICO SOBRE TRANSPLANTES	15
2.2	HOMOENXERTOS	16
2.3	MORFOLOGIA DA PAREDE DE TECIDOS VASCULARES	17
2.4	FISIOLOGIA DO MÚSCULO LISO VASCULAR	19
2.5	SOLUÇÕES DE PRESERVAÇÃO DE ÓRGÃOS E MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE TECIDOS VASCULARES	27
2.6	USO DA ÁGUA DE COCO NA PRESERVAÇÃO DE CÉLULAS, TECIDOS E ÓRGÃOS	31
3	OBJETIVOS	36
3.1	GERAL.....	36
3.2	ESPECÍFICOS	36
4	METODOLOGIA	37
4.1	TIPO DE ESTUDO	37
4.2	LOCAL	37
4.3	AMOSTRA	37
4.4	ANÁLISE DA CONTRATILIDADE MUSCULAR.....	37
4.5	ANÁLISE HISTOLÓGICA	41
4.6	COLETA DE DADOS	42
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4.8	ASPECTOS ÉTICOS.....	45
5	RESULTADOS	46
6	DISCUSSÃO	55
7	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXO	65
	ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	66

1 INTRODUÇÃO

Há vários séculos o homem vem tentando a realização de transplantes de diferentes órgãos como forma de contornar problemas sérios de saúde. Porém, somente a partir do século XX a história dos transplantes ganhou expressivos avanços. No início do século surgiram os primeiros casos bem sucedidos de transplantes de pele para queimaduras, córnea e sangue, este último impulsionado pelas necessidades decorrentes da primeira grande guerra (1914-1918). Na segunda metade do século teve grande impulso a pesquisa sobre transplante de órgãos sólidos e não regeneráveis, como rins, fígado, pâncreas, coração e pulmão (CHAIB; ELEAZAR, 2000).

Com o aperfeiçoamento da técnica, o surgimento de imunossupressores, o melhor conhecimento da anatomia dos órgãos, a implantação de protocolos com normas mais rígidas, a cirurgia foi passando da condição de experimental e se consolidando como alternativa viável e salvadora de muitas vidas. Estima-se que existam em todo o mundo aproximadamente 300 mil casos de portadores de insuficiência hepática. Somente nos Estados Unidos são 120 mil pacientes aguardando na fila de transplantes de órgãos, dos quais cerca de 10% acabam morrendo na fila antes de serem operados (BEIJERT *et al.*, 2018).

No entanto, dificuldades técnicas com artérias e veias, muitas vezes detectadas no intra-operatório, como vasos hipotrofiados, atresícos, aneurismáticos, curtos, estenosados, persistem desafiadoras para o cirurgião até os dias de hoje. Starz *et al.* (1979), pioneiros nos transplantes hepáticos, já alertavam para a importância da preservação de enxertos vasculares como medida salvadora para situações inesperadas, só detectadas no intra-operatório, proporcionando comprimento adicional de vasos para o órgão receptor. Desde então vem sendo ressaltada a importância na preservação da função desses enxertos, e várias soluções e diferentes técnicas vêm sendo desenvolvidas com esta finalidade (VIVARELLI *et al.*, 2004). Na cirurgia vascular arterial periférica, a preservação de tecido vascular, principalmente de veias, tem sua utilidade nos casos de doença arterial obstrutiva periférica (DAOP), descartada a possibilidade de revascularização através de técnica endovascular, além da impossibilidade do uso da safena autóloga, principal substituto nesses casos, quando esta estiver ausente, em casos de cirurgia prévia, fibrosada, traumatizada ou dilatada por doença varicosa.

Os produtos utilizados na preservação de órgãos são todos importados dos Estados Unidos e Europa, constituindo-se em fator de custo considerável nos transplantes. Em função disso, pesquisadores vem procurando desenvolver um produto que seja capaz de reproduzir as

características das soluções de conservação já existentes, e que seja ao mesmo tempo de baixo custo. Busca-se, desta forma, além de reduzir o custo com a importação, viabilizar um bioproduto a base de água de coco em pó para a preservação de células, tecidos e órgãos, definindo a eficácia desta solução obtida e elaborada pela empresa ACP-Biotecnologia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO SOBRE TRANSPLANTES

O primeiro transplante ortotópico de fígado em humanos foi realizado no ano de 1963 em Denver, Estados Unidos, por Thomas Starz, em um garoto de três anos de idade com atresia de vias biliares. Nos quatro anos seguintes, o pesquisador realizou outras sete cirurgias, não obtendo sucesso em nenhuma delas, pois a maior sobrevida alcançada foi de 23 dias. Outros centros pioneiros também referiram insucessos (CHAIB; ELEAZAR, 2000).

Somente no ano de 1967, Starzl obteve a primeira sobrevida de longo prazo; em uma garota de um ano e sete meses de idade, portadora de câncer primário de fígado (colangiocarcinoma). A paciente faleceu por recidiva do tumor somente quase dois anos após (STARZL, 1996).

Na Europa, o primeiro transplante de fígado foi realizado em 1969, em Cambridge (Inglaterra), por Sir Roy Calne, também bem sucedido, pois o paciente morreu apenas no ano de 1976 de causa não relacionada à cirurgia. No Brasil, o primeiro transplante de fígado foi realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no final da década de 60, por Marcel Machado e sua equipe (MACHADO *et al.*, 1970).

No nosso estado o primeiro transplante renal intervivos aconteceu em 17 de agosto de 1977, no Hospital Universitário Walter Cantídio. Foi o primeiro transplante de rim do norte e nordeste com doador vivo. A equipe era liderada pelos médicos Roberto Barreto Marques e Antônio Lacerda Machado, era composta pelos médicos João Evangelista Bezerra Filho, Antônio Borges Campos, Emanuel de Carvalho Melo, João Martins de Sousa Torres, Ailson Gurgel e Sérgio Juaçaba. O primeiro transplante de fígado do Ceará aconteceu no dia 18 de maio de 2002, no Hospital Universitário Walter Cantídio, sob responsabilidade do Dr. Huygens Garcia. O Hospital Geral de Fortaleza realizou seu primeiro transplante hepático em 11 de dezembro de 2009 e foi chefiado pela cirurgiã Ivelise Brasil e pelo cirurgião Romero de Matos Esmeraldo.

2.2 HOMOENXERTOS

Homoenxertos, arteriais ou venosos, são usados nas reconstruções vasculares em cirurgia de transplante de fígado (MARTINEZ *et al.*, 1999). Alguns autores destacaram a importância de seu uso em situações onde a artéria hepática do órgão receptor está severamente doente ou desenvolveu aneurisma/pseudoaneurisma, só identificado no intra-operatório, ou quando os vasos do doador cadáver não estiverem disponíveis (SELLERS *et al.*, 2002).

Nos transplantes hepáticos, a trombose da veia porta ou artéria hepática são indicações para esses homoenxertos, nas estenoses de artéria renal nos transplantes renais, nos casos de hipoplasia de veia porta, comuns em transplantes hepáticos pediátricos onde é comum a associação de atresia de vias biliares e má-formações vasculares (SELLERS *et al.*, 2002).

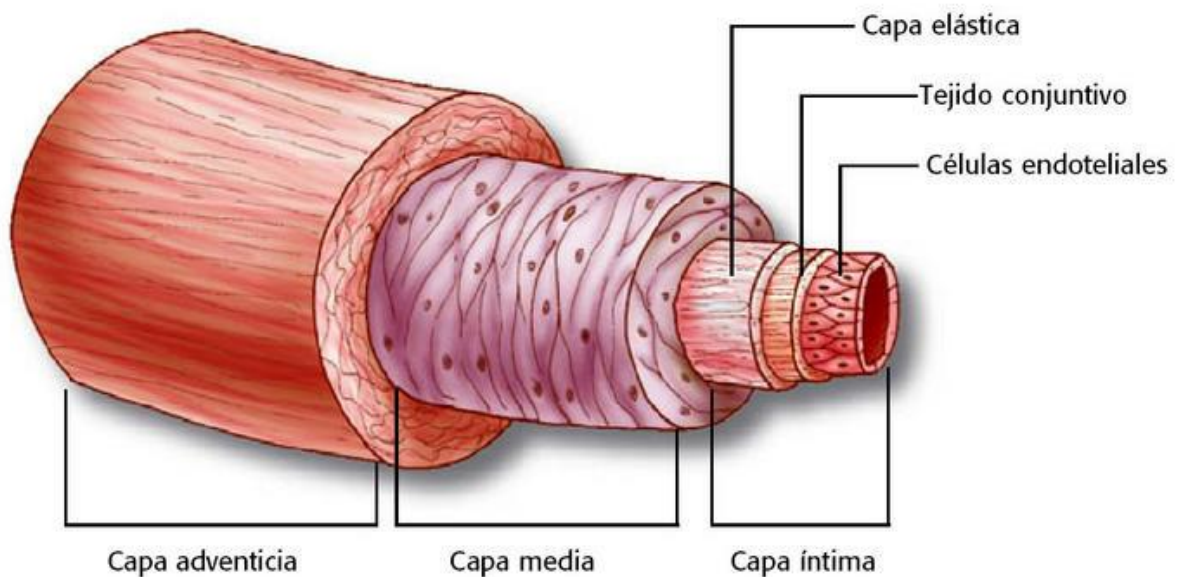
Além dos transplantes, vale registrar a sua utilidade nos casos de tumores de pâncreas invadindo a veia cava, bem como nas lesões originadas na própria veia, onde sua correção requer a retirada de segmento venoso. Homoenxertos venosos também são úteis na doença arterial periférica, durante a cirurgia de revascularização, não estando disponível a veia safena autóloga, seja por ressecção prévia, fibrose extensa da veia ou doença varicosa acentuada pré-existente (SELLERS *et al.*, 2002).

Sua aplicabilidade se dá para os casos de complicações em cirurgias de transplantes de fígado na presença de aneurisma/pseudoaneurisma de artéria hepática (SELLERS *et al.*, 2002), nas trombozes e nas hipoplasias de veia porta e de artéria hepática (STARZL *et al.*, 1996), nos transplantes renais nas estenoses de artéria renal, nos transplantes hepáticos pediátricos, muito frequentes por anomalias arteriais e atresias biliares. Nesse último caso, eles tem sido utilizados como enxerto de veia cava preservada em receptores com atresia biliar e agenesia de veia cava (SNIRIVASAN *et al.*, 2001).

2.3 MORFOLOGIA DA PAREDE DE TECIDOS VASCULARES

Os vasos sanguíneos são formados pelas seguintes camadas ou túnicas: endotélio, a camada muscular média e a adventícia (Figura 1). Essa configuração é mais marcante e mais definida nas artérias.

Figura 1 - Camadas dos vasos sanguíneos



Fonte: <https://userscontent2.emaze.com>

A túnica média é formada por células musculares lisas dispostas de forma helicoidal e entre elas existe a matriz extracelular composta de fibras elásticas e colágeno tipo III, proteoglicanos e glicoproteínas. A camada mais externa, adventícia, de tecido conjuntivo, é rica em colágeno tipo I e fibras elásticas, que fornecem a resistência ao estiramento da parede do vaso. O tecido conjuntivo frouxo se continua com o mesmo tecido do órgão onde o vaso está inserido. Também possui fibras colágenas e elásticas e proteoglicanos. Esta camada possui o *vasa vasorum*, responsável pela difusão de nutrientes a partir do meio extravascular, o *nervi vasorum* e capilares linfáticos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

O endotélio, ou camada ou túnica íntima, está separado da camada média pela lâmina elástica interna nas artérias. É composta de elastina e apresenta fenestras que são as responsáveis pela difusão de componentes para a nutrição das camadas mais profundas. O endotélio é tecido altamente diferenciado e é o responsável pela mediação de trocas entre os elementos do sangue e os tecidos. É no endotélio onde são produzidos e liberados alguns fatores

responsáveis pela vasoconstrição e vasorelaxamento, como a endotelina e o óxido nítrico. A túnica íntima é composta pelas células endoteliais e camada subendotelial na superfície luminal da lâmina elástica interna. A matriz subendotelial contém as células musculares lisas que também estão presentes na túnica média, juntamente com a elastina. A elastina contém em suas fenestras fibras colágeno, finas camadas de proteoglicanos e as células musculares lisas. A elastina funciona como um reservatório elástico, é distensível e tem pouca força de tensão. A força de tensão está relacionada diretamente ao número de unidades de lamelas (ou fenestras) na parede do vaso, sendo mais numerosas nos vasos maiores e mais proximais em relação ao coração (JESSICA EW e ROBERT PM, 2009).

A célula muscular lisa vascular é altamente especializada e suas principais funções são contração e regulação do tônus dos vasos sanguíneos, pressão arterial e distribuição do fluxo sanguíneo. Exibem aparência muscular com até 75% do seu citoplasma contendo filamentos contráteis (EVA MR *et al*, 2007) (MARCEL PD *et al*, 2018).

A túnica adventícia é a porção mais externa à lâmina elástica externa e é rica em colágeno, responsável pela contenção do vaso nos casos de elevadas pressões intravasculares (JESSICA EW e ROBERT PM, 2009).

Do ponto de vista histológico, os diversos tipos de artérias e veias se distinguem umas das outras pela espessura de sua parede e pelas diferenças na composição das camadas. O endotélio está formado por uma capa contínua de células endoteliais planas, alargadas e de forma poligonal que se alinham com outras na direção do fluxo sanguíneo. O núcleo do miócito é central, alongado, o citoplasma perinuclear contém retículo endoplasmático rugoso, ribossomas livres, complexo de Golgi, retículo endoplasmático liso, mitocôndrias e glicogênio. A disposição dos feixes de filamentos contráteis em diferentes planos faz com que as células não apresentem estriações, por isso a denominação de músculo liso. A contração desse músculo é involuntária e lenta, controlada pelo sistema nervoso autônomo (ROSS e PAWLINA, 2016).

Entende-se por Necrofanerose o aparecimento das características morfológicas da necrose no tecido, como a picnose nuclear e eosinofilia do citoplasma. A necrose é o evento fisiológico da parada de funcionamento da célula como máquina organizada. São as modificações estruturais da célula, tecido ou órgão. Podem ser observadas por método direto, com pouco acurácia, ou por microscopia óptica e eletrônica (NECROSE, 2018).

2.4 FISIOLOGIA DO MÚSCULO LISO VASCULAR

O músculo liso é composto de fibras com diâmetros que variam de 1 a 5 micrômetros e comprimentos de 20 a 500 micrômetros, bem menores que as fibras do músculo esquelético, e assim como estas o músculo liso também contém filamentos de actina e miosina, com características químicas semelhantes. O processo contrátil é ativado por íons cálcio e o trifosfato de adenosina (ATP) é degradado a difosfato de adenosina (ADP) para fornecer energia para contração.

O estímulo inicial para a contração é um aumento intracelular dos íons cálcio, e isso pode acontecer por estimulação nervosa da fibra muscular lisa, estimulação hormonal, estiramento ou alteração química no ambiente da fibra, ou seja, por alteração da voltagem do meio ou por estímulo de transmissor, que pode ser endógeno ou exógeno (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

A maioria dos músculos esqueléticos se contrai e relaxa rapidamente enquanto que a maior parte da contração do músculo liso é tônica e prolongada, durando horas ou até mesmo dias. Diferentemente das vesículas das junções musculares esqueléticas, que sempre contém acetilcolina, as vesículas das terminações das fibras nervosas autônomas contém acetilcolina em algumas fibras e norepinefrina em outras, assim como outras substâncias (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

Quando a acetilcolina excita uma fibra muscular, a norepinefrina a inibe, observando-se o contrário da ação quando da inibição da fibra pela acetilcolina a norepinefrina passa a ser agente excitatório. As arteríolas, metarteríolas e os esfíncteres pré-capilares têm pouca ou nenhuma inervação, mas ainda assim o músculo liso é muito contrátil, respondendo rapidamente a alterações nas condições químicas locais no líquido intersticial (GUYTON, 2004).

No estado de repouso os pequenos vasos sanguíneos permanecem contraídos. Quando é necessário fluxo adicional de sangue para os tecidos, vários fatores podem contribuir para o relaxamento muscular, vasodilatação e aumento do fluxo, é o chamado controle de fluxo local por *feedback*, e os mais comuns são os que se seguem: a falta de oxigênio tecidual causa relaxamento do músculo liso e dilatação, o excesso de dióxido de carbono também causa dilatação e o aumento da concentração de íons hidrogênio (BERNE; LEVY, 2009).

Além desses, outros fatores também podem causar vasodilatação local: adenosina, ácido láctico, diminuição da concentração de cálcio e aumento da temperatura corporal. Hormônios

também podem causar relaxamento ou dilatação muscular desde que a membrana da célula muscular contenha receptores excitatórios ou inibitórios controlados por hormônios (BERNE; LEVY, 2009).

Além da acetilcolina e da norepinefrina já citados, outros são a epinefrina, angiotensina, endotelina, vasopressina, oxitocina, serotonina e histamina. A norepinefrina é potente estimulador da contração do músculo liso nos vasos sanguíneos. Alguns receptores hormonais de membrana abrem canais para íons cálcio ou sódio e em consequência despolarizam a membrana permitindo a entrada desses íons para o interior da célula, promovendo contração muscular. Ao contrário, quando hormônios ou outras substâncias inibem a entrada de íons positivos, ou quando os canais de potássio, normalmente fechados, são abertos, e isso promove a saída desses íons positivos, levando a um quadro de hiperpolarização, a contração muscular é inibida (BERNE; LEVY, 2009).

O cálcio é fundamental na fisiologia da contração. Quando neurotransmissores estimuladores, hormônios ou fármacos se ligam a receptores de membrana, o cálcio é liberado pelo retículo sarcoplasmático para o mioplasma. A combinação de um neurotransmissor, hormônio ou fármaco com receptores específicos de membrana ativa a contração pela elevação de Ca^{+2} intracelular (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

Igualmente ao músculo estriado, o mecanismo básico da contração do músculo liso envolve a interação miosina-actina. Os vasos sanguíneos e as vias aéreas demonstram estrutura tubular simples, cujas células musculares apresentam disposição circunferencial, reduzindo o diâmetro do tubo ou vaso durante as contrações. Esse mecanismo aumenta a resistência ao fluxo de sangue ou de ar, sem efeito no seu comprimento (BERNE; LEVY, 2009).

A atividade contrátil do músculo liso é controlada por diferentes fatores, como hormônios, nervos autônomos e diversos fármacos. Em geral é inervado pelo sistema nervoso autônomo. No presente estudo, que envolve vasos mesentéricos, a inervação se dá principalmente por fibras simpáticas, diferente de outros tecidos cuja inervação pode ser simpática ou parassimpática. Os neurotransmissores epinefrina e norepinefrina exercem efeito predominante da estimulação simpática pela contração do músculo liso pela grande quantidade de receptores α_1 , enquanto que os agonistas de receptores β_2 promovem o relaxamento do músculo liso dos brônquios. O músculo liso vascular é inervado por fibras simpáticas do sistema nervoso autônomo, essas fibras usam norepinefrina como neurotransmissor, que se liga a receptores α_1 adrenérgicos nas células vasculares lisas resultando em vasoconstrição (BERNE; LEVY, 2009).

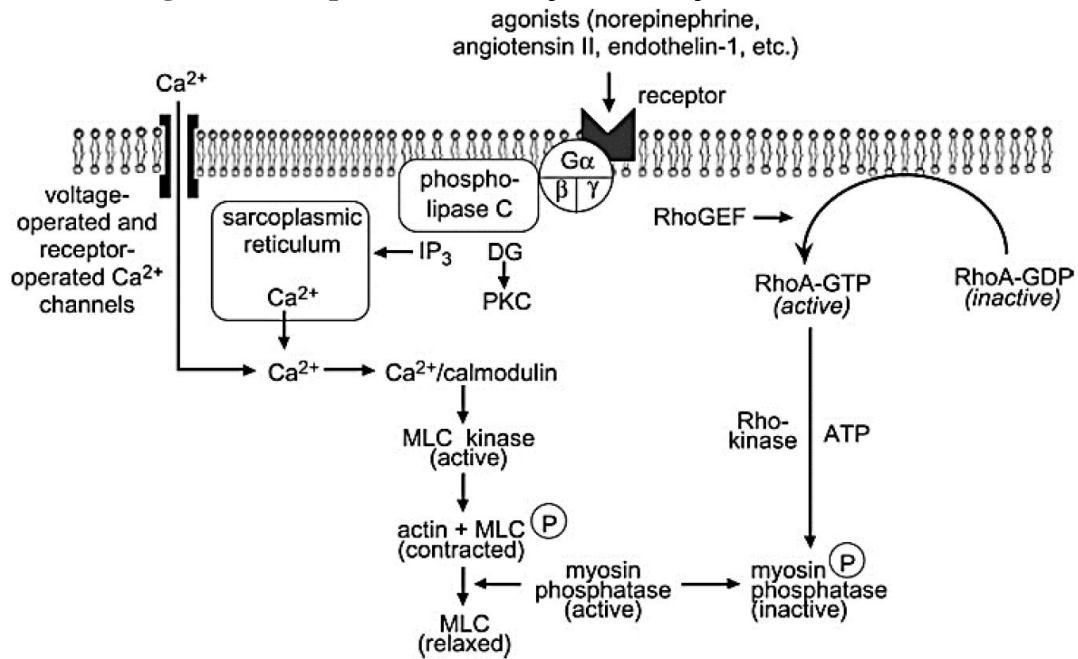
A acetilcolina promove estimulação parassimpática, mas os músculos vasculares lisos são inervados pobremente pelo sistema parassimpático. Durante uma estimulação vagal a acetilcolina pode elevar-se na circulação coronariana levando a um relaxamento da artéria coronária (BERNE; LEVY, 2009).

A ligação da acetilcolina às células endoteliais leva à liberação de óxido nítrico (NO) que relaxa o músculo liso. A produção de NO causa vasodilatação pela estimulação da elevação do GMPc (guanosina monofosfato cíclico) que por sua vez diminui a concentração intracelular de cálcio $[Ca^{2+}]_i$ nas células do músculo liso (McINTYRE *et al.*, 1998).

Dentre os hormônios que geram contração destacam-se a angiotensina II, a vasopressina e a endotelina. Na vigência de atividade muscular intensa, a adenosina pode ser liberada do músculo em atividade, difunde-se pela vascularização adjacente levando a vasodilatação para atender a maior demanda de oxigênio pelo músculo em atividade. A contração do músculo liso necessita da fosforilação da miosina (cadeia leve) que acontece em resposta ao aumento do Ca^{+2} intracelular, após potencial de ação ou em presença de hormônio agonista. O Ca^{+2} se liga a proteína calmodulina e o complexo cálcio-calmodulina ativa a cadeia leve da miosina. O movimento do cálcio ocorre no sarcolema (cálcio intra e extracelular) e no retículo sarcoplasmático (cálcio do mioplasma para o retículo e vice-versa). Muitos fármacos e hormônios relaxam o músculo liso por aumentarem as concentrações de AMPc ou GMPc. A acetilcolina (Ach), liberada pelas fibras parassimpáticas, provoca vasodilatação como resultado da estimulação da produção de NO pelas células endoteliais. O NO provoca relaxamento muscular liso pelo aumento do GMPc (BERNE; LEVY, 2009).

Dá-se o nome de acoplamento excitação-contração à transmissão do sinal originado na membrana plasmática da célula muscular para os receptores da maquinaria contrátil, com a finalidade de estimular o aumento das concentrações intracelulares de cálcio. Esse acoplamento ocorre essencialmente por dois mecanismos: o eletromecânico e o farmacomecânico (Figura 2) (PAIVA e FARIAS, 2005).

Figura 2 - Acoplamento excitação-contração no músculo liso



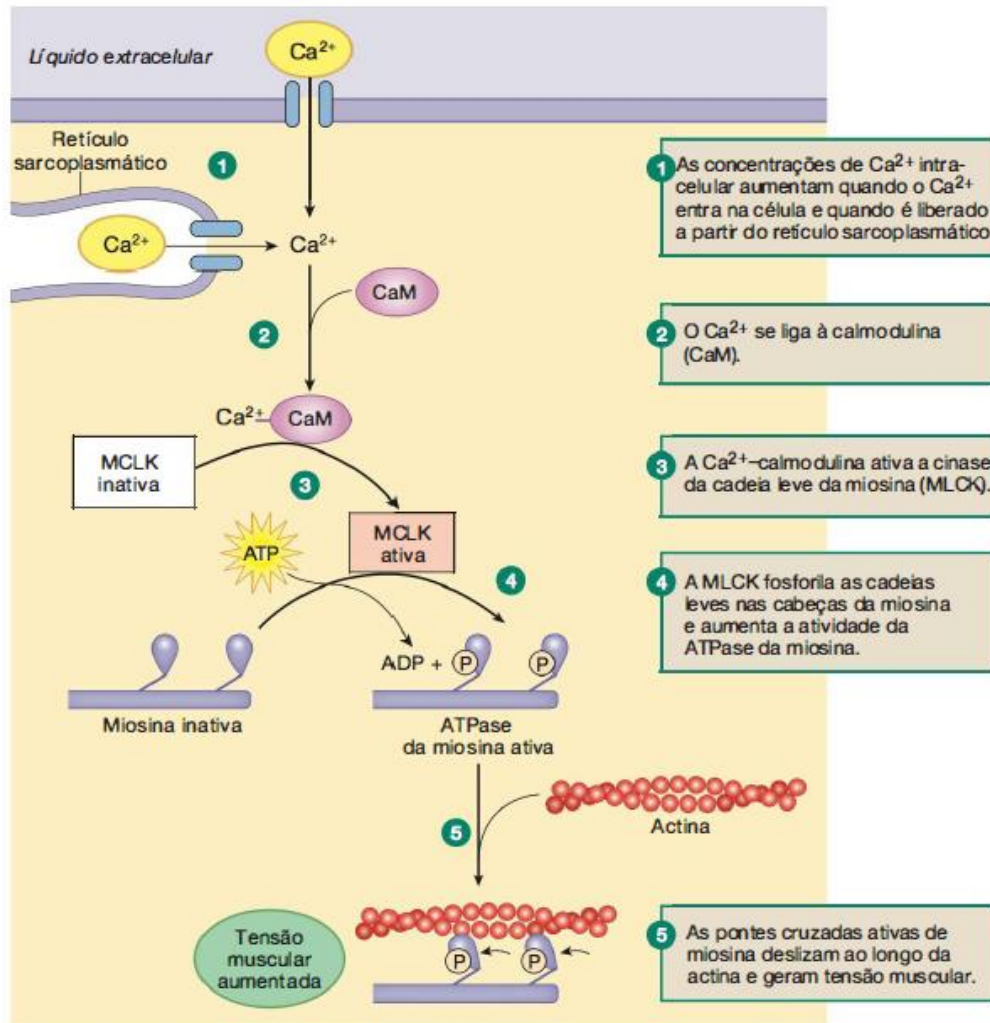
Fonte: Webb (2003).

No acoplamento eletromecânico, uma alteração no gradiente eletroquímico celular leva a abertura de canais de cálcio sensíveis à voltagem, permitindo a entrada de cálcio a partir do meio extracelular. Descrevem-se dois tipos de canais de cálcio no músculo liso vascular: o tipo L (*long lasting*) e o tipo T (*transient*). Esses canais de cálcio tem diferentes propriedades elétricas e farmacológicas, além de diferentes distribuições ao longo da árvore vascular, com predominância numérica de canais tipo L (MARTISSEN; DESSY; MOREL, 2014).

O acoplamento farmacomecânico, por sua vez, é independente da despolarização da célula, mas é diretamente dependente da ligação de agonistas a receptores de proteínas G presentes na membrana da célula muscular lisa. As proteínas G são heterotrímeros (*hetero* - diferentes; *trímeros* - compostos químicos formados por três moléculas), sendo compostas por três subunidades: alfa, beta e gama. A sua ativação é descrita como a dissociação da subunidade alfa, que, por meio da ativação de fosfolipases celulares leva à hidrólise do fosfatidilinositol 4,5- bisfosfato e à consequente formação de dois mensageiros intracelulares, o inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) e o diacilglicerol (DAG). O DAG, por meio da ativação da proteína quinase C, leva ao aumento da condutância de canais de cálcio (tipo L) e de potássio, ao passo que o IP₃ leva à liberação de cálcio armazenado no retículo sarcoplasmático, por meio da ligação a receptores específicos dessa organela (BROZOVICH *et al*, 2016) (AVILA-MEDINA *et al*, 2018).

A proteína alvo primária do cálcio intracelular aumentado é a calmodulina (CaM), uma proteína carreadora de cálcio. A ligação de 4 íons de cálcio à calmodulina forma um complexo capaz de interagir com a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK) que leva à fosforilação da miosina. Esse evento permite a interação da miosina com a actina e a consequente formação do complexo actina-miosina. A ligação cíclica da miosina com a actina, seguida da mudança de orientação do ângulo do complexo, leva ao deslizamento dos filamentos de miosina sobre a actina desencadeando a contração do músculo liso (PAIVA e FARIAS, 2005).

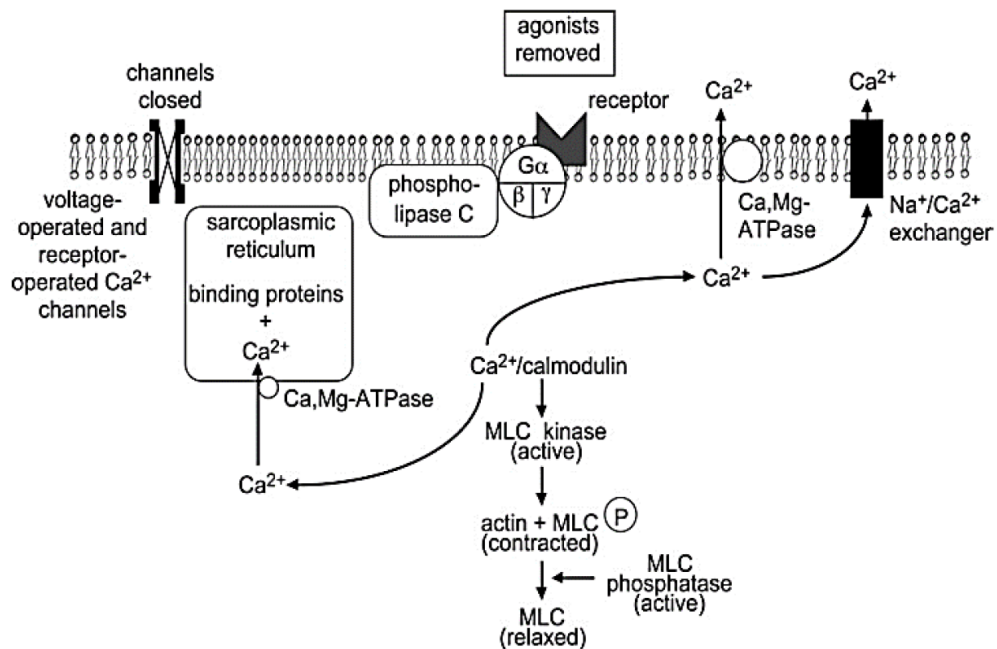
Figura 3 - Resumo do mecanismo de contração da célula lisa muscular



Fonte: Silverthorn (2010).

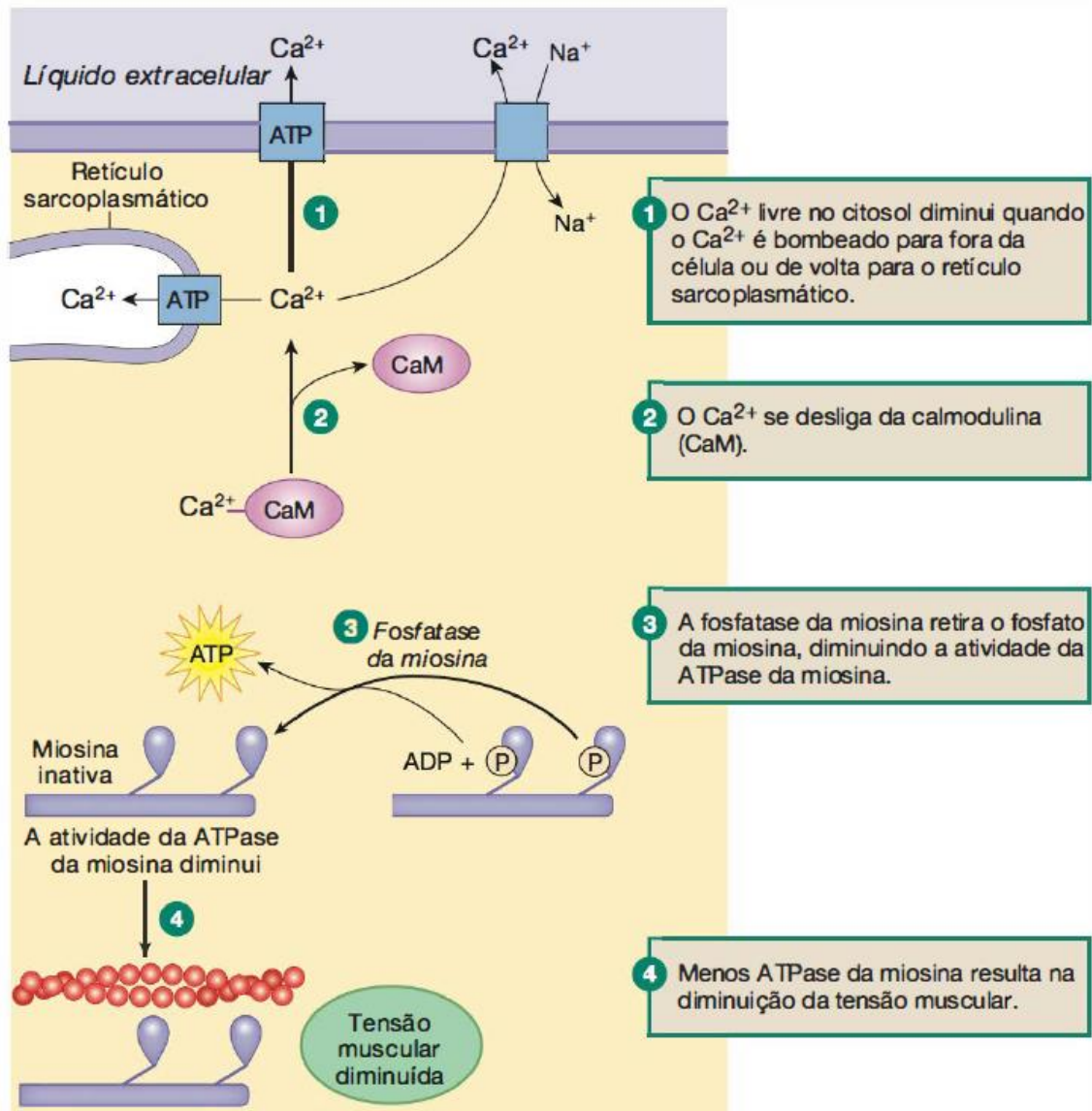
Já o relaxamento do músculo liso vascular se dá, primariamente, pela redução dos níveis de cálcio do meio intracelular com a consequente dissociação do complexo cálcio/calmodulina/MLCK. A redução da concentração de cálcio acontece pela recaptação desse íon por meio da ação da cálcio-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) e pela ação de cálcio-ATPase da membrana plasmática, assim como pela inibição do próprio influxo de cálcio pelos canais voltagem dependente. O efluxo de potássio, causando hiperpolarização celular, também tem um relevante papel nesse processo. A cadeia leve de miosina é desfosforilada e o número de pontes actina-miosina é reduzido, levando ao relaxamento do músculo liso (Figura 3) (PAIVA e FARIAS, 2005) (JACKSON, 2016).

Figura 4 - Relaxamento do músculo liso



Fonte: Webb (2003).

Figura 5 - Resumo do mecanismo de relaxamento da célula lisa muscular



Fonte: Silverthorn (2010).

2.5 SOLUÇÕES DE PRESERVAÇÃO DE ÓRGÃOS E MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE TECIDOS VASCULARES

A solução de conservação deve ser capaz de prevenir lesões induzidas pelas baixas temperaturas, espasmo e hipóxia. O princípio básico da preservação a frio é, portanto, a supressão do metabolismo, prevenindo contra a hipóxia (YUAN *et al.*, 2010).

Pode ser entendido também como a tomada de medidas para retardar a acidose inevitável com a prevenção de pH crítico, manutenção do volume celular, ótima utilização da reserva de energia anaeróbica e manutenção da estrutura celular necessária para a preservação do órgão transplantado. O órgão captado é irrigado com solução estéril através da artéria nutridora e mantido em pressão hidrostática, em seguida é mantido imerso na solução e coberto com gelo para o transporte. A temperatura ideal deve ser mantida em 0-4 °C, estimando-se para essa temperatura redução da atividade enzimática da célula e redução do metabolismo celular para 5-8% (O'CALLAGHAN *et al.*, 2013).

A partir das pesquisas de Folkert Belzer na Universidade de Wisconsin em 1986, a solução que leva o seu nome, ou Solução de Wisconsin (BELZER *et al.*, 1988) passou a ser utilizada em larga escala em todo o mundo a partir dos anos 90. A solução de Belzer é livre de cálcio, tem alta concentração de potássio e contém agentes inibidores da geração de radicais livres (adenosina, alopurinol, glutatona) e inibidores da agregação plaquetária (adenosina) (McINTYRE *et al.*, 1998). Atualmente, a preservação de enxertos renais em hipotermia utilizando a solução de Belzer (UW) é considerada padrão ouro (HAMEED *et al.*, 2016).

Muitas técnicas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de contornar as dificuldades impostas pelas limitações de vasos disponíveis, situação identificada muitas vezes no intra-operatório, como já descrito, e diferentes soluções têm sido utilizadas. Entre essas soluções destacam-se: Terasaki (MARTINEZ *et al.*, 1999) a 4 °C por até 26 dias; RPMI-1640 com L-Glutamina e antibióticos (SELLERS *et al.*, 2002) entre 4-10°C por até 30 dias; em 1969 surgiu a solução de Collins, com composição do tipo intracelular para conservação hipotérmica (entre 2 e 4°C); esta mesma solução sofreu uma modificação em sua composição pela fundação de transplantes da europa (Eurotransplantes) no ano de 1976, quando passou a se chamar Eurocollins; nos anos 70 surgiu a Solução de Citrato Hiperosmolar, na Austrália; a solução de Histidina-Triptofano-Ketoglutarato (HTK) surgiu na Alemanha nos anos 70; no final dos anos 90 surgiu a Solução de Celsior, que, diferentemente da Solução de Collins, é do tipo

extracelular, rica em sódio e magnésio e pobre em potássio e com baixa viscosidade (VIVARELLI *et al.*, 2004).

Na década de 60, o pesquisador Folkert Belzer apresentou seu trabalho com técnicas de perfusão hipotérmica para preservação de rins, conseguindo a preservação do órgão durante 17 horas, transplantando com sucesso (BELZER *et al.*, 1968). Em 1987 apresentou a Solução da Universidade de Wisconsin (UW) – Solução de Belzer – para preservação de órgãos sólidos, contendo, entre outros elementos, tampão fosfato, eletrólitos, coloide, inibidor metabólico, fontes de energia, quelantes de radicais livres e estabilizadores. Produzido pelo laboratório Bristol-Myers, conhecido comercialmente como Viaspan®, é uma solução tipo intracelular, pobre em sódio, rica em potássio e moderada em magnésio. Estável por até 12 meses conservada entre 2 e 8°C. Com a hipotermia, os déficits de ATP podem levar à rápida redução da atividade da bomba Na⁺/K⁺-ATPase contribuindo para o aumento do sódio intracelular. Esse aumento pode gerar edema e morte celular. A Solução de Belzer (Tabela 1) caracteriza-se pelas baixas concentrações de Na⁺ e altas concentrações de K⁺, condição importante na prevenção do edema celular (BELZER, 1988; COWLEY; TRUMP, 1982). A adição de um coloide, ou impermeabilizante (lactobionato e trissacarídeo rafinose além do colóide sintético HES - amido hidroxietílico) cria uma força osmótica que retém líquido no compartimento extracelular para se contrapor a esse efeito. O colóide HES é responsável pelo aumento da osmolaridade da solução. Contém o tampão fosfato, importante para combater os efeitos da acidose metabólica resultante da mudança do metabolismo aeróbico para o anaeróbico durante os períodos de isquemia. Além da acidose metabólica, a isquemia também leva a formação de radicais livres. A solução de Belzer possui quelantes de radicais livres, alopurinol e glutathione (NICHOLAS, 2014).

Tabela 1 - Composição da Solução de Belzer (UW)

	VIASPAN	
Composição		
	Glutationa total (glutationa/dissulfito de glutationa)	0.922g
	Ácido lactobiótico	35.830g
	Rafinose 5H ₂ O	17.830g
	Adenosina	1.340g
	Fosfato desidrogenase de potássio	3.400g
	Hidróxido de sódio	3.679g
	Hidróxido de potássio	14.500 g
	Sulfato de magnésio 7 H ₂ O	1.230g
	Alopurinol	0,136 g
	Pentafração	50.000g
	Água para injeção	q.b.p. 1lt
Aspecto	Solução clara e ligeiramente amarelada, estéril, apirogênica.	
Osmolaridade		320nosmol/kg
pH		7.40 a 20°C ajustado com Hidróxido de sódio/ácido clorídrico
Viscosidade		3.159 mm ² /sec
Prevenção de radiaçães livres	Glutationa (-+ 3 mmol/L) Lactobionato alopurinol	
Prevenção do edema celular	Lactobionato Rafinose Pentfracção	100 mmol/L 30 mmol/L

(*) Valores com base em uma porção de 1L de Solução de UW.
Fonte: SILVA, 2009.

De uma forma geral, as soluções de perfusão podem ser hipotérmicas ou normotérmicas e as principais técnicas são a preservação estática a frio e os métodos de preservação dinâmicos (O'CALLANGHAN *et al.*, 2013). Quanto a isquemia, pode ser classificada como isquemia fria: intervalo de tempo entre a perfusão da solução de preservação fria até o reaquecimento do órgão, quando efetivamente iniciam-se as anastomoses, e isquemia quente: período onde o órgão readquire sua temperatura fisiológica, iniciam-se as anastomoses, até o restabelecimento

da circulação sanguínea. De acordo com Beijert *et al*, estudos *in vitro* tem demonstrado que as células endoteliais podem tolerar até 9 horas de isquemia fria com danos reversíveis, porém se deteriora rapidamente após esse período. Depois de 24 horas de isquemia fria as células endoteliais não estão mais viáveis.

A preservação estática a frio é o padrão mais utilizado e baseia-se na supressão do metabolismo que, em princípio, é a primeira linha de prevenção contra lesões de hipóxia. Possui a vantagem de ser de fácil manuseio e de baixo custo (O'CALLANGHAN *et al.*, 2013). A máquina de perfusão atua através de uma bomba pulsátil ou contínua, hipotérmica (solução entre 4 e 9°C), extracorpórea, fornecendo nutrientes e oxigênio (através de um oxigenador de membrana) e removendo produtos residuais. Possui a desvantagem de demandar equipe treinada, maior custo e mais tempo para manuseio.

A perfusão com solução normotérmica surgiu como uma alternativa à solução hipotérmica e baseia-se na manutenção do órgão em estado mais fisiológico, com temperatura próxima aos 37 °C, fornecendo oxigênio e nutrientes para o metabolismo aeróbico, minimizando assim os efeitos deletérios da isquemia-perfusão (O'CALLANGHAN *et al.*, 2013).

Diferentes métodos de preservação de curto prazo têm sido reportados. Zatschler *et al.* (2009) compararam e concluíram pela superioridade da N-acetil-histidina sobre a HTK em estudo com artéria mesentérica superior (AMS) e aorta de ratos armazenadas por quatro dias a 4 °C.

Nos métodos de preservação dinâmicos utiliza-se uma bomba para gerar um fluxo, que pode ser pulsátil ou contínuo, da solução de preservação, que em tese eliminaria eletrólitos tóxicos e radicais livres, fornecendo um aporte de nutrientes e oxigênio. Esse fluxo estimulado ainda teria como vantagem a manutenção da hemodinâmica vascular do órgão perfundido além de contribuir para a diminuição do vasoespasm (O'CALLANGHAN *et al.*, 2013).

O Setor de Transplantes do Hospital Geral de Fortaleza (HGF), vinculado à SESA (Secretaria de Saúde do Estado do Ceará), onde o trabalho está sendo desenvolvido, utiliza a solução SPS-1 (Static Preservation Solution), ou Solução de Preservação Estática, utilizada para lavagem e armazenagem de órgãos transplantados, recomendada para fígado, pâncreas e rins. Essa solução é análoga a Solução de Belzer (UW) de acordo com parecer do FDA (Food and Drug Administration) de 2008, que considerou as soluções equivalentes em eficácia e segurança. Pode ser encontrada em frascos com um ou dois litros. Em valores de fevereiro de 2018 os galões de dois litros da Solução SPS-1 são adquiridos por R\$ 2.200,00; a Solução de

Custodiol, muito utilizada nos transplantes renais, custa R\$ 730,00/litro; e a Solução à base de água de coco em pó tem custo estimado, após processo de industrialização, de aproximadamente R\$ 250,00/litro. Deve-se levar em consideração que são necessários de seis a oito litros da solução de preservação para lavagem e estoque para cada transplante múltiplo de órgãos. Como valor agregado decorrente desse estudo, é necessário ressaltar a importância de maior independência tecnológica nacional, tendo em vista a posição de destaque que o Brasil ocupa no cenário internacional relativo ao número de transplantes aqui realizados.

2.6 USO DA ÁGUA DE COCO NA PRESERVAÇÃO DE CÉLULAS, TECIDOS E ÓRGÃOS

As soluções de preservação são parte considerável no custo final dos transplantes já que todas elas são importadas. Pesquisadores brasileiros debruçaram-se na busca de uma solução que tenha as características necessárias e que seja de baixo custo. Nesse contexto surgiu a água de coco, abundante em nossa região, de baixo custo, natural, ácida, estéril, contando em sua composição com vitaminas, sais minerais, proteínas (NUNES *et al.*, 1986).

O gênero *Cocos* é constituído somente pela espécie *Cocus nucífera L.* e esta é composta basicamente por duas variedades: a variedade gigante (*Typica*) e a variedade anã (*Nana*), encontrando-se entre essas duas variedades as formas híbridas de coqueiros (BARROS e TONIOLLI, 2011). No meio científico, a água de coco foi reconhecida como produto alternativo para conservação de tecidos. No início da década de 80, Nunes já chamava atenção para seu uso como conservante natural durante os experimentos com sêmen de caprinos (NUNES, 1986).

Ainda na década de 80 os pesquisadores sentiram a necessidade de desenvolver tecnologia capaz de conservar a água, inibindo a ação enzimática e garantindo a estabilidade microbiológica após a abertura do fruto. Com efeito, várias técnicas foram sendo desenvolvidas: o processo de UHT (*ultra high temperature*), a pasteurização, envasamento e congelamento da água, a tecnologia de microfiltração com membrana, a tecnologia de irradiação e a tecnologia da água de coco em pó (ACP) (CARVALHO *et al.*, 2006). A composição da ACP pode ser observada na tabela 2.

Tabela 2 - Composição da ACP

Água de Coco – Informações Nutricionais – 100 g (Laboratório Referência ANVISA: ITAL, CQA (Campinas, Brasil))			
	In natura	em pó	% VD (ACP)
Calorias (kcal)	19	388	19
Carboidratos (g)	3.8	76	25
Frutose(g)	2.7	7.8	-
Glicose (g)	1.9	6.2	-
Sacarose (g)	0	0	-
Proteínas (g)	0.6	12	16
Fibra, alimentar total (g)	1.2	24	96
Umidade (g)	-	1	-
Acidez total (mL de NaOH 1N)	1.2	3.5	-
Sólidos solúveis totais (Brix) (sol. 12.9%)	5.9	12.5	-
Gorguras totais (g)	0.200	4.000	7
Gorduras saturadas (g)	0.120	2.460	11
Ácido caprílico (g)	0.020	0.020	-
Ácido cáprico (g)	0.020	0.020	-
Ácido láurico (g)	0.070	1.410	-
Ácido mirístico (g)	0.030	0.600	-
Ácido palmístico (g)	0,020	0.420	-
Gorduras insaturadas (g)	0.100	0.660	-
Ácido oleico (18:1) (g)	0,070	0.120	-
Ácido linoleico (18:2) (g)	0.030	0.540	-
Gorduras trans (g)	0.000	0.000	0
Colesterol (g)	0.000	0.000	0
MINERAIS			
Sódio (mg)	112	2240	93
Cálcio (mg)	24.3	492	62
Ferro (mg)	0.36	8	7
Cobre (mg)	0.019	0.38	0
Fósforo (mg)	21	430	61
Magnésio (mg)	25.4	510	196
Manganês (mg)	0.12	2.6	113
Potássio (mg)	258	5170	-
Selênio (mg)	0.001	0.027	80
Zinco (mg)	0.15	3.3	47
VITAMINAS			
B1, tiamina (mg)	0.05	4.55	379
B2, riboflavina (mg)	0.07	0.07	5
B3, niacina (mg)	0.77	3.56	22
B6, piridoxina (mg)	0.13	0.13	10
C, ácido ascórbico (mg)	4.53	16.51	37
Ômega 3 (g)		0.02	
Ômega 6 (g)		0.02	
AMINOÁCIDOS			
Isoleucina (mg)	0.000481	2.652000	27
Leucina (mg)	0.001508	5.146000	37
Lisina (mg)	0.000367	2.608000	
Metionina (mg)	0.000097	1.579000	-
Fenilalanina (mg)	0.000676	4.927000	-

(continuação)

Treonina (mg)	0.000758	1.843000	-
Triptofano (mg)	0.011040	0.000000	-
Valina (mg)	0.002048	5.234000	-
Alanina (mg)	3.939000	7.627000	52
Arginina (mg)	0.708000	1.883000	-
Ácido aspártico (mg)	1.532000	4.729000	-
Ácido glutâmico (mg)	7.484000	12.412000	-
Glicina (mg)	0.000299	3.980000	-
Histidina (mg)	0.000463	2.360000	-
Prolina (mg)	0.002237	5.344000	-
Serina (mg)	0.000902	2.543000	-
Tirosina (mg)	0.000322	0.818000	-
pH		7,4	
Osmolaridade		318	
(*) Valores diários baseados em uma dieta de 2.000 kcal ou 8400 kJ.			

Fonte: Laboratório Referência ANVISA: ITAL, CQA (Campinas, Brasil)

Após os trabalhos preliminares foram necessários vários estudos em virtude da instabilidade do produto *in natura* (após cerca de 24 horas ele alterava suas características histoquímicas) e de sua heterogenicidade. Por ser substância rica em açúcares e sais ela fermentava muito facilmente. Quando o oxigênio entra em contato com a água já se inicia o processo de oxidação, alterando as características do produto. A metodologia de ACP foi padronizada por pesquisadores da Universidade Estadual de Ceará (UECE) em 2002. O líquido é extraído de forma asséptica e bombeado para um sistema de secagem. A amostra seca é transformada em um pó fino e uniforme, sem água livre e com elevada solubilidade, conservando todas as características físico-químicas do coco *in natura* (CARVALHO *et al.*, 2006). Foi desenvolvida com o objetivo de simplificar a utilização da água de coco como diluente. A sua ressuspensão faz com que ela readquira características bioquímicas muito próximas a da água do fruto *in natura* (SALGUEIRO *et al.*, 2002).

Este mesmo grupo de pesquisadores obtiveram alta taxa de prenhez (88,5%) em ovelhas inseminadas com sêmen diluído em meio à base de água de coco em pó resfriado a 4°C (SALGUEIRO *et al.*, 2007).

A partir do ano de 2014 passou a ser processada em escala piloto comercial.

Trata-se de solução natural, ácida e estéril, composta de sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras, além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, que lhe confere densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo, fornecendo, desta forma, os nutrientes necessários para a conservação celular. A água do coco imaturo é isenta de contaminação, com 2,5 a 5,9 g/100 ml de açúcares redutores, não causando hemólise no sangue humano *in vitro* ou *in vivo*. Tem composição química próxima à do soro glicosado isotônico

usado no meio hospitalar e tem densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo. A maior parte de sua composição, 93 a 95%, é de água estéril, 4% de carboidratos, 0,1% de gordura e o restante de outros elementos, com uma média de 20 calorias para cada 100 ml (BARROS e TONIOLLI, 2011).

A sua utilização é bastante diversificada, sendo encontrada nas áreas nutricional, médica, biotecnológica e de cosméticos. Pode ser usada como diurético, em reposição hidroeletrólítica e nutricional, como antioxidante (propriedade atribuída a vitamina C); no mercado dos cosméticos, como hidratante para o corpo e cabelo devido a grande quantidade de sais minerais e vitaminas do complexo B e C; em biotecnologia utilizada como diluente e conservante de sêmen, aumentando a vida útil e motilidade dos espermatozoides, mantém a longevidade de células de córneas humanas, cultura de tecidos, meio de cultura para bactérias e vírus, meio de cultura para vacinas, usada como anti-helmínticos e anti-tênia (CARVALHO *et al.*, 2006).

Da fruta muito se aproveita: a casca produz energia em caldeiras, do albúmen, a parte sólida no seu interior, se produz cosméticos e alimentos funcionais, e finalmente da água se produz alimentos funcionais, cosméticos e é usada na reprodução e como conservante de células e tecidos. Não tem sazonalidade e é abundante na natureza, possui ampla biodisponibilidade, sobretudo no nordeste brasileiro. Seu pH é compatível com o plasma sanguíneo (NOGUEIRA; VASCONCELOS, 2000).

A ação ou o princípio ativo atribuído a água de coco dos fatores de crescimento deve-se a uma substância com propriedades semelhantes a auxinas e citocininas, o ácido 3-indol-acético, descrito por Nunes e Salgueiro em 1999. Estas substâncias agem regulando o crescimento e provocando divisão celular. Os pesquisadores demonstraram que esta auxina estimulava a motilidade e mantinha uma percentagem maior de espermatozoides móveis no sêmen de caprinos e ovinos incubados a +37°C (NUNES E SALGUEIRO, 1999).

Considerando que a água de coco se constitui em um dos mais promissores produtos biotecnológicos atualmente estudados na conservação de órgãos e tecidos, a proposta desta pesquisa é avaliar *in vitro* sua eficácia como meio conservante de tecidos vasculares. Considerando ainda que as soluções de preservação de órgãos utilizadas em nosso meio são todas importadas e representam um custo elevado ao sistema de saúde, a ACP poderá se tornar solução equivalente em eficácia, porém economicamente viável quando comparado às soluções hoje utilizadas para preservação, sobretudo se levarmos em conta sua biodisponibilidade em nosso território.

Sendo considerada um produto biotecnológico promissor em conservação de órgãos e tecidos, analisamos a viabilidade dos tecidos vasculares preservados em solução à base de água de coco em pó através do estudo da funcionalidade fisiológica de contratilidade muscular e da sua morfologia celular. Submetida a avaliação de resultados quando comparados com os obtidos com a solução padrão, a solução de Belzer. Para isso foram utilizados órgãos (vasos mesentéricos e seus ramos) de doador cadáver realizados no serviço de Cirurgia de Transplantes do HGF.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a viabilidade dos tecidos vasculares preservados em solução à base de água de coco em pó (ACP) comparada à conservação em solução padrão atualmente utilizada no mercado brasileiro.

3.2 ESPECÍFICOS

- a) Analisar a qualidade da preservação em solução à base de ACP através do estudo da funcionalidade fisiológica de contratilidade muscular e da morfologia celular;
- b) Analisar a qualidade da preservação em UW através do estudo da funcionalidade fisiológica de contratilidade muscular e da morfologia celular em ACP e UW;
- c) Comparar os resultados obtidos pela preservação em solução à base de ACP com a solução padrão UW.

4 METODOLOGIA

4.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de estudo experimental, prospectivo, realizado em ARTÉRIAS DE doador cadáver de órgãos, totalizando 10 (dez) amostras para análise.

4.2 LOCAL

A coleta dos tecidos ocorreu nos hospitais onde habitualmente são realizadas as captações para transplante de órgãos da equipe do HGF. O estudo foi conduzido no Laboratório de Fisiologia Experimental (LAFIEX) da UECE e no Laboratório de Análises Clínicas Argos, localizados em Fortaleza, situados a 3°44'29.5"S de latitude sul e 38°28'48.4"W de longitude leste.

4.3 AMOSTRA

Os tecidos vasculares (artéria mesentérica superior) foram obtidos diretamente de doador cadáver por ocasião da retirada de órgãos para transplante, no seu segmento primário desde a origem na aorta até a emergência do ramo ileocólico. As amostras foram coletadas pela equipe de captação de múltiplos órgãos do HGF.

O material identificado e acondicionado em recipientes padronizados e dividido em grupos denominados grupo UW (com solução da Universidade de Wisconsin / Solução de Belzer) e grupo ACP (com solução à base de água de coco em pó) na proporção de 1/10 – um volume de massa do tecido para 10 volumes da solução, além de segmento do vaso para análise histológica.

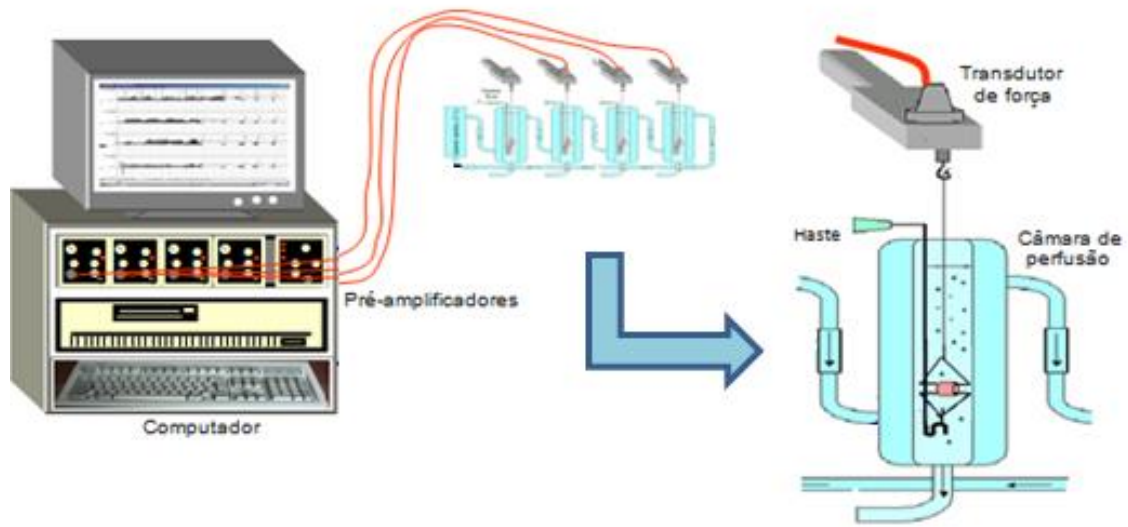
4.4 ANÁLISE DA CONTRATILIDADE MUSCULAR

Os fragmentos foram seccionados em anéis de 3 a 5 mm, imediatamente mergulhados em uma cuba contendo as soluções de preservação do estudo, refrigerada a 4 °C em cubas contendo gelo e conduzidos para a geladeira do HGF onde esses tecidos permanecem aguardando sua destinação final.

Ficaram acondicionados nos grupos citados (UW e ACP), em frascos identificados com 15 ml contendo as soluções e mantidos entre 2 e 4 °C, no prazo máximo de 48 horas, acima do qual elas terão que ser desprezadas. O pesquisador fez o transporte dos frascos em caixas térmicas contendo água e gelo para manter a temperatura a 4 °C até o laboratório de fisiologia experimental da UECE para as análises nos tempos estabelecidos, descritos em seguida, além de separar segmentos para o estudo histológico. Os segmentos destinados a histologia foram mantidos em formaldeído por 24 horas e depois colocados em recipientes contendo o mesmo volume de álcool a 70%.

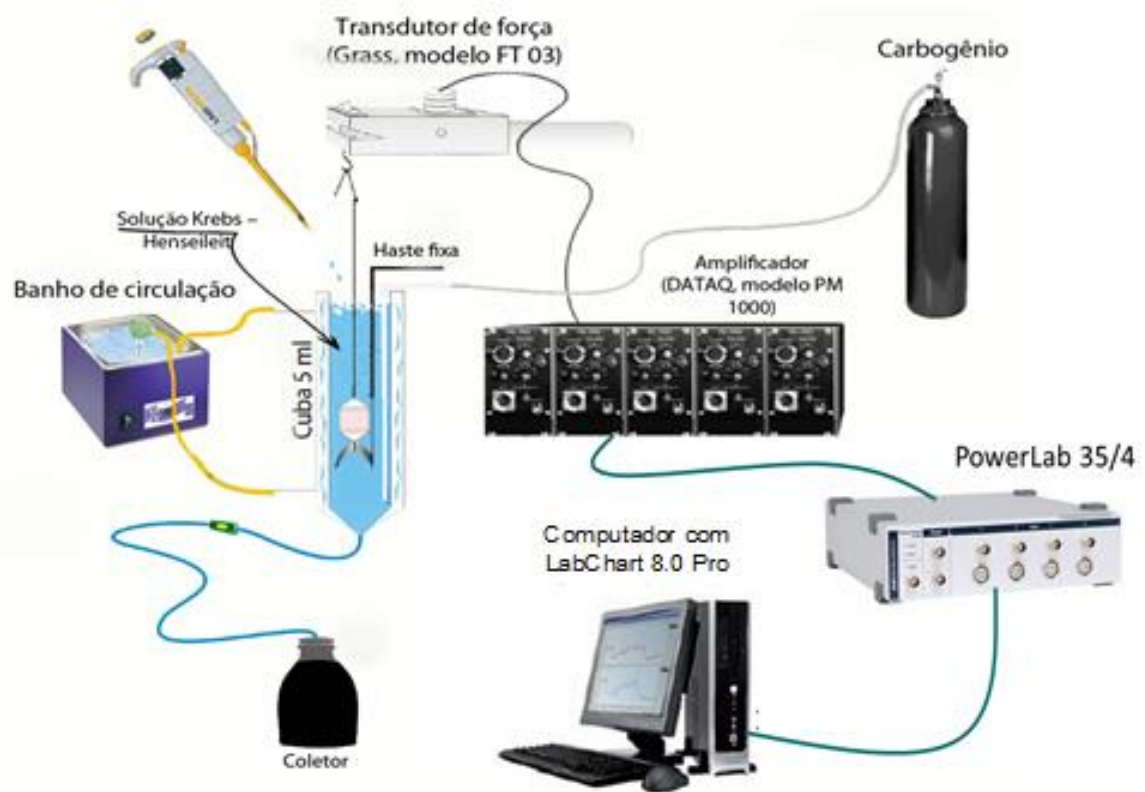
Foi utilizado o protocolo de estudo estabelecido pelo Laboratório de Fisiologia da Universidade Estadual do Ceará. Os segmentos foram fixados através de dois fios metálicos, em câmaras de perfusão para órgãos isolados com capacidade para 5 ml da solução nutritora Krebs-Henseleit-Buffer (KHB) para os experimentos de reatividade muscular com a seguinte composição expressa em mM: NaCl (118), KCl (4,7), NaHCO₃ (25), CaCl₂ (2,5), KH₂PO₄ (1,2), MgSO₄-7H₂O (1,2), EDTA (0,01) e glicose (BAILEY; ONG, 1978). A solução nutritora é gaseificada com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂), à temperatura de 37 °C e com pH ajustado para 7.4 com HCl 1M e/ou NaOH 1M. A solução de KHB é aerado por carbogênio para preservar seu pH, visto que há uma relação íntima entre o tamponamento de HCO₃ pelo CO₂. Os tecidos foram mantidos a temperatura de 37 °C, com pH 7.4 e constantemente gaseificados por mistura carbogênica. Uma das extremidades foi conectada a um transdutor de força isométrica (Grass, modelo F03, Quincy, MA, EUA) através de segmentos de aço inoxidável e a outra extremidade acoplada a uma base fixa. As respostas mecânicas foram transformadas em sinais elétricos pelo transdutor que, por sua vez, é ligado a um amplificador (DATAQ, modelo PM-1000, EUA) e este a uma placa conversora analógica digital (PowerLab, modelo 4/35, AD Instruments, EUA) instalada em um computador. Os dados experimentais foram armazenados em arquivos através do software Labchart (LabChart, AD Instruments, EUA) para posterior análise (Figuras 1 e 2).

Figura 6 - Setup de contração muscular (desenho esquemático 1)



Fonte: LAFIEX.

Figura 7 - Setup de contração muscular (desenho esquemático 2) Colocar as fotos do setup como na apresentação



Fonte: LAFIEX

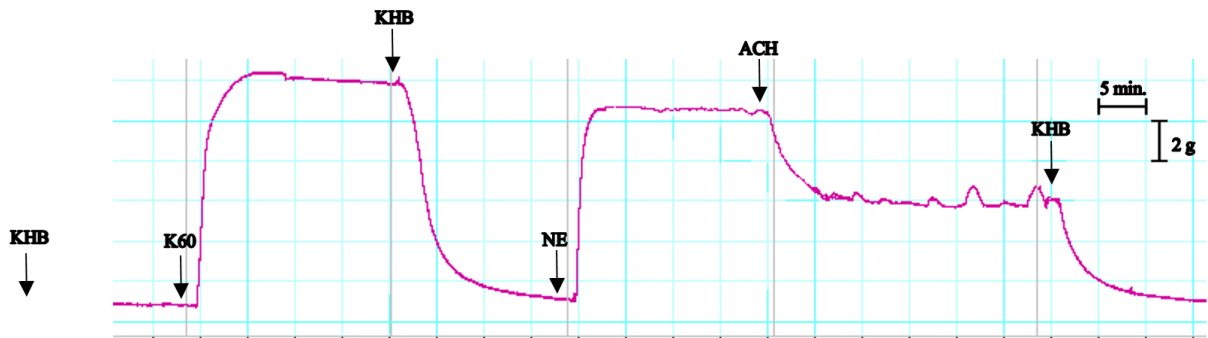
Para a avaliação da viabilidade vascular, após a montagem, as preparações biológicas foram mantidas sob tensão basal de 1g por um período de 50 min. para estabilização e adaptação do tecido às novas condições. Após o período de estabilização das amostras, foram induzidas duas contrações consecutivas com 60 mM de KCl adicionados diretamente ao banho através de solução isotônica para verificar a resposta contrátil do tecido, sendo consideradas viáveis as preparações que apresentaram contrações superiores a 1g.

De forma resumida, foram realizados testes eletromecânicos e farmacomecânicos nos segmentos musculares, pois como já foi ressaltado, a contração do músculo liso pode se dar basicamente por ativação da voltagem (teste eletromecânico) ou por influência de um fármaco (teste farmacomecânico) (Figura 8). Para avaliar o acoplamento eletromecânico foi utilizada uma solução de 60 mM de K⁺ (K60), e que através da alteração da voltagem transmembrana vai gerar uma contração, e para avaliar o acoplamento fármaco-mecânico foi utilizado noradrenalina, seguido de acetilcolina uma vez atingido o platô da curva de contração induzida pela noradrenalina. A acetilcolina tem a capacidade de promover a liberação de óxido nítrico pela célula endotelial, levando ao relaxamento muscular. O endotélio vascular é testado, portanto, pela indução de uma contração por 0,8 µM de NE (Norepinefrina) seguida pela adição de 10 µM de ACh na preparação. Foram considerados com endotélio os anéis de vasos que apresentaram relaxamento pela adição de ACh previamente estimulada por NE.

As concentrações de NE e ACh foram determinadas por um protocolo inicial, utilizando-se concentrações entre 0,1 a 5 µM de NE e 1 a 20 µM de ACh, onde a concentração de NE escolhida foi aquela capaz de levar a 50% de contração muscular, enquanto que a concentração de ACh foi aquela capaz de relaxar 100% dessa contração.

A figura abaixo ilustra o protocolo experimental para verificação dos acoplamentos eletromecânico e farmacomecânico avaliadas na pesquisa.

Figura 8 - Figura representativa do protocolo experimental



Fonte: Dados da Pesquisa.

As artérias foram submetidas à análise de reatividade muscular em seus segmentos anelares nos tempos de preservação 1 (considerou-se 48 horas o tempo máximo para a primeira análise), 7, 14 e 28 dias.

4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

O estudo morfológico foi realizado nas amostras que foram previamente separadas e rotuladas nos mesmos tempos em dias (1, 7, 14 e 28).

Os anéis vasculares foram fixados em formol tamponado a 10% e então desidratados em soluções crescentes de álcool etílico a partir de 70% e diafanizada em xilol, e posteriormente fundida para impregnação. Em seguida, foi feita inclusão do material em parafina a 56° C apropriadamente orientado para a realização dos cortes. Após resfriamento e solidificação, o bloco foi aparado com faca, dando-lhe a forma de retângulo, e identificado. O micrótomo rotativo foi usado para a confecção de cortes do material com 5 μ m de espessura cada, que foram distendidos sobre água na temperatura de 42° e depois recolhidas em lâminas preparadas com albumina para fixação e então levada à estufa (56°C) para escorrer a parafina e fixar aderí-la.

Os cortes obtidos de cada bloco foram corados pelos métodos hematoxilina-eosina (HE), para caracterizar morfológicamente o tecido vascular. Os critérios adotados para o estudo histológico visam a integridade da camada muscular e do tecido endotelial. Utilizou-se microscópio óptico marca Olympus® modelo CX 31, com magnificação de 40X, 100X e 400X. A análise foi feita por um único patologista no Laboratório de Análises Clínicas Argos (Anatomia Patológica de Fortaleza-Ce).

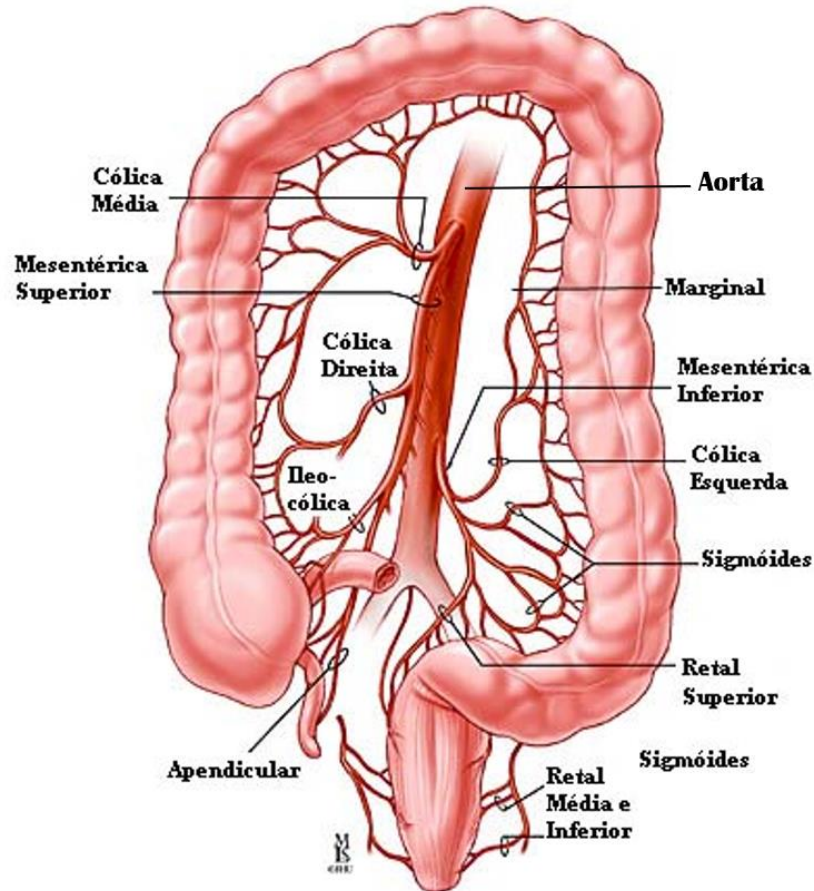
Os achados morfológicos que definem a necrofanerose em microscopia óptica, são: picnose, cariorrexe, cariólise, aumento da eosinofilia citoplasmática e perda completa da basofilia nuclear (essa última é a característica mais fácil de analisar e com maior concordância interobservador). Picnose é a retração e adensamento do núcleo, com perda da individualidade dos grânulos de cromatina; Cariorrexe é a fragmentação do núcleo picnótico; Cariólise é a coloração nuclear pálida e fraca; na Eosinofilia o citoplasma perde a leve basofilia que lhe é característica, passando a cor-de-rosa forte (afinidade pela eosina). Isto ocorre por digestão do RNA do citoplasma (p. ex. dos ribossomos).

Para uma melhor análise dos dados foi criado um escore semiquantitativo de lesão de acordo com a intensidade do acometimento de camadas endotelial e/ou muscular, onde 0: ausência de necrofanerose e 1: presença de necrofanerose, estabelecendo-se um Escore Final, onde 0: ausência de lesão, 1: lesão leve e 2: lesão grave.

4.6 COLETA DE DADOS

Os vasos (artérias mesentéricas superiores) foram obtidos diretamente de doador cadáver por ocasião da captação de órgãos para transplante no HGF. As artérias foram coletadas no ramo principal da artéria mesentérica, retiradas entre a emergência da aorta até a ileocólica (Figura 6) para padronização.

Figura 9 - Representação da anatomia da A. Aorta e ramos mesentéricos



Fonte: <http://derival.com.br/wp-content/uploads/2013/07/Anatomia-Arterial.jpg>

Uma limitação expressiva desse trabalho é a reconhecida fragilidade da camada endotelial, facilmente danificada durante a remoção do tecido vascular, seja durante a dissecação e ligadura, seja durante o armazenamento. Esse fato contrasta com a resistência natural da camada de células do músculo liso, que pode permanecer viável por até oito dias armazenada a frio (2-6°C). Todo material foi identificado e acondicionado em recipientes padronizados e dividido em grupos denominados grupo UW e grupo ACP (com solução à base de água de coco em pó) na proporção de 1/10 – um volume de massa do tecido para 10 volumes da solução. A manipulação deve ser a menor possível para preservar o estado natural do endotélio sem comprometer suas características. Os fragmentos foram seccionados em anéis de 3 a 5 mm, imediatamente mergulhados em uma cuba contendo as soluções de preservação do estudo, resfriada a 4°C em cubas contendo gelo e conduzidos para a geladeira do HGF onde esses tecidos permaneciam aguardando sua destinação final. Foram acondicionados nos grupos citados (UW e ACP), em frascos identificados com 15 ml contendo as soluções e mantidos entre 2 e 4°C. No prazo máximo de 48 horas, acima do qual elas tinham que ser desprezadas,

eram transportados em frascos de isopor contendo gelo até o LAFIEX da UECE. Parte da amostra era então destinada ao estudo morfológico celular, mantida em formol por 24 horas e em seguida em álcool a 70% nos tempos estabelecidos. As lâminas foram preparadas no Laboratório de materiais dentários, na Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal do Ceará e enviadas para o Laboratório de Análises Clínica Argos para a análise histológica.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média \pm E.P.M. (erro padrão da média), onde (n) representa o número de amostras. Os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese nula (H_0) menor que 5% ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significantes. Considera-se como hipótese nula a indicação de que não há significância estatística entre os grupos experimental e controle nas medidas de contração induzida por K60 e NE da artéria mesentérica humana. De modo a tentar aceitar ou rejeitar H_0 , fez-se uso da técnica estatística Análise de Variância de dois fatores, do inglês Two-way Analysis of Variance (ANOVA), considerando que os dados da pesquisa apresentam distribuição normal. O teste utilizado foi o ANOVA de medidas repetidas, onde foram feitas quatro avaliações em cada amostra. Essa técnica compara as diferenças médias entre os grupos que foram divididos em duas variáveis independentes (tempo e força).

A relativização dos valores de contração em relação a sua massa (g) e seu diâmetro (cm) foi necessária tendo em vista que as artérias humanas não são homogêneas entre si.

A tabulação dos dados foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism 6 e o programa Microsoft Excel 2016, enquanto que a análise estatística foi realizada pelo estatístico Dr. Thomaz Edson Veloso da Silva.

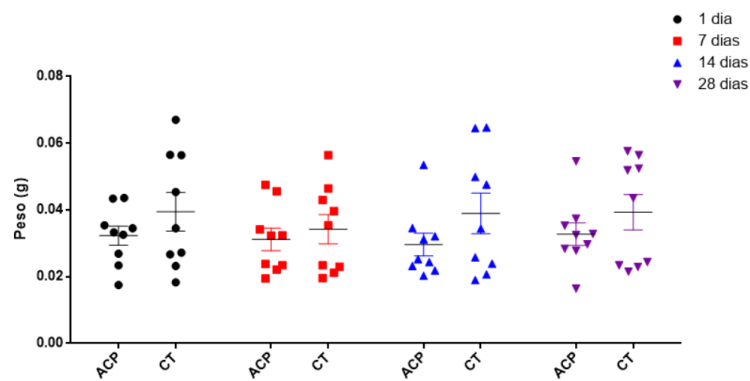
4.8 ASPECTOS ÉTICOS

O trabalho foi submetido a análise do CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) do HGF (Hospital Geral de Fortaleza) no dia 26 de julho de 2017 e o parecer do colegiado foi emitido no dia 09 de agosto de 2017, ainda sob o título: SOLUÇÃO DE CONSERVAÇÃO DE TECIDO VASCULAR PARA TRANSPLANTE, sob o Número do Parecer: 2.209.869, CAAE: 72663317.0.0000.5040 (ANEXO A).

5 RESULTADOS

A média do peso foi de $0,031 \pm 0,0032$ e $0,0379 \pm 0,0053$ para os grupos ACP e CT, respectivamente, enquanto que o calibre das artérias foi de $0,42 \pm 0,03$ e $0,48 \pm 0,04$ para os grupos ACP e CT, respectivamente (Figura 10 e 11). Esses resultados mostram que as amostras foram homogêneas entre si.

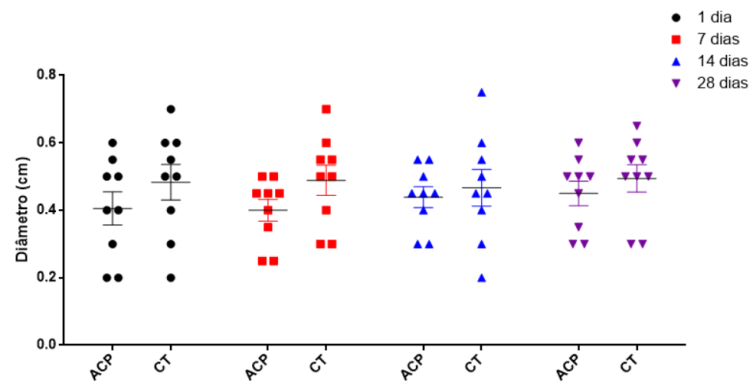
Figura 10 - Distribuição do peso das amostras de AMS humana preservadas em soluções ACP e UW



Dados representados por média \pm EPM ($n = 9$). Cada ponto representa o valor individual do peso das amostras. A variância do peso das amostras não apresentou diferença significativa, atribuindo homogeneidade as mesmas (ANOVA de duas vias, seguido de teste de Bonferroni).

Fonte: Dados da Pesquisa.

Figura 11 - Distribuição do diâmetro das amostras de AMS humana preservadas em soluções ACP e UW



Dados representados por média \pm EPM ($n = 9$). Cada ponto representa o valor individual do diâmetro das amostras. A variância do diâmetro das amostras não apresentou diferença significativa, atribuindo homogeneidade as mesmas (ANOVA de duas vias, seguido de teste de Bonferroni).

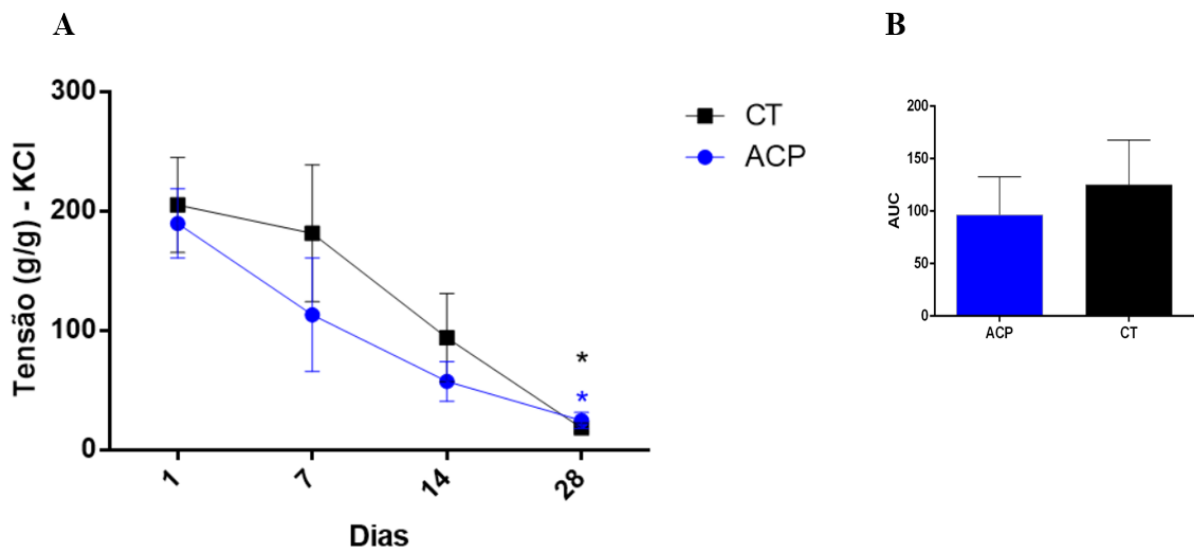
Fonte: Dados da Pesquisa.

As próximas figuras (figuras 12 e 13) são gráficos que mostram a tensão em grama de contração do músculo da AMS preservado em ACP e em UW e seu comportamento ao longo dos tempos em que foram avaliadas, em dias (1, 7, 14 e 28). Este experimento ilustra uma contração ativada por acoplamento eletromecânico, onde o estímulo inicial para o influxo de Ca^{+2} foi a despolarização da membrana gerada pelos íons potássio.

Em função da multiplicidade de medidas de peso e de diâmetro das diferentes amostras, estas foram relativizadas por peso e diâmetro, respectivamente, para uniformizar as medidas.

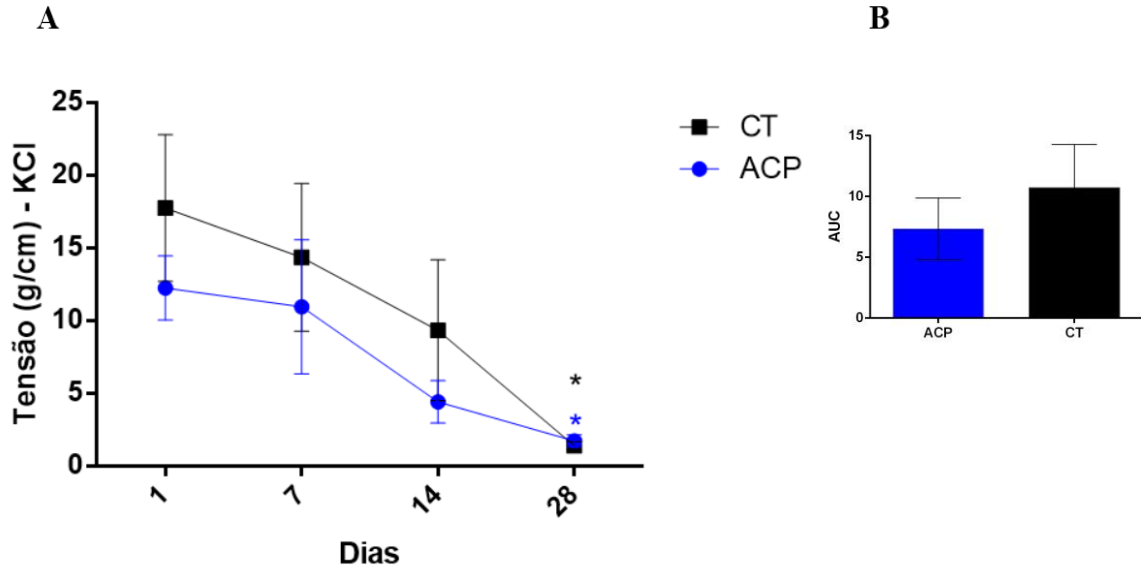
Quando avaliado o acoplamento eletromecânico, observou-se que as duas soluções apresentaram efeito similar sobre a contração muscular. A resposta de preservação da integridade muscular foi vista até o 14º dias, apresentando uma redução significativa a partir daí.

Figura 12 - Curso temporal da AMS preservada em solução ACP ou UW durante 28 dias ao estímulo eletromecânico por 60mM de K^+ (relatividade pelo peso da amostra)



Painel A, Curso temporal da resposta contraturante de AMS à K^+ e Painel B, área sob a curva. Dados representados por média \pm EPM (n = 9). Cada ponto representa a média de força por grupo avaliado. (*) representa a diferença estatística em relação ao dia 1 para $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias, seguido de teste de Bonferroni).
Fonte: Dados da Pesquisa.

Figura 13 - Curso temporal da resposta da AMS preservada em solução ACP ou UW durante 28 dias ao estímulo eletromecânico por 60mM de K⁺ (relativizado pelo diâmetro da amostra)



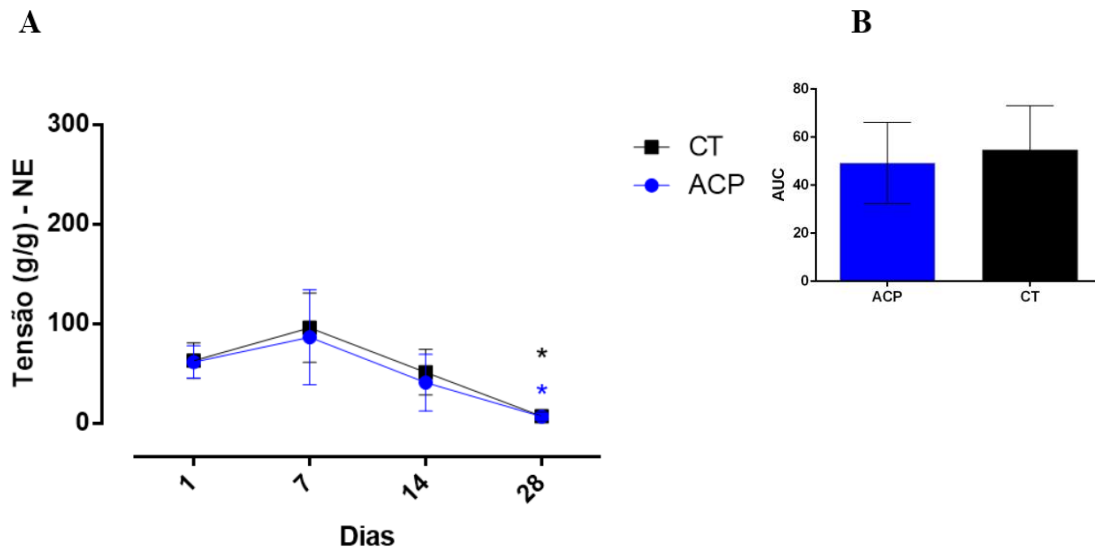
Painel A, Curso temporal da resposta contraturante de AMS à K⁺ e Painel B, área sob a curva. Dados representados por média ± EPM (n = 9). Cada ponto representa a média de força por grupo avaliado. (*) representa a diferença estatística em relação ao dia 1 para p < 0,05 (ANOVA de duas vias, seguido de teste de Bonferroni).
Fonte: Dados da Pesquisa.

As próximas figuras (figura 14 e 15) são gráficos que mostram a tensão em grama de contração do músculo da AMS preservado em ACP e em UW e seu comportamento ao longo dos tempos em que foram avaliados, em dias (1, 7, 14 e 28). Este experimento ilustra uma contração ativada por acoplamento farmacomecânico, onde o estímulo inicial para o influxo de Ca⁺² foi a ligação de um ligante a um receptor de membrana, no caso a NE.

Em função da multiplicidade de medidas de peso e de diâmetro das diferentes amostras, estas foram relativizadas por peso e diâmetro, respectivamente, para uniformizar as medidas.

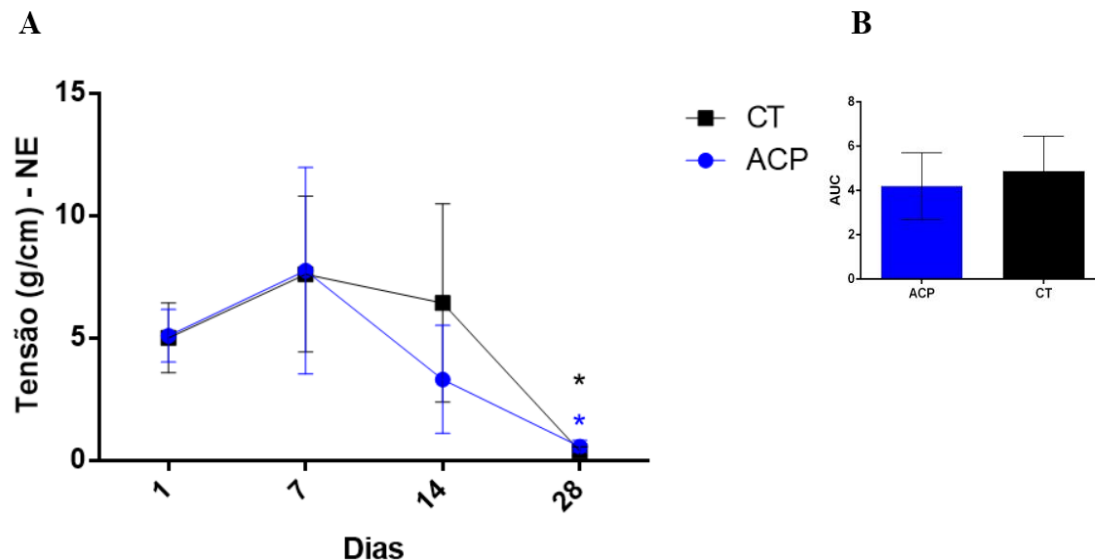
Quando avaliado o acoplamento farmacomecânico, observou-se que as duas soluções apresentaram efeito similar sobre a contração muscular, com preservação da integridade muscular até o 14º dias, apresentando uma redução significativa da contração a partir daí em ambas as soluções.

Figura 14 - Resposta da AMS preservada em solução ACP ou UW durante 28 dias ao estímulo farmacomecânico por NE (relativizado pelo peso da amostra)



Painel A, Curso temporal da resposta contraturante de AMS à K⁺ e Painel B, área sob a curva. Dados representados por média \pm EPM (n = 9). Cada ponto representa a média de força por grupo avaliado. (*) representa a diferença estatística em relação ao dia 1 para $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias, seguido de teste de Bonferroni).
Fonte: Dados da Pesquisa.

Figura 15 - Resposta da AMS preservada em solução ACP ou UW durante um mês ao estímulo farmacomecânico por NE (relativizado pelo diâmetro da amostra)

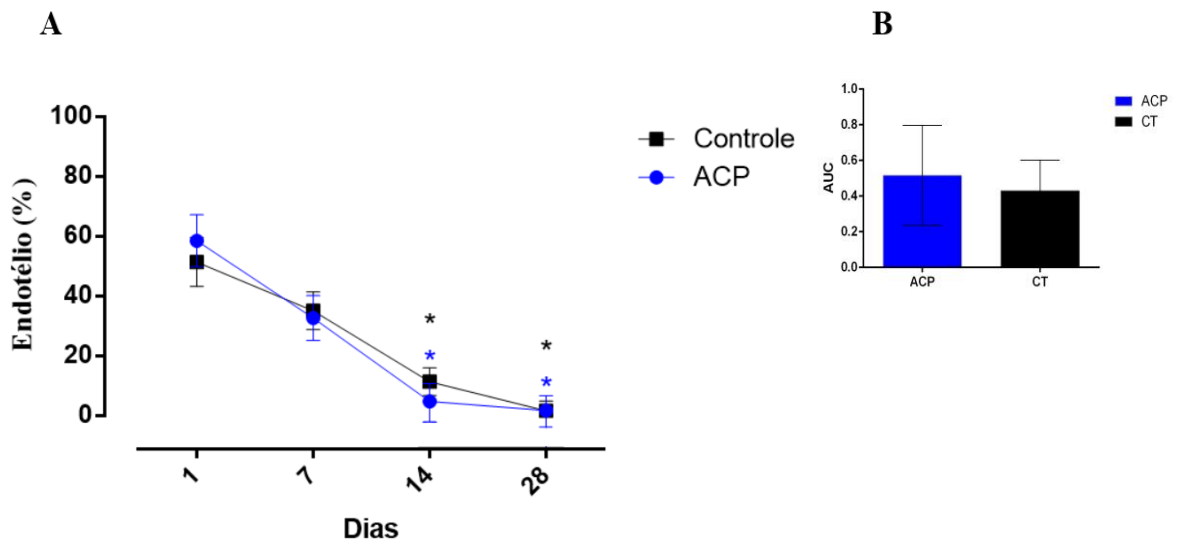


Painel A, Curso temporal da resposta contraturante de AMS à K⁺ e Painel B, área sob a curva. Dados representados por média \pm EPM (n = 9). Cada ponto representa a média de força por grupo avaliado. (*) representa a diferença estatística em relação ao dia 1 para $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias, seguido de teste de Bonferroni).
Fonte: Dados da Pesquisa.

Foi também investigada a presença de endotélio nos diferentes grupos ACP e UW (Figura 16). Observou-se que ambas as soluções são capazes de demonstrar o mesmo grau de

preservação até o 7º dia, mas com piora acentuada a partir deste ponto, comportamento observado tanto na solução experimental como na solução padrão.

Figura 16 - Verificação da integridade do endotélio em AMS preservada em solução ACP ou UW durante 28 dias



Painel A, Curso temporal da resposta contraturante de AMS à K^+ e Painel B, área sob a curva. Dados representados por média \pm EPM ($n = 9$). Cada ponto representa a média de força por grupo avaliado. (*) representa a diferença estatística em relação ao dia 1 para $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias, seguido de teste de Bonferroni).
Fonte: Dados da Pesquisa.

Quadro 1 - Avaliação histológica semiquantitativa individual de AMS preservada em solução ACP ou UW durante 28 dias

Casos/Controles	Necrofanerose Endotelial	Necrofanerose Muscular	Escore final
ACP1 D1	0	0	0
ACP1 D7	0	0	0
ACP1 D14	0	0	0
ACP1 D28	0	0	0
ACP2 D1	0	0	0
ACP2 D7	0	0	0
ACP2 D14	1	0	1
ACP2 D28	1	0	1
ACP3 D1	0	0	0
ACP3 D14	1	1	2
ACP3 D28	1	1	2
ACP6 D7	0	0	0
ACP6 D14	1	0	1
ACP6 D28	1	0	1
ACP7 D7	0	0	0
ACP7 D14	1	0	1
ACP7 D28	1	0	1
C1 D1	0	0	0

			(continuação)
C1 D7	0	0	0
C1 D14	0	0	0
C1 D28	0	0	0
C2 D1	0	0	0
C2 D7	0	0	0
C2 D14	0	0	0
C2 D28	1	0	1
C3 D1	0	0	0
C3 D14	1	1	2
C3 D28	1	1	2
C6 D7	0	0	0
C6 D14	0	0	0
C6 D28	1	1	2
C7 D7	0	0	0
C7 D14	1	0	1
C7 D28	1	0	1

Os códigos de necrofanerose endotelial e muscular dizem respeito à presença ou não de lesão, enquanto o escore total refere-se à gravidade da lesão, onde: 0 é a ausência de lesão, 1 é lesão leve e 2 é lesão grave.

Fonte: Dados da Pesquisa.

Considerando que os melhores resultados são os que mais se aproximam de zero no escore final, a análise dos escores permite inferir que as amostras ACP e controle mostraram resultados idênticos na lâmina 1 e 7 e resultado equivalente na lâmina 6, e superioridade de resultado do controle sobre ACP somente na lâmina 2 (Quadro 2).

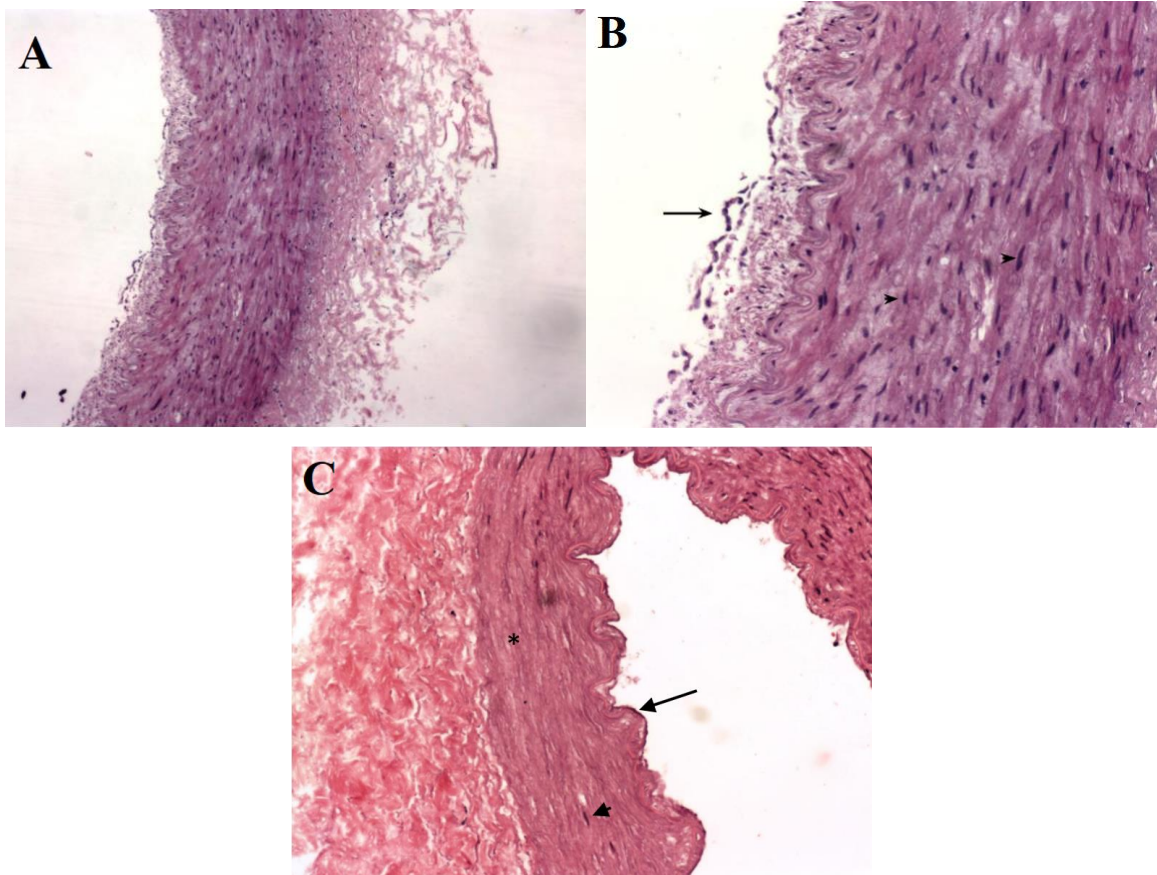
Quadro 2 - Análise histológica de AMS em soluções ACP ou UW durante 28 dias

	Necrofanerose Endotelial	Necrofanerose Muscular
Controle – Dia 1	0	0
ACP – Dia 1	0	0
Controle – Dia 7	0	0
ACP – Dia 7	0	0
Controle – Dia 14	2	1
ACP – Dia 14	4	1
Controle – Dia 28	4	2
ACP – Dia 28	4	1

Os dados representam o número de amostras com presença de Necrofanerose Endotelial ou muscular.

Fonte: Dados da Pesquisa

Figura 17 - Análise morfológica de AMS preservada em solução ACP ou UW durante 28 dias



Vasos normais (A) e (B), parede vascular preservada, túnicas íntima, média e adventícia de aspecto histológico normal, onde as setas indicam (a seta maior o endotélio e as cabeças de seta as células musculares lisas da túnica média, com basofilia nuclear preservada. A (HE, 40x) e B (HE, 100x). C - Necrofanerose da parede vascular, perda completa da basofilia nuclear em endotélio (seta maior) e área da túnica muscular (cabeça de seta), além de aumento da eosinofilia citoplasmática (*) (HE, 40x).

Fonte: Dados da pesquisa.

6 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados demonstraram que a solução de ACP foi capaz de preservar o tecido vascular em termos muito similares aos demonstrados pela solução padrão, também a mais utilizado comercialmente com esta finalidade. Para isso foram utilizados critérios morfológicos e funcionais através de estudo em laboratório de histologia e de fisiologia. Fragmentos de artéria mesentérica superior de humanos foram usados para as análises, em estudo piloto experimental, comparando a eficácia da conservação da solução proposta com a solução de Belzer (UW). De um modo geral, os estudos que comparam soluções de conservação de órgãos dão ênfase a avaliação do tempo de estocagem. A Solução da Universidade de Wisconsin foi considerada padrão ouro pois foi capaz de preservar o fígado por período três vezes maior, passando o tempo de isquemia a frio de oito para 24 h. Apesar disso, possui como desvantagem a sua alta viscosidade, reduzindo a capacidade de penetração na microcirculação, além do seu elevado custo. A solução de ACP após reconstituída demonstrou ser vantajosa no aspecto financeiro, reduzindo o custo da operação, quando comparada com os produtos disponíveis no mercado. Esse fato demonstra uma vantagem do produto, aliado a sua disponibilidade e acessibilidade, além de impulsionar a indústria nacional e colocar o Brasil em posição de maior relevo como país produtor de insumos para cirurgias.

As características atribuídas a ACP, importantes no processo de conservação, são a sua osmolaridade e seu pH, muito próximos aos da solução UW, mas sobretudo próximos aos do plasma sanguíneo. Seus valores são de 318 mOsm/Kg e pH 7,4. Os valores de referência do plasma humano são de 275-295 mOsm/Kg em adultos jovens, admitindo-se valores próximos de 300 mOsm/Kg em pessoas com mais de 60 anos de idade, e o pH sanguíneo varia entre 7,35 e 7,45.

Wilson *et al.* (2004) consideram que a injúria às células endoteliais durante a implantação do órgão tem sido implicada como causa de disfunção tardia do enxerto, pois as células endoteliais ativadas seriam potentes produtoras de citocinas e moléculas de adesão, facilitadoras da invasão de componentes celulares e humorais inflamatórios. Esses mediadores, além de estimularem a isquemia e a lesão de reperfusão, também promovem rejeição aguda, rejeição tardia e vasculopatia. Concluem considerando a solução de Belzer como padrão-ouro para preservação de múltiplos órgãos, desde sua introdução no final dos anos 1980.

Devido às suas características e padronização de seu uso nos maiores centros de transplante no mundo inteiro, ela foi utilizada como parâmetro de referência e comparação no

presente estudo. Para uma ótima sobrevivência e preservação da função do enxerto, a manutenção da viabilidade do órgão desde a captação até o transplante é de fundamental importância. Uma desvantagem ou limitação da solução de Belzer é sua alta viscosidade, característica que pode causar obstrução da microvasculatura por aceleração da agregação de eritrócitos (BELZER *et al.*, 1988; MORARIU *et al.*, 2003; SOUTHARD; BELZER, 1995).

Idealmente, as soluções de conservação têm que ser capazes de prevenir e evitar as lesões induzidas pela hipóxia e pelo frio. As células na parede arterial sofrem alterações tempo dependente quando armazenadas a 4 °C, e a severidade e velocidade dessas alterações variam de célula para célula, sendo as alterações mais precoces envolvendo as fibras nervosas e as células endoteliais. Tem sido sugerido que as alterações na função contrátil detectadas nos vasos armazenados representam o balanço entre os efeitos da disfunção das células endoteliais e musculares lisas. O armazenamento leva a alterações na homeostase do cálcio resultando em aumento da permeabilidade da membrana e consequente despolarização (KRISTEK; TOROK; SIKVLOVA, 1993).

Cannon *et al.* (2013) realizaram estudo multicêntrico comparando a utilização da bomba de perfusão com a preservação a frio isoladamente, em relação a preservação tardia do enxerto, concluindo pela superioridade da preservação do órgão quando utilizava a máquina de perfusão durante os procedimentos.

Em trabalho prospectivo mais recente, foi observada a superioridade da função do enxerto, alvo primário da pesquisa, quando foram utilizadas máquina de perfusão e solução fria, quando comparado a solução normotérmica ou hipotérmica isoladamente (HARMEED *et al.*, 2016).

Wille, De Groot e Rauen (2008) realizaram estudo semelhante com HTK utilizando segmento de aorta de porco armazenado por até 21 dias com solução de deferoxamina, um quelador de ferro, a 4 °C, utilizados em casos de emergência de complicações vasculares no receptor pós-transplante.

Martinez *et al.* (1999) armazenaram vasos ilíacos em Solução de Terasaki a 4 °C, Sellers *et al.* (2002) utilizaram RPMI-1640 a 4-10 °C.

Sellers *et al.* (2002) destacam a importância dos enxertos vasculares preservados nos transplantes hepáticos realçando a possibilidade da existência de aneurisma e pseudoaneurismas, embora raros (< 1%), mas de difícil tratamento. Apontam a infecção como fator etiológico mais comum e citam os possíveis substitutos, como a veia safena autóloga, a veia safena do doador cadáver, enxertos arteriais, enxertos protéticos e enxerto arterial

preservado. Consideram ainda que os enxertos arteriais são largamente superiores aos demais, pois são mais resistentes a cicatrização em campo infectado do que os enxertos protéticos e são mais fisiológicos que os enxertos venosos e menos propensos a degeneração tardia.

Harlander-Locke *et al.* (2014) relatam que infecção de enxerto de aorta é raro (0,2 a 5%). Os autores realizaram um trabalho multicêntrico em instituições que usavam alo-enxerto aorto-ilíaco criopreservado, reunindo entre os anos de 2002 e 2014 duzentos e vinte pacientes. As indicações foram: infecção de prótese aórtica, fístula ou erosão aorto-entérica, pseudo-aneurisma infectado adjacente a prótese aórtica, outras situações como trauma, risco aumentado de infecção protética e recorrente trombose do enxerto protético. As alternativas comumente empregadas são o bypass extra-anatômico, a substituição *in situ* do segmento aorto-ilíaco com alo-enxerto não preservado, com próteses banhadas em antibióticos e o neo-enxerto com veias femorais. As conclusões do trabalho são que os alo-enxertos aorto-ilíacos criopreservados permitem a reconstrução aórtica *in-line* na presença de infecção com menores taxas de morbidade ou mortalidade do que os outros resultados publicados, e que são associados com baixas taxas de aneurismas, ruptura do enxerto, recorrência da infecção ou perda de membro inferior. A aplicação da criopreservação tem mostrado que é capaz de preservar a integridade da matriz de colágeno, fator que tem ajudado nas taxas elevadas de patência e taxas baixas de complicações do enxerto.

Os enxertos são mantidos em solução de conservação por período não superior a 30 dias, baseado em dados de trabalhos *in vivo* e *in vitro* que demonstraram que a viabilidade celular e as taxas de sucesso cirúrgico caíam drasticamente após esse prazo (SELLERS *et al.*, 2002). O grupo italiano, liderado por Roberto Chiesa, em trabalho publicado em 1998, armazenava os enxertos a 4 °C por um período que variava de 48 horas (justificava esse prazo mínimo para diminuir a antigenicidade celular), até 30 dias (para evitar degeneração celular tardia), e utilizava a seguinte composição: Solução de Eurocollins - 1000 ml; Heparina - 10.000 UI; Netilmicina - 80 mg; Ceftriaxona – 1 g; e Anfotericina B - 50 mg. Em outro trabalho, dessa vez usando respirometria de alta resolução para avaliar a função mitocondrial, pesquisadores colheram o coração, a veia safena, a artéria mamária interna ou torácica interna e aortas de porcos e armazenaram em Custodiol-HTK e em solução salina e observaram que, após 14 horas de armazenamento a frio, a preservação era significativamente melhor nas peças em Custodiol-HTK, mostrando a eficácia desse produto (WIEDEMANN *et al.*, 2013).

Watson *et al.* (2010) compararam os resultados das duas técnicas em doadores de rins após morte circulatória, preservação dinâmica e preservação estática a frio, apontando

vantagens e desvantagens em cada uma delas. Em nosso estado utiliza-se com mais frequência a preservação estática em frio com soluções hipotérmicas, sendo a Solução (UW) considerada padrão ouro, a partir da década de 90 a solução mais usada nas Américas bem como na Europa.

McIntyre *et al.* (1998) estudaram ramos da artéria mesentérica imediatamente após a dissecação e até quatro dias, armazenado em PSS (solução salina fisiológica) a 4 °C. Os anéis possuíam 2 mm de espessura, eram presos a segmentos de aço inoxidável em uma extremidade conectado a um transdutor de força e na outra a um micrômetro. Usavam substâncias constrictoras e dilatadoras (noradrenalina, acetilcolina, fenilefrina, cloreto de potássio e endotelina) e avaliavam a habilidade do vaso em responder aos agentes através da interpretação das curvas de contração/dilatação. Foi observado que os vasos de resistência (ramos da AMS) se mantinham viáveis quando armazenados em PSS a 4 °C por até quatro dias.

Kristek *et al.* (1993) também realizaram trabalho com aorta torácica de 10 coelhos albinos adultos, randomizado em cinco grupos, para avaliar as alterações celulares após tempos determinados: grupo 1 = artérias frescas estudadas imediatamente *in vitro* com o órgão banhado a 37 °C (grupo controle); grupo 2 = aorta armazenada em solução de Krebs com pH regulado para 7.2-7.4 e refrigeradas a 4 °C, análise de dois dias; grupo 3 = análise de quatro dias; grupo 4 = análise de seis dias; e grupo 5 = análise de oito dias. Após seis horas, a estrutura endotelial permanecia inalterada; após dois dias na solução de Krebs a maioria das células apresentava alterações moderadas, tornando-se mais evidentes no quarto dia; no oitavo dia, o citoplasma das células endoteliais estava quase completamente destruído. Com relação ao músculo liso, foi observado que eram as células mais resistentes da parede arterial à criopreservação, pois apenas discretas alterações morfológicas foram observadas mesmo no oitavo dia. Houve resposta contrátil à noradrenalina mantida até o oitavo dia, bem como resposta relaxante com a adição de acetilcolina. A resposta à acetilcolina no oitavo dia numa camada vascular com poucas células endoteliais ativas chamou a atenção dos pesquisadores, fazendo pressupor que outro componente da parede arterial, como o músculo liso, pudesse ser o responsável pela produção e liberação de fatores de relaxamento, função normalmente exercida pelas células endoteliais.

Vários estudos têm demonstrado a eficiência da água de coco em pó no tocante à preservação de células e tecidos. Estudos tem utilizado gametas de vários animais tendo a água de coco (AC) como conservante de folículos pré-antrais de ovelhas e cabras, sêmen de carneiros, suínos e até humanos. Silva *et al.* (2010) a utilizaram na preservação de oócitos imaturos de ovários caninos com resultados satisfatórios. Em outro estudo a solução de AC foi tão efetiva quanto a solução de Collins na preservação de folículos pré-antrais de cabras a 4°C

(COSTA *et al.*, 2002). Nogueira *et al.* (2000) ao utilizarem a AC como meio conservante de córneas de coelhos observaram que não houve alteração estrutural expressiva em relação às córneas conservadas no Optisol®, produto padrão vendido comercialmente.

Nunes (1986) evidenciou em estudo *in vitro* e *in vivo* a eficácia da água de coco in natura, na preservação do sêmen e embriões de ovinos, altamente sensíveis às variações de temperatura em seu processo de conservação.

Schettino *et al.* (2015) realizaram estudo com 50 ratos machos da raça Wistar e dividiram em cinco grupos de acordo com a solução de preservação utilizada: 1 - Ringer lactato; 2 = Solução de Belzer; 3 = água de cocos maduros; 4 = água de cocos verdes; 5 = água de coco modificada (composição próxima a solução de Belzer); e concluíram que a solução de AC preservou a vitalidade tissular do baço, ovário e pele dos ratos por seis horas.

7 CONCLUSÃO

Esse trabalho mostra de forma pioneira a avaliação de solução à base de água de coco na preservação de amostras de vasos sanguíneos durante o período de 28 dias. Com os resultados obtidos pode-se verificar que:

- a) Quanto à avaliação da funcionalidade fisiológica de contratilidade muscular das amostras conservadas em solução ACP e UW, essas soluções foram capazes de preservar a função contrátil muscular por um período de 14 dias;
- b) Quanto a preservação do tecido endotelial das amostras conservadas em solução ACP e UW, essas soluções foram capazes de preservar a função contrátil muscular por um período de 7 dias
- c) Quanto ao estudo da morfologia celular das amostras conservadas em solução ACP e UW, essas soluções foram capazes de preservar a integridade celular por um período de 7 dias;

A Solução de ACP, para preservação dos tecidos e vasos, demonstrou que a viabilidade e função fisiológica e da contratilidade celular foram preservados quando comparada à solução padrão atualmente comercializada no Brasil, mostrando ainda uma relação custo/benefício altamente favorável. Além do pioneirismo e da viabilização do uso do bioproduto com tecnologia desenvolvida em nosso meio, ressalta-se também o impacto que pode provocar em termos de saúde pública, considerando a redução do custo nos procedimentos onde ele é utilizado.

REFERÊNCIAS

- AVILA-MEDINA, Javier *et al.* The complex role of store operated calcium entry pathways and related proteins in the function of cardiac, skeletal and vascular smooth muscle cells. **Frontiers en physiology**, v.9, p. 257, 2018.
- BAILEY, L.E.; ONG, S.D. Krebs-Henseleit solution as a physiological buffer in perfused and superfused preparations. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 1, i. 2, p. 171-175, aug., 1978.
- BARROS TB, TONIOLLI R. Uso potencial da água de coco na tecnologia de sêmen. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 35, n. 4, p. 400-407, 2011.
- BEIJERT, Irene *et al.* Endothelial Dysfunction in Steatotic Human Donor Livers: A Pilot Study of the Underlying Mechanism During Subnormothermic Machine Perfusion. **Transplantation direct**, v. 4, n. 5, 2018.
- BELZER, Folkert O.; SOUTHARD, James H. Principles of solid-organ preservation by cold storage. **Transplantation**, v. 45, n. 4, p. 673-676, 1988.
- BROZOVICH, F. V. *et al.* Mechanisms of vascular smooth muscle contraction and the basis for pharmacologic treatment of smooth muscle disorders. **Pharmacological reviews**, v. 68, n. 2, p. 476-532, 2016.
- CANNON, Robert M. *et al.* To pump or not to pump: a comparison of machine perfusion vs cold storage for deceased donor kidney transplantation. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 216, n. 4, p. 625-633, 2013.
- CARVALHO, Joelia Marques de, *et al.* Água-de-coco: Propriedades nutricionais, funcionais e processamento. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 3, 2006.
- CÉSAR, Jorge Miguel Schettino *et al.* Preliminary study of coconut water for graft tissues preservation in transplantation. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgões**, v. 42, n. 1, p. 43-48, 2015.
- COSTA, Sonia Helena Furtado *et al.* Preservation of goat preantral follicles in saline or coconut water solution. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 6, p. 324-330, 2002.
- COWLEY, R. Adams *et al.* Pathophysiology of shock, anoxia, and ischemia. **Critical Care Medicine**, v. 10, n. 7, p. 489, 1982.
- DORTA, Marcel P. *et al.* Quantification of alignment of vascular smooth muscle cells. **Cytometry Part A**, v.10, n. 5., 2018.
- HALL, John E. **Guyton e Hall, Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2017.

HAMEED, Ahmer M. *et al.* Maximizing kidneys for transplantation using machine perfusion: from the past to the future: A comprehensive systematic review and meta-analysis. **Medicine**, v. 95, n. 40, 2016.

JACKSON, William F. Potassium channels in regulation of vascular smooth muscle contraction and growth. In: _ **Advances in Pharmacology**. Academic Press, 2017. p. 89-144.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa *et al.* **Histologia basica**: texto y atlas. São Paulo: Editorial Médica Panamericana, 2015.

KOEPPEN, Bruce M.; STANTON, Bruce A. **Berne and Levy physiology e-book**. Rio de Janeiro: Elsevier Health Sciences, 2017.

KRISTEK, František; TÖRÖK, Jozef; ŠIKULOVÁ, Jana. Morphological and functional alterations in endothelium, smooth muscle, and nerve fibers in rabbit aorta after storage at 4° C. **Cryobiology**, v. 30, n. 4, p. 376-385, 1993.

LATCHANA, Nicholas *et al.* Preservation solutions for cardiac and pulmonary donor grafts: a review of the current literature. **Journal of thoracic disease**, v. 6, n. 8, p. 1143, 2014.

LIMA-GONÇALVES, E.; BEVILACQUA, R. G.; MACHADO, M. C. C; Monteiro da Cunha, JE; Goncalvez, Y.; Bastos, ES 8 c Raia, AA - Aspectos da função hepatocitária em transplantes de fígado experimentais e humanos. **Rev. Assi. med. bras**, v. 16, p. 89-94, 1970.

MANAA, J. *et al.* The effect of cryopreservation on the structural and functional properties of human vascular allografts. **La Tunisie medicale**, v. 81, p. 645-651, 2003.

MARTINEZ, J. A. *et al.* Preserved vascular homograft for revascularisation of paediatric liver transplant. A Clinical, Histological, and Bacteriological Study. **Transplantation**, v. 68, n. 5, p. 672-677, 1999.

MARTINSEN, Anneloes; DESSY, Chantal; MOREL, Nicole. Regulation of calcium channels in smooth muscle: New insights into the role of myosin light chain kinase. **Channels**, v. 8, n. 5, p. 402-413, 2014.

MCINTYRE, C. A. *et al.* Preservation of vascular function in rat mesenteric resistance arteries following cold storage, studied by small vessel myography. **British journal of pharmacology**, v. 123, n. 8, p. 1555-1560, 1998.

MORARIU, Aurora M. *et al.* Hyperaggregating effect of hydroxyethyl starch components and University of Wisconsin solution on human red blood cells: a risk of impaired graft perfusion in organ procurement?. **Transplantation**, v. 76, n. 1, p. 37-43, 2003.

NECROSE: Texto de apoio. Campinas, SP, 2018. Disponível em:
<<http://anatpat.unicamp.br/tanecrose1.html>>, Acesso em: 23 maio 2018.

NOGUEIRA RDM; VASCONCELOS PRL. Coconut water as culture medium in storage corneal medium: experimental study in rabbits. **Rev.Bras. Oftalmol**, v. 59, n. 6, p. 395-401, jun. 2000.

NUNES, J. F. A inseminação artificial como método alternativo para o melhoramento da caprinocultura leiteira. In: PROCEEDINGS. SIMPÓSIO DA CAPRINOCULTURA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 1986. Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro. UFRJ, 1986, p.15.

NUNES, José Ferreira; DE MELLO SALGUEIRO, Cristiane Clemente. Utilização da água de coco como diluidor de sêmen de caprinos e ovinos. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 1, n. 1, 2009.

O'CALLAGHAN J.; LEUVENINK, H. G. D.; FRIEND, P.J.; PLOEG, R.J. **Kidney preservation: principle and practice**. 7. ed. São Paulo: Elsevier, 2013.

O'CALLAGHAN, J. M. *et al.* Systematic review and meta-analysis of hypothermic machine perfusion versus static cold storage of kidney allografts on transplant outcomes. **British Journal of Surgery**, v. 100, n. 8, p. 991-1001, 2013.

PAIVA, Therezinha Bandiera; FARIAS, Nelson Carvalho. Mecanismos da contração do músculo liso vascular. **075 Measuring blood pressure: the importance of understanding variation**, v. 12, n. 2, p. 89-92, 2005.

ROSS, Michael H.; PAWLINA, Wojciech; BARNASH, Todd A. **Atlas de histologia descritiva**. São Paulo: Artmed Editora, 2016.

RZUCIDLO, Eva M.; MARTIN, Kathleen A.; POWELL, Richard J. Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. **Journal of vascular surgery**, v. 45, n. 6, p. A25-A32, 2007.

SAAD, William Abrão; CHAIB, Eleazar; D'ALBUQUERQUE, Luiz Augusto Carneiro. **Atlas de cirurgia do fígado**. São Paulo: Artmed Editora, 1998.

SALGUEIRO, C. C. M. *et al.* Utilização de diluentes à base de água de coco in natura e em pó, na inseminação artificial programada de cabras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 1, n. 5, p. 96-98, 2002.

SALGUEIRO, CCM *et al.* Inseminação artificial de ovelhas com sêmen diluído em meio à base de água de coco em pó (ACP-102) ou TRIS, resfriado e mantido a 4 C por 24 horas. In: XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2007, Curitiba, PR. **Anais ...** Belo Horizonte, CBRA, 2007. p.126.

SELLERS, Marty T. *et al.* Use of preserved vascular homografts in liver transplantation: hepatic artery aneurysms and other complications. **American Journal of Transplantation**, v. 2, n. 5, p. 471-475, 2002.

SILVA, A. E. F. *et al.* The Influence of Powdered Coconut Water (ACP-318®) in In Vitro Maturation of Canine Oocytes. **Reproduction in domestic animals**, v. 45, n. 6, p. 1042-1046, 2010.

SILVA, Claudia Freires da. **Avaliação da eficiência das soluções de Belzer (UW) e Celsior® no 2009 transplante pancreático**. 2009. 53f. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2009.

SILVERTHORN, Dee Unglaub. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. São Paulo: Artmed, 2010.

SOUTHARD, MD, James H.; BELZER, MD, Folkert O. Organ preservation. **Annual review of medicine**, v. 46, n. 1, p. 235-247, 1995.

SRINIVASAN, Parthi *et al.* Living related liver transplantation in biliary atresia with absent inferior vena cava. **Liver Transplantation**, v. 7, n. 4, p. 376-377, 2001.

STARZL, Thomas E. History of liver and other splanchnic organ transplantation. **Contemporary liver transplantation: the successful liver transplant program**, v. 30, n.2, p. 1-28, 2016.

VIVARELLI, Marco *et al.* Successful arterial revascularization in liver transplantation using a cryopreserved arterial allograft. **Transplantation**, v. 77, n. 5, p. 792, 2004.

WAGENSEIL, Jessica E.; MECHAM, Robert P. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. **Physiological reviews**, v. 89, p. 957-989, 2009.

WATSON, C. J. E. *et al.* Cold machine perfusion versus static cold storage of kidneys donated after cardiac death: a UK multicenter randomized controlled trial. **American Journal of Transplantation**, v. 10, n. 9, p. 1991-1999, 2010.

WEBB, R. Clinton. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in physiology education**, v. 27, n. 4, p. 201-206, 2003.

WIEDEMANN, Dominik *et al.* Impact of cold ischemia on mitochondrial function in porcine hearts and blood vessels. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 11, p. 22042-22051, 2013.

WILLE, Timo; DE GROOT, Herbert; RAUEN, Ursula. Improvement of the cold storage of blood vessels with a vascular preservation solution. Study in porcine aortic segments. **Journal of vascular surgery**, v. 47, n. 2, p. 422-431, 2008.

WILSON, Colin H. *et al.* Evaluation of eight preservation solutions for endothelial in situ preservation. **Transplantation**, v. 78, n. 7, p. 1008-1013, 2004.

YUAN, Xiaodong *et al.* Machine perfusion or cold storage in organ transplantation: indication, mechanisms, and future perspectives. **Transplant international**, v. 23, n. 6, p. 561-570, 2010.

ZATSCHLER, Birgit *et al.* Improved vessel preservation after 4 days of cold storage: experimental study in rat arteries. **Journal of vascular surgery**, v. 50, n. 2, p. 397-406, 2009.

ANEXO

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

HOSPITAL GERAL DE
FORTALEZA/SUS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: SOLUÇÃO DE CONSERVAÇÃO DE TECIDO VASCULAR PARA TRANSPLANTE

Pesquisador: Jerônimo Azevedo e Sá Junior

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 72663317.0.0000.5040

Instituição Proponente: Hospital Geral de Fortaleza/SUS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.209.869

Apresentação do Projeto:

Pesquisa experimental com tecido que serão descartados de doador cadáver de órgãos, com estimativa de 10 (dez) amostras. O material será coletado quando for ser realizado a captação do órgão a ser doado. Será realizado no Hospital Geral de Fortaleza, no serviço de transplante, será obtido pela cirurgiã que orienta esta pesquisa. Será dividido em dois grupos denominados grupo UW (com solução da Universidade de Wisconsin) e grupo ACP (com solução à base de água de coco). As artérias serão submetidas a análise de reatividade muscular em seus segmentos anelares nos tempos de preservação 48h, 7 dias, 14 dias e 28 dias. A análise será feita na Universidade Estadual do Ceará (UECE), onde o pesquisador realiza seu mestrado.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Objetivo Geral: Analisar a viabilidade dos tecidos vasculares preservados em solução à base de água de coco em pó.

Objetivo Secundário:

(a) Avaliar a qualidade da preservação em solução de água de coco em pó com base na análise histopatológica, em microscopia eletrônica e no estudo da funcionalidade fisiológica de contratilidade muscular; (b) Avaliar os resultados obtidos

Endereço: Rua Avila Goulart, nº 900

Bairro: Papicú

CEP: 60.155-290

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3101-7078

Fax: (85)3101-3163

E-mail: cep@hgf.ce.gov.br

HOSPITAL GERAL DE
FORTALEZA/SUS



Continuação do Parecer: 2.209.869

pela preservação em solução de água de coco em pó quando comparado com a solução padrão de Wisconsin; (c) Avaliar criação de modelo, em humanos, para transplantes de artérias e veias utilizando a ACP como solução de preservação.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo o pesquisador:

Riscos:

Contaminação do material

Benefícios:

Identificação de solução de preservação de tecidos e órgãos de baixo custo

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante e de interesse para a área de transplante. O pesquisador necessita observar o tempo da coleta dos dados, talvez haja necessidade de estender um pouco mais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentou: Folha de rosto, anuência do chefe do serviço, aprovação do SEAP, cronograma e orçamento.

Recomendações:

Observar tempo da coleta dos dados.

Melhorar a metodologia.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoJeronimo.docx	09/08/2017 07:09:07	Ilvana Lima Verde Gomes	Aceito
Outros	autorizacaoJeronimo.pdf	04/08/2017 11:48:37	Ilvana Lima Verde Gomes	Aceito

Endereço: Rua Ávila Goulart, nº 900
Bairro: Papicú **CEP:** 60.155-290
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3101-7078 **Fax:** (85)3101-3163 **E-mail:** cep@hgf.ce.gov.br

Ilvana

HOSPITAL GERAL DE
FORTALEZA/SUS



Continuação do Parecer: 2.209.869

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_962693.pdf	04/08/2017 11:17:15		Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	02/08/2017 14:35:52	Jerônimo Azevedo e Sá Junior	Aceito
Orçamento	orcamento.docx	26/07/2017 16:53:05	Jerônimo Azevedo e Sá Junior	Aceito
Outros	MemorandoSEAP.docx	26/07/2017 16:51:41	Jerônimo Azevedo e Sá Junior	Aceito
Folha de Rosto	FolhaderostoJeronimo.docx	26/07/2017 16:50:40	Jerônimo Azevedo e Sá Junior	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Jeronimo.docx	26/07/2017 16:47:14	Jerônimo Azevedo e Sá Junior	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 09 de Agosto de 2017

Assinado por:
Ivana Lima Verde Gomes
(Coordenador)

Ivana Lima Verde Gomes
Coord. do Comitê de Ética
em Pesquisa do HGF

Endereço: Rua Avila Goulart, nº 900
Bairro: Papicú CEP: 60.155-290
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3101-7078 Fax: (85)3101-3163 E-mail: cep@hgf.ce.gov.br