



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA
EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL**

RAQUEL LIMA SAMPAIO

**PRESERVAÇÃO DE FÍGADO DE COELHO UTILIZANDO AS SOLUÇÕES
SPS-1 E BIOPRODUTO À BASE DE ÁGUA DE COCO**

FORTALEZA – CEARÁ

2018

RAQUEL LIMA SAMPAIO

PRESERVAÇÃO DE FÍGADO DE COELHO UTILIZANDO AS SOLUÇÕES
SPS-1 E BIOPRODUTO À BASE DE ÁGUA DE COCO

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

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

Área de Concentração: Biotecnologia.

FORTALEZA – CEARÁ

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Lima Sampaio, Raquel .

Preservação de fígado de coelho utilizando as soluções SPS-1 e bioproduto à base de água de coco. [recurso eletrônico] / Raquel Lima Sampaio. ? 2018. 1 CD-ROM. 11. ; 4 ? pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 71 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (12 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. Biotecnologia.

Orientação. Prof.^a Dra. Ivelise Regina Camilo Brasil..

1. Preservação de órgãos.. 2. Transplante hepático.. 3. Água de coco em pó.. 4. Solução de preservação.. I. Título.

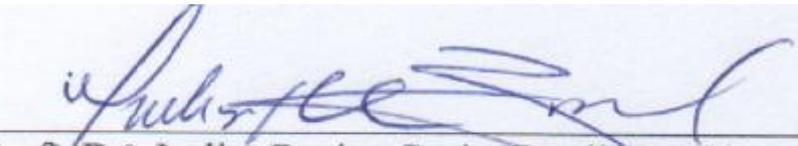
RAQUEL LIMA SAMPAIO

PRESERVAÇÃO DE FÍGADO DE COELHO UTILIZANDO AS SOLUÇÕES
SPS-1 E BIOPRODOTO À BASE DE ÁGUA DE COCO

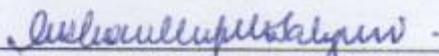
Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: 27 de dezembro de 2018.

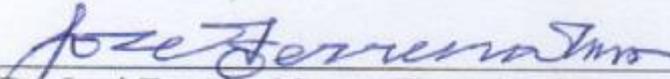
BANCA EXAMINADORA



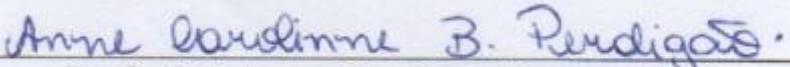
Prof.^a Dr.^a Ivelise Regina Canito Brasil (Presidente)
UECE (Universidade Estadual do Ceará)



Prof.^a Dr.^a Cristiane Clemente de Mello Salgueiro
(Examinador)
UECE (Universidade Estadual do Ceará)



Prof. Dr. José Ferreira Nunes (Examinador)
UECE (Universidade Estadual do Ceará)



Prof.^a Dr.^a Anne Carolinne Bezerra Perdigão
(Examinador)
UNICHRISTUS (Centro Universitário Christus)

Aos meus pais: Maria Francisca e
Antônio Gilson.

Aos falecidos Sr. Antônio Viana e Sr.^a
Marcelina.

Aos queridos Sr. Antônio Barros e Sr.^a
Graça Balbino.

AGRADECIMENTOS

À minha querida mãe, pelo apoio incondicional e por ser minha consciência e foco em todos os momentos da minha vida.

Ao Prof. Dr. José Ferreira Nunes, pela visão aquilina ao idealizar o Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal (MPBiotec).

À Prof.^a Dr.^a Cristiane Clemente de Mello Salgueiro, pela disponibilidade e presteza em sanar nossos diversos questionamentos e que, junto ao professor Nunes, idealizou o MPBiotec.

À Prof.^a Dr.^a Ivelise Regina Canito Brasil, pela competência, visão progressista e pela ajuda incomensurável em toda a realização deste projeto. Sem sua inspiração e apoio, não teria sido possível.

Aos meus colegas do MPBiotec, pelo companheirismo nos momentos de dificuldade e de descontração.

Ao Dr. João Paulo Uchôa Fontenele, pela atenção e competência nas análises patológicas.

Ao Dr. Rômulo Augusto da Silveira, pela oportunidade de fazer parte deste seleto grupo de profissionais e pelas palavras de sabedoria que só a experiência ensina.

Aos professores do MPBiotec, pelos ensinamentos e pela orientação nas diversas disciplinas.

Aos acadêmicos Samuel Roque Alves, Lucas Medeiros Lopes, Bianca Rohsner Bezerra e Igor Farias, ao colega de mestrado Rômulo da Costa Farias e ao Doutorando Marcimar Silva Sousa, pela participação ativa na realização dos experimentos, imprescindível ao nosso êxito.

“A excelência é um hábito e não um ato”.

(Aristóteles)

RESUMO

A preservação do enxerto é um ponto crucial no manejo do transplante, sendo um dos fatores determinantes para uma evolução cirúrgica favorável. Existem inúmeros pontos preocupantes nesse processo, porém o ponto de maior relevância é a redução do tempo de isquemia fria e diminuição da lesão de reperfusão. É nesse momento que as soluções de preservação guardam sua importância. A busca pela solução ideal é constante, existindo no mercado atualmente várias soluções como: HTK, Euro-Collins, Wisconsin, Celsior, SPS-1, porém, todas com alto custo. Este estudo teve como objetivo analisar a preservação morfológica de tecido hepático de coelho após conservação estática em solução hipotérmica à base de água de coco em pó. Os experimentos foram realizados no Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) da Universidade Estadual do Ceará (UECE) utilizando-se a solução SPS-1 como padrão e uma solução à base de água de coco em pó (ACP-405). Foi realizada perfusão *in situ* dos fígados de 10 coelhos, retirada dos órgãos e manutenção nas respectivas soluções hipotérmicas em tempos pré-determinados. Constatou-se que, após avaliação histopatológica nos tempos 0h, 6h, 12h e 18h de isquemia fria, a preservação utilizando solução ACP-405 pode ser viável. A partir dos resultados positivos, estudos deverão ser direcionados no intuito de estudar a viabilidade funcional do órgão associada a um modelo de reperfusão *in vitro*.

Palavras-chave: Preservação de órgãos. Transplante hepático. Água de coco em pó. Solução de preservação.

ABSTRACT

Graft preservation is a crucial point in the management of transplantation, being one of the determining factors for a favorable surgical evolution. There are many worrying points in this process, but the point of greatest relevance is the reduction of cold ischemia time and reduction of the reperfusion injury. It is at this point that preservation solutions remain important. The search for the ideal solution is constant, there are currently several solutions in the market such as HTK, Euro-Collins, Wisconsin, Celsior, SPS-1 but all with a high cost. This study aimed to analyze the morphological preservation of hepatic rabbit tissue after static conservation in a hypothermic solution based on powdered coconut water. The experiments were carried out at the Integrated Nucleus of Biotechnology (NIB) of the State University of Ceará (UECE) using the SPS-1 solution as standard and a solution of coconut water powder (ACP-405). In situ perfusion of the livers of 10 rabbits, removal of the organs and maintenance in the respective hypothermic solutions at predetermined times. It was found that, after histopathological evaluation at 0h, 6h, 12h and 18h times of cold ischemia, preservation using ACP-405 solution may be feasible. From the positive results, studies should be directed in order to study the functional viability of the organ associated with an in vitro reperfusion model.

Keywords: Preservation of organs. Liver transplantation. Coconut water powder. Preservation solution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Tecido hepático normal, HE, 100x.....	24
Figura 2 -	Aspectos morfológicos do tecido hepático com alterações degenerativas. Corpos acidófilos com núcleos picnóticos e citoplasma vacuolar. HE, 100x.....	25
Figura 3 -	Tecido hepático subcapsular com focos de necrose confluyente. Corpos acidófilos com núcleos picnóticos. HE, 40x.....	25
Figura 4	Aspectos morfológicos do tecido hepático com alterações degenerativas. Corpos acidófilos com núcleos picnóticos e citoplasma vacuolar. HE, 100x	26
Figura 5 -	Distribuição dos animais conforme solução de preservação avaliada.....	37
Figura 6 -	Aorta abdominal (seta amarela) e veia cava inferior (seta branca).....	39
Figura 7 -	Estruturas vasculares isoladas e reparadas. Nota-se a aorta abdominal (seta branca), a veia cava inferior (seta preta) e a veia mesentérica superior (seta amarela).....	40
Figura 8 -	Aorta infradiafragmática (seta amarela).....	41
Figura 9 -	Estruturas vasculares canuladas: aorta abdominal (seta amarela) e veia mesentérica superior (seta branca), procedimento padrão para perfusão de múltiplos órgãos....	42

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição da solução ViaSpan®	27
Quadro 2 - Comparação entre os constituintes das soluções UW e ViaSpan®.....	28
Quadro 3 - Composição bioquímica da água de coco em pó (ACP) por 100g	31
Quadro 4 - Composição ACP-405.....	35
Quadro 5 - Análise morfológica e classificação do grau de injúria das amostras preservadas em solução ACP reconstituída conforme o tempo	52
Quadro 6 - Análise morfológica e classificação do grau de injúria das amostras preservadas em solução SPS-1 reconstituída conforme o tempo	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Constituição da solução SPS-1	28
Tabela 2 -	Catálogo das amostras conforme numeração do animal e tempo de análise de isquemia fria na solução SPS-1.....	44
Tabela 3 -	Catálogo das amostras conforme numeração do animal e tempo de análise de isquemia fria na solução ACP.....	44
Tabela 4 -	Distribuição dos valores de soma entre os tipos de solução.....	53

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Comparação no tempo “zero” entre os escores histopatológicos finais nas soluções SPS-1 e ACP.....	48
Gráfico 2 - Comparação no tempo 6h entre os escores histopatológicos finais nas soluções ACP e SPS-1.....	49
Gráfico 3 - Comparação no tempo 12h entre os escores histopatológicos finais nas soluções ACP e SPS-1.....	50
Gráfico 4 - Comparação no tempo 18h entre os escores histopatológicos finais nas soluções ACP e SPS-1.....	51
Gráfico 5 - Comparação no tempo 18h entre os escores histopatológicos finais nas soluções ACP e SPS-1.....	54
Gráfico 6 - Comparação dos escores histopatológicos em todos os tempos nas soluções SPS-1 e ACP	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTO -	Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
ACP -	Água de Coco em pó
ALT -	Alanina Transferase
AST -	Amino-Aspartato Transferase
ATP -	Trifosfato de Adenosina
ATPase -	Adenosinatrifosfatases
Bomba Na/K -	Bomba de Sódio-Potássio
CCA -	Centro de Ciências Agrárias
CEUA -	Comissão Ética no Uso de Animais
COBEA -	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EP -	Espaço Porta
EUA -	Estados Unidos da América
FDA -	<i>Food and Drug Administration</i>
HE -	Hematoxilina-Eosina
HES -	Hidroxietilamido
HMP -	Máquina de Perfusão Hipotérmica
HTK -	Histidina-Triptofano-Cetoglutarato
IGL -	Instituto Georges Lopez
IPADE -	Instituto para Desenvolvimento da Educação
IRI -	Injúria de isquemia/reperfusão
LDH -	Lactato Desidrogenase
MP -	Máquina de Perfusão
NIBE -	Núcleo Integrado de Biotecnologia
NMP -	Máquina de Perfusão Normotérmica
PEG -	Polietilenglicol
PNF -	Disfunção Primária do Enxerto
SCOT -	Conservação de Tecidos e Órgãos Solução
SNMP -	Máquina de Perfusão Subnormotérmica
SPS-1	Solução de Preservação Estática 1
TxH -	Transplante Hepático
UECE -	Universidade Estadual do Ceará
UFC -	Universidade Federal do Ceará

UNICHRISTUS - Centro Universitário Christus

UW - Universidade de Wisconsin

VCL - Veia Centrolobular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	TRANSPLANTE HEPÁTICO.....	16
2.2	ASPECTOS DA PRESERVAÇÃO DO ENXERTO.....	17
2.3	PRINCÍPIOS DA PRESERVAÇÃO.....	18
2.4	ARMAZENAMENTO FRIO ESTÁTICO.....	19
2.4.1	Resfriamento	19
2.4.2	Soluções de preservação	20
2.5	PRESERVAÇÃO DINÂMICA.....	21
2.6	INJÚRIA POR ISQUEMIA FRIA.....	23
2.7	SOLUÇÃO DE BELZER OU UW: SOLUÇÃO PADRÃO.....	26
2.8	ÁGUA DE COCO.....	29
3	OBJETIVOS	33
3.1	GERAL.....	33
3.2	ESPECÍFICOS.....	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	OS MODELOS ANIMAIS.....	34
4.2	AS SOLUÇÕES.....	34
4.3	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	38
4.4	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	44
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5	RESULTADOS	47
5.1	ANÁLISE NO TEMPO “ZERO”.....	47
5.2	ANÁLISE NO TEMPO 6 HORAS (h).....	48
5.3	ANÁLISE NO TEMPO 12 HORAS.....	49
5.4	ANÁLISE NO TEMPO 18 HORAS.....	50
5.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
6	DISCUSSÃO	55
7	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXO	71

1 INTRODUÇÃO

A preservação do enxerto é um ponto crucial no manejo do transplante, sendo um dos fatores determinantes para uma evolução cirúrgica favorável. Existem inúmeros pontos preocupantes nesse processo, porém o ponto de maior relevância é a redução do tempo de isquemia fria e diminuição da lesão de reperfusão. É nesse momento que as soluções de preservação guardam sua importância. A busca pela solução ideal é constante, existindo no mercado atualmente várias soluções como Histidina-Triptofano-Cetoglutarato (HTK), Euro-Collins, Wisconsin, Celsior, porém, todas ainda com alto custo (LATCHANA et al., 2015).

Vários meios têm sido pesquisados na perspectiva de substituir estas soluções ou alguns de seus componentes de forma a reduzir o custo na preparação das mesmas. Neste cenário, uma solução interessante é a água de coco, pois se trata de isotônico natural com propriedades bioquímicas favoráveis para este objetivo (CAMPBELL-FALK et al., 2000).

Devido a estas propriedades e a vários estudos demonstrando resultados positivos no potencial da água de coco como solução eficaz na preservação de células, somado ao fato deste líquido ter um baixo custo e qualidades químicas desejáveis, o objetivo deste estudo é verificar a eficácia da água de coco quando utilizada como solução de preservação do fígado (COSTA et al., 2002; SILVA et al., 2010).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.2 TRANSPLANTE HEPÁTICO

O transplante de fígado (TxH) é uma opção de tratamento estabelecida e bem-sucedida para pacientes com insuficiência hepática terminal, com sobrevida em 5 anos acima de 70%. Apesar desse sucesso, as complicações precoces persistem (KEEFFE, 2001).

Embora a disfunção primária (PNF) seja imediatamente evidente, aproximadamente outros 15% dos receptores de transplante hepático sofrem disfunção progressiva do enxerto, que culmina com a morte ou a necessidade de retransplante no primeiro ano (ALI et al., 2015).

A sobrevida melhorou consideravelmente através do avanço da imunossupressão pós-transplante e do tratamento e controle das doenças infecciosas (WIESNER et al., 2003).

No Brasil, com relação aos transplantes de órgãos, no primeiro semestre de 2018, em relação a 2017, houve diminuição nos transplantes renais (3,7%) e cardíacos (0,5%) e aumento nos transplantes de pulmão (16,1%), pâncreas (3,6%) e fígado (2,6%) (ABTO, 2018).

A despeito do aumento no número de TxH, a mortalidade de pacientes aguardando em lista permanece entre 5-10% com um longo período de espera (MUHLBACHER; LANGER; MITTERMAYER, 1999).

A primeira publicação sobre a realização do transplante hepático data de 1955, quando Welch realizou transplantes de fígado heterotópicos em cães (STARLZ, 2002).

O primeiro transplante de fígado em humanos foi realizado por Starzl, em 10 de março de 1963, com desfecho desfavorável, porém o tempo de isquemia total foi de 8 horas. Após análise histopatológica do enxerto, percebeu-se um grau acentuado de autólise, concluindo-se que o tempo de isquemia e a viabilidade do mesmo seriam elementos cruciais para o sucesso do procedimento (GREZZANA FILHO, 2003).

Na década de oitenta ocorreu um aprimoramento nas técnicas cirúrgicas, na anestesia, na seleção dos pacientes e nos cuidados pós-operatórios, o que possibilitou uma maior sobrevivência dos pacientes transplantados. Em 1978, Sir Roy Calne iniciou a utilização da ciclosporina no transplante experimental, identificando-a como potente agente imunossupressor, e em 1980, Jean Borel popularizou-a, ponto chave na história do transplante hepático (WILLIAMS, 1990; MEINE, 2005).

Em 1983 o *National Health Institute* fundamentou o transplante hepático como terapia estabelecida, removendo seu caráter experimental (MADREY; SCHIFF; SORREL, 2001).

Dados do Registro Brasileiro de Transplantes também mostram que em 2015, o Ceará realizou 1.433 procedimentos, 34 a mais que o recorde anterior, de 1.399 transplantes em 2014 (ABTO, 2016).

2.2 ASPECTOS DA PRESERVAÇÃO DO ENXERTO

A preservação do órgão é um ponto crucial no manejo do transplante, sendo um dos fatores determinantes para uma evolução cirúrgica favorável. Além dos mecanismos imunológicos de rejeição do enxerto, o resultado do transplante hepático também é limitado pela injúria de isquemia-reperfusão (IRI) (BEJAOUI et al., 2015).

A IRI é um processo multifatorial resultante primordialmente da lesão sofrida pelo enxerto durante a fase de armazenamento em soluções de preservação (isquemia fria), decorrente do consumo energético, e da produção de agentes oxidantes durante a reperfusão do mesmo (GUAN et al., 2014).

A redução da IRI é o alvo de importantes pesquisas em transplante, pois está diretamente relacionada à disfunção primária do enxerto, o que permanece como um dos problemas mais críticos no processo de transplantação hepática (BEJAOUI et al., 2015).

Várias estratégias são utilizadas para reduzir tais danos, sendo uma das mais comuns o resfriamento rápido em soluções de preservação. Alguns avanços como o desenvolvimento de novas soluções de preservação e, mais recentemente, a criação de uma máquina de perfusão, tem contribuído para a redução da IRI (McANULTY, 2010; GUIBERT et al., 2011; GRAHAM; GUARRERA, 2014).

2.3 PRINCÍPIOS DA PRESERVAÇÃO

Qualquer técnica de preservação deve promover proteção funcional satisfatória ao órgão, durante o período de interrupção do seu fluxo sanguíneo; desde a sua retirada do doador, até o seu implante e a reperfusão no receptor (JAMIESON, 1999).

No caso do tecido hepático, a retirada segura do fígado, permitindo um armazenamento adequado e técnicas de preservação, é imprescindível para mantê-lo em condições ideais. É essencial que a função orgânica viável seja restabelecida imediatamente após a revascularização do órgão (CLAVIEN; HARVEY; STRASBERG, 1992; MEINE, 2005).

Os princípios gerais de proteção de órgãos em isquemia total são: inibição de acidose inevitável (intra e extracelular) e prevenção de valores de pH críticos; manutenção do volume de todas as células, especialmente de células endoteliais; regulação do uso de recursos de energia anaeróbios; inibição reversível de processos não vitais; e manutenção de estrutura morfológica, os quais manterão a função dos órgãos prontamente após a sua reperfusão nos receptores (BRETSHNEIDER, 1980; HOLSCHER; GROENEWOUD, 1991; LI et al, 2015; FREITAS et al., 2017).

A ausência de fluxo sanguíneo, na fase de isquemia fria, leva à hipóxia tecidual. Essa hipóxia determina anaerobiose, com consumo dos fosfatos intracelulares, disfunção da bomba sódio/potássio como consequência, levando a edema celular (MEINE, 2005; LI et al, 2015).

2.4 ARMAZENAMENTO FRIO ESTÁTICO

O armazenamento frio estático é o método mais utilizado atualmente para preservação de órgãos e visa à redução do dano isquêmico diminuindo o metabolismo através da hipotermia. Realiza-se a infusão da solução de preservação escolhida e então resfria-se o órgão estaticamente (MCANULTY, 2010; BEJAOU et al., 2015).

2.4.1 Resfriamento

Existem diversas pesquisas para desenvolvimento de técnicas de resfriamento que possibilitem a preservação prolongada do enxerto (FAHY et al., 2004; FULLER et al., 2013).

Entretanto, o resfriamento puro tem demonstrado resultados desapontadores. Estudos têm demonstrado que ocorre uma diminuição de cerca de doze vezes na atividade enzimática como resultado da redução na temperatura do fígado de 37° para 0°C. Essa visão, contudo, subestima a complexidade físico-química das interações metabólicas no órgão hipotérmico e os efeitos próprios do resfriamento sobre esses processos interativos. A hipotermia pode provocar falha na homeostase, que mantém o volume celular e a permanência da atividade enzimáticas como a bomba de Na-K-ATPase (MEINE, 2005).

Em um estudo de Berendsen et al. (2014), a combinação de “super-resfriamento” (preservação a frio a -6°C) com outros parâmetros alcançou a preservação efetiva de enxertos de fígado por até 4 dias. Esta técnica promissora compreende três etapas: primeiro, “super-resfriamento” do órgão a -6°C para reduzir o metabolismo celular; segundo, subnormotérmico a 21°C, que reinicia o metabolismo e repõe os níveis de ATP, e terceiro, o uso de dois conservantes, 3-O-metil-D-glucose e polietileno -glicol 35 (peG).

Todas essas condições são imprescindíveis para o alcance do sucesso no transplante de fígado (LEAKE, 2014).

2.4.2 Soluções de preservação

O resfriamento é parte vital no processo de preservação dos tecidos, entretanto, como exposto previamente, existem efeitos deletérios relacionados. Devido a isso, foram criadas as soluções de preservação, que visam à redução do dano causado pela hipotermia. A busca pela solução ideal é constante, objetivando a maior proteção possível ao dano isquêmico, como o edema celular e distorções do citoesqueleto (MARSH et al., 1989; STEFANOVICH et al., 1995; EL-WAHSH, 2007).

Na década de 70, foi desenvolvida a solução Euro-Collins como uma solução com alta concentração sódio-potássio e utilização de glicose. Essa composição para as células hepáticas leva a uma limitação importante devido à permeabilidade dessas células à glicose. A consequência bioquímica é que o influxo de glicose causa perda do efeito osmótico da solução, além de precipitar o uso da glicose como combustível para anaerobiose, piorando a acidez intracelular (BEJAOUI et al., 2015).

Em 1987, a Solução da Universidade de Wisconsin (UW) foi introduzida. Até este período, era possível preservar adequadamente os órgãos por um período de apenas 4 horas, o que tornava o transplante um procedimento de caráter emergencial. O uso da solução de preservação UW aumentou o tempo de preservação do órgão de 6 para 16 horas (SOUTHARD; BELZER, 1995).

A partir deste momento, grandes modificações ocorreram nos procedimentos de transplante e UW é hoje considerada a solução de preservação padrão com efeito na prevenção da acidose intracelular, mantendo o metabolismo energético e protegendo contra ação das substâncias reativas ao oxigênio (GARRERA; KARIM, 2008; CAMACHO, 2010).

Estes efeitos benéficos devem-se, principalmente, a presença de impermeantes (lactibionato, rafinose), hidroxietilamida, insulina, antioxidantes (glutathiona) e precursores do ATP (adenosina) (SOUTHARD; BELZER, 1996).

As desvantagens incluem a presença de hidroxietilamido (HES) como suporte oncótico, que tem sido associado à alta viscosidade sanguínea e consequente saturação tecidual. Como resultado, a lavagem do sangue do enxerto e o fluxo sanguíneo durante a reperfusão podem estar reduzidos (MORARIU et al., 2003; ZAOUALI et al., 2010).

Além disso, a alta concentração de potássio (K⁺) está associada à despolarização celular e ativação de canais dependentes de voltagem (BEN ABDENNEBI et al., 1998) .

Os problemas causados por HES e K⁺ levaram ao desenvolvimento de outras soluções de preservação sem agentes oncóticos como Celsior e HTK (Custodiol) e outros com pEG como agente oncótico, como a solução do Instituto Georges Lopez (IGL-1) e Conservação de Tecidos e Órgãos Solução (SCOT) (BEJAOUI et al., 2015).

Olschewski et al. (2008) apontam que a solução histidina-triptofano-cetoglutarato (HTK) apresenta cerca de um terço da viscosidade da UW e que o uso combinado de ambas soluções a 4°C apresenta resultado superior, na manutenção da microcirculação hepática, se comparado com uso individual de cada uma das soluções.

A busca por uma solução de preservação que seja mais barata e tão eficaz quanto a UW, tem sido desejada e, apesar das novas soluções, a composição ideal ainda não foi atingida. Atualmente, a solução UW é ainda a solução de preservação mais usada no mundo, no transplante hepático (JIA et al., 2015).

2.5 PRESERVAÇÃO DINÂMICA

A máquina de perfusão (MP) consiste em criar um fluxo de recirculação controlada de solução de preservação através do órgão usando uma bomba. Esta perfusão permite uma melhor penetração da solução de conservação, uma lavagem completa do sangue e equilíbrio do interstício com o meio perfusado, fornecimento de oxigênio e nutrientes (se o perfusado é oxigenado) e remoção de metabólitos tóxicos (quando o perfusado é

renovado ou filtrado). Além disso, permite monitoramento em tempo real do desempenho funcional e bioquímico do enxerto e fornecimento de suporte metabólico durante a preservação (TAYLOR; BAICU, 2010).

O termo 'máquina de perfusão' é bem amplo, envolvendo um espectro de técnicas que têm o mecanismo de perfusão como seu denominador comum. A configuração das máquinas de perfusão depende essencialmente de três parâmetros: a duração de aplicação; a temperatura da perfusão; e a pressão de perfusão (WEEDER; VAN RIJN; PORTE, 2015).

As máquinas de perfusão mostram-se estatisticamente superiores em relação ao armazenamento frio estático na manutenção da viabilidade dos enxertos. Ademais, durante o processo de perfusão com uso da máquina de perfusão, é possível avaliar a viabilidade do órgão por meio de diversos parâmetros (alanina transferase (ALT), amino-aspartato transferase (AST), lactato desidrogenase e β -galactosidase, glutathiona-S-transferase, glutamato desidrogenase, ácido hialurônico, glutathiona hepática, alanina e histidina, mensuração de resistência vascular hepática) (NEBRIG; NEUHAUS; PASCHER, 2014).

Diferentemente do rim, o protocolo de MP para o fígado é determinado principalmente pela temperatura de preservação: hipotérmica (HMP) a 4°C, normotérmica (NMP) a 37°C e subnormotérmica (SNMP) a 20°C – 25°C. Além disso, vários fluxos e pressões (pulsáteis ou não), perfusão simples ou dupla (artéria hepática e veia porta), oxigenação ou não oxigenação e diferentes composições de solução de MP foram testados em vários modelos experimentais de enxerto hepático (BALFOUSSIA et al., 2012).

A máquina de perfusão hipotérmica (HMP) foi inicialmente proposta por Belzer no início da década de 1960. A HMP reduz significativamente a expressão de marcadores de IRI, todavia, ainda se observam danos endoteliais dos enxertos submetidos a HMP (JIA et al., 2015).

A máquina de perfusão normotérmica (NMP) é um tipo de máquina de perfusão que fornece oxigênio e outros substratos metabólicos sob

condições normotérmicas (entre 36 e 37,5°C) (JIA et al., 2015).

A NMP evita isquemia fria, mantém a função hepática, monitora a função do enxerto em tempo real pelo fluxo de produção da bile, permitindo, assim, uma grande viabilidade clínica (OP DEN DRIES et al., 2013).

A utilização das máquinas de perfusão ainda está em fase investigativa para o transplante de fígado em humanos.

2.6 INJÚRIA POR ISQUEMIA FRIA

A lesão isquêmica pode ocorrer em qualquer fase do transplante e está diretamente relacionada ao tempo de isquemia fria e é reconhecida como importante causa de morbidade e mortalidade (GIOVANARDI, 2006).

Nesse contexto, a lesão hepática de isquemia e reperfusão pode ser decorrente de uma das três formas de isquemia. A isquemia fria (ou hipotérmica), a isquemia quente (ou normotérmica) e a isquemia de reaquecimento (*rewarming*) (SHIRAIISHI et al., 1997).

A isquemia fria compreende o tempo decorrido entre o clampeamento dos vasos do doador com infusão de solução de preservação gelada, e conseqüente perda do suprimento sanguíneo para o enxerto, até o momento em que o órgão é inserido na cavidade abdominal do receptor. Durante esse período, o órgão encontra-se perfundido com uma solução de preservação e mantido em condições hipotérmicas para minimizar o dano isquêmico.

A acidez resultante da isquemia é inadequada para a cinética normal das enzimas, privando a célula dos seus mecanismos para manutenção da homeostase (NATORI et al., 1999).

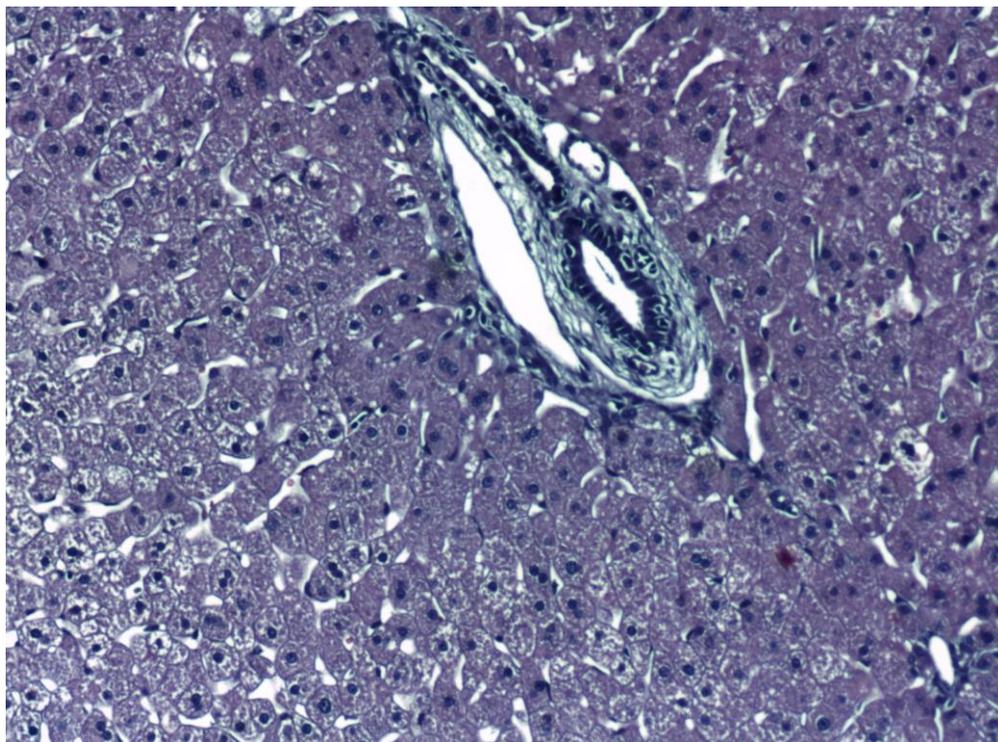
O sofrimento da membrana plasmática provoca alterações eletrolíticas conseqüentes à disfunção da bomba de Na-K, que, acompanhadas da perda dos mecanismos de produção de adenosina trifosfatada (ATP) levam à perda da capacidade de síntese celular. O cálcio provoca disfunção da membrana mitocondrial e lesão irreversível. Ocorre

autólise secundária à isquemia, com edema e extravasamento do conteúdo dos lisossomos, enzimas e proteínas, vacuolização do retículo endoplasmático e descaracterização da compartimentalização celular. A integridade das membranas é afetada e a célula morre (KHOLI et al, 1999; ISHIGAMI et al, 2001).

Uma vez que a isquemia não resulte em lesão irreversível, induz um estado pró-inflamatório, que aumenta a vulnerabilidade tecidual e favorece lesão adicional durante a reperfusão (LI; BILLIAR, 1999).

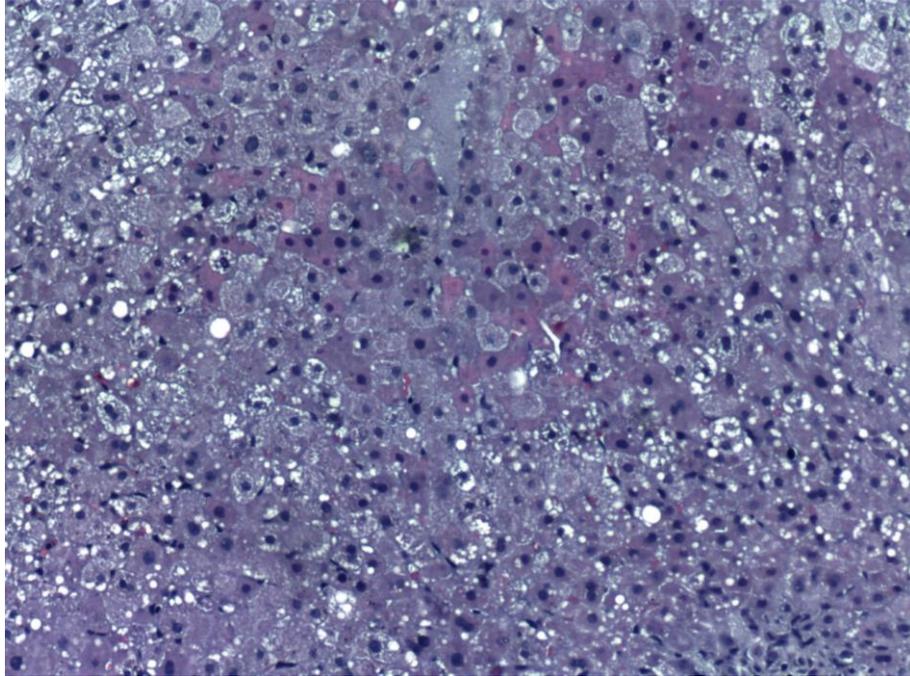
Podemos perceber as alterações morfológicas decorrentes da isquemia nas seguintes figuras:

Figura 1 - Tecido hepático normal. HE, 100x.



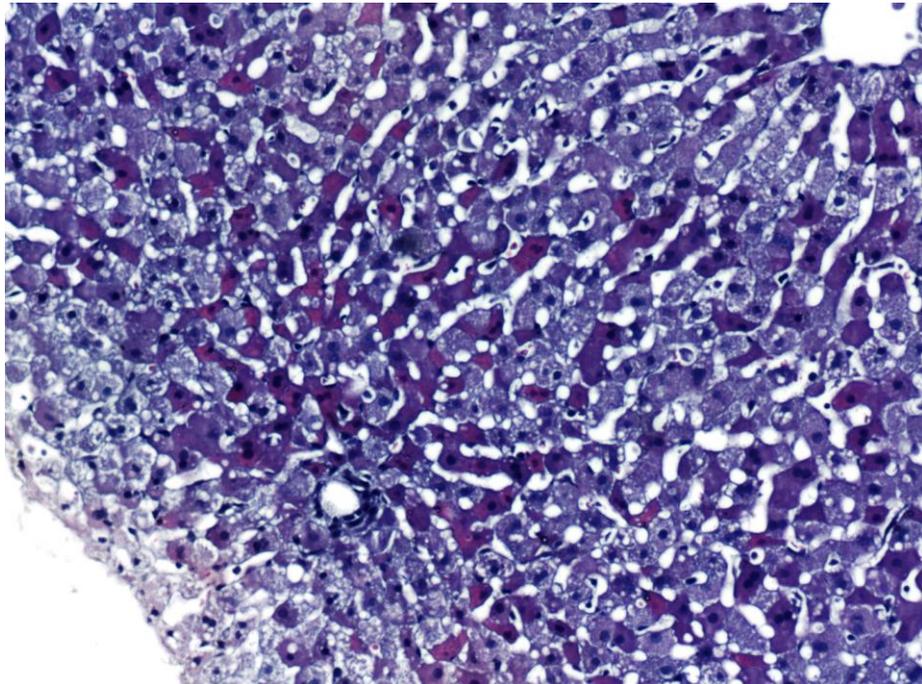
Fonte: Acervo da autora.

Figura 2 - Aspectos morfológicos do tecido hepático com alterações degenerativas. Corpos acidófilos com núcleos picnóticos e citoplasma vacuolar. HE, 100x.



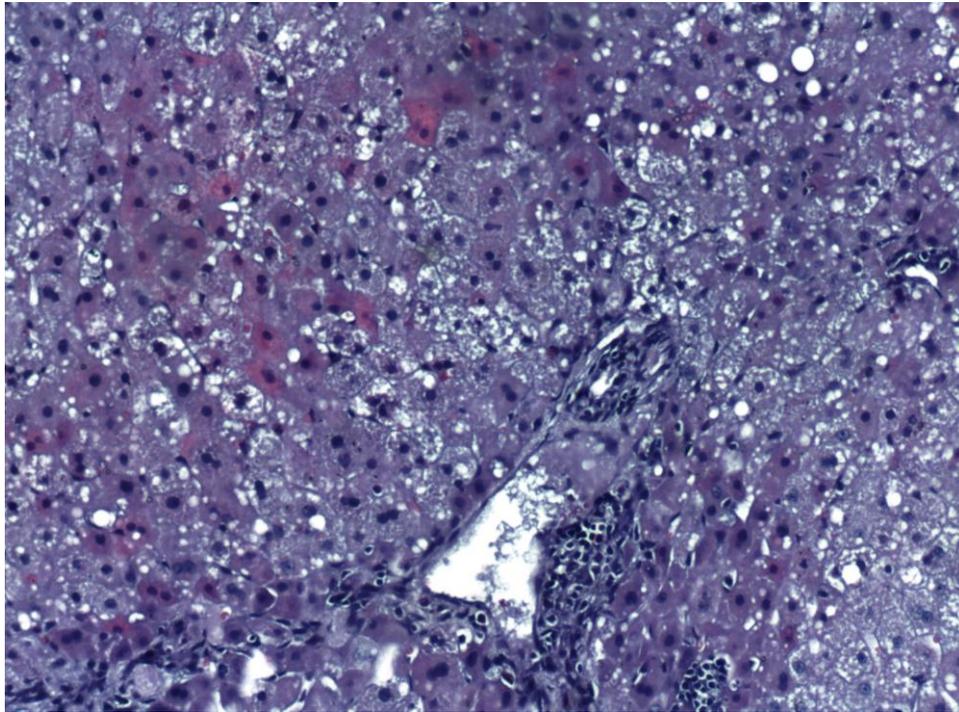
Fonte: Acervo da autora.

Figura 3 - Tecido hepático subcapsular com focos de necrose confluyente. Corpos acidófilos com núcleos picnóticos. HE, 40x.



Fonte: Acervo da autora.

Figura 4 - Aspectos morfológicos do tecido hepático com alterações degenerativas. Corpos acidófilos com núcleos picnóticos e citoplasma vacuolar. HE, 100x.



Fonte: Acervo da autora.

2.7 SOLUÇÃO DE BELZER OU UW - SOLUÇÃO PADRÃO

Em 1988, Belzer desenvolveu a solução de preservação mais usada mundialmente, elevando o tempo de armazenamento do órgão. O transplante do fígado passou de um procedimento de emergência para um semi-eletivo. A solução permite um tempo de preservação do rim e pâncreas de até 72 horas, e para o fígado em torno de 24 horas (BELZER; SOUTHARD, 1988).

Conforme o laboratório Bristol-Myers, a composição do Viaspan® (Belzer ou UW) é uma solução tipo intracelular com pouco sódio, rica em potássio e moderada em magnésio (*Bristol-Myers Squibb Company*)

É estável se conservada entre 2°C e 8°C por 12 meses. A concentração de potássio é alta e a de sódio, cálcio e magnésio baixas. A rafinose e lactobionato substituem glicose e cloro para prevenir o edema celular durante o armazenamento. O fosfato é a base principal. Alopurinol, um inibidor da xantina-oxidase, e a glutatona promovem a proteção antioxidante (BARROS, 2008)

Gnaiger et al. (2000) em seu estudo comprovou as reações de auto-oxidação que ocorrem na solução UW. A adenosina é incluída para facilitar a regeneração de adenosina trifosfato (ATP) e insulina é adicionada para estimular a glicólise.

A presença de dexametasona nesta solução é importante para estabilizar a membrana lisossomal e a penicilina combate o crescimento bacteriano (LEMASTERS; BUNZENDAHL; THURMAN, 2001).

Quadro 1 – Composição da solução ViaSpan®.

Componentes	Quantidade/1.000ML	Concentração (mmol/l)
Adenina (base livre)	0,68g	5
Cloreto de cálcio (di-hidratado)	0,068g	0,5
Dextrose (+)	1,80g	10
Glutationa (reduzida)	0,92g	3
HEPES (ácido livre)	2,38g	10
Amido hidroxietílico	50,0g	N/A
Gluconato de magnésio (anidro)	1,13g	5
Manitol	5,4g	30
Fosfato de potássio (monobásico)	3,4g	25
Ribose, D(-)	0,75g	5
Gluconato de sódio	17,45g	80
Hidróxido de sódio	0,70g	N/A
Água esterilizada para injeção	Para um volume de 1000ml	N/A

Fonte: Meine (2005).

A Solução de preservação estática 1 (SPS-1), é uma solução de preservação estática para o armazenamento hipotérmico de órgãos transplantados e é recomendada para uso em rins, pâncreas e fígado. A solução é idêntica em composição à solução da Universidade de Wisconsin (ViaSpan®), que é considerada pelos cirurgiões em todo o mundo como a solução de preservação padrão ouro. A equivalência entre as soluções SPS-1 e UW é reconhecida pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América. Em 2008, a agência reguladora FDA declarou a SPS-1 como “substancialmente equivalente” a ViaSpan®, o que significa equivalência em segurança e eficácia (*Organ Recovery Systems*).

Benefícios adicionais do SPS-1 são baseados em melhorias na embalagem. A *Organ Recovery Systems* desenvolveu sacos de 1 e 2 litros para a solução que permitem o uso sem um filtro de transfusão de sangue Pall e armazenamento em temperatura ambiente não refrigerado por até 2 anos a partir da data de fabricação. Desde 2008, a *Organ Recovery Systems* forneceu mais de 125.000 Litros de SPS-1 para os principais centros de transplantes em todo o mundo. Foi esta a solução escolhida a ser testada nesse trabalho.

Quadro 2 – Comparação entre os constituintes das soluções UW e ViaSpan®.

Solução de Armazenamento Frio Belzer UW®			VIASPAN®		
INGREDIENTE	G/L	MMOL/L	INGREDIENTE	G/L	MMOL/L
Hidroxietilamido (pentafração)	50,0	N / D	Hidroxietilamido (pentafração)	50,0	N / D
Ácido lactobiônico (como lactona)	35,83	105	Ácido lactobiônico (como lactona)	35,83	105
Dihidrogenofosfato de potássio	3,4	25	Dihidrogenofosfato de potássio	3,4	25
Heptaidrato de sulfato de magnésio	1,23	5	Heptaidrato de sulfato de magnésio	1,23	5
Penta-hidrato de rafinose	17,83	30	Penta-hidrato de rafinose	17,83	30
Adenosina	1,34	5	Adenosina	1,34	5
Alopurinol	0,136	1	Alopurinol	0,136	1
Glutationa Total	0,922	3	Glutationa Total	0,922	3
Hidróxido de Potássio*	5,61	100	Hidróxido de Potássio*	14,5	100
Hidróxido de sódio/ácido clorídrico (ajuste para pH 7,4)			Hidróxido de sódio/ácido clorídrico (ajuste para pH 7,4)		
Água para injeção qs			Água para injeção qs		

Fonte: *Organ Recovery System*.

Tabela 1 – Constituição da solução SPS-1.

Componentes	Quantidade/1000mL
Hidroxietilamido	50.0 g
Ácido Lactobiônico (como Lactona)	35.83 g
Fosfato de Potássio monobásico	3.4 g
Sulfato de Magnésio hepta-hidratado	1.23 g
Rafinose Penta-hidratada	17.83 g
Adenosina	1.34 g
Alopurinol	0.136 g
Glutationa (forma reduzida)	0.922 g
Hidróxido de Potássio	5.61 g
Hidróxido de Sódio / Ácido Clorídrico	Ajuste para pH 7.4
Água estéril para Injeção	Para 1000mL Volume

Fonte: Elaborado pela autora.

2.8 ÁGUA DE COCO

A água de coco é proveniente do fruto do coqueiro (*Cocos nucifera* L.), considerado uma cultura perene, produzindo continuamente por 60 até 70 anos. A água de coco armazena reservas nutritivas que serão utilizadas naturalmente como mecanismo de sobrevivência da espécie, na nutrição do embrião, quando da germinação das sementes ou da plântula, durante períodos de eventuais estresses ambientais (ARAGÃO, 2005).

Corresponde a aproximadamente 25% do peso do fruto e a quantidade de água varia de 300 a 600 mL/coco. Glicose e frutose são os açúcares predominantes nos frutos jovens, enquanto a sacarose é o açúcar mais abundante nos frutos maduros (CTENAS; CTENAS; QUAST, 2000).

Os maiores constituintes químicos da água de coco são os açúcares e minerais que conferem o sabor agradável à água e a tornam uma bebida isotônica natural. Em média, a água de coco apresenta a seguinte composição: sacarose (280 mg/100 mL água de coco); frutose (2.400 mg/100 mL); glicose (2.378 mg/100 mL); cálcio (17,10 mg/100 g); fósforo (7,40 mg/100 g); sódio (7,05 mg/100 g); magnésio (4,77 mg/100 g) e potássio (156,86 mg/100 g) (ALEIXO et al., 2000; ROSA; ABREU, 2000).

Conhecida como “a árvore da vida” o coqueiro é uma das plantas mais úteis do mundo. Devido às suas propriedades nutricionais e aspectos bioquímicos, a água de coco vem sendo testada em vários segmentos na área de biotecnologia (CTENAS; CTENAS; QUAST, 2000).

Existem numerosas referências para usos medicinais de coco no Sri Lanka, um país onde o coco é consumido em uma base diária (EDIRIWEERA, 2003).

Em caso de emergência em regiões remotas do mundo e durante a Segunda Guerra Mundial, há relatos do uso de água de coco como fluido de ressucitação volêmica e reidratação a curto prazo (CAMPBELL-FALCK, 2000; PUMMER et al., 2001).

Com os avanços científicos, muitos trabalhos têm estudado os benefícios da água de coco, principalmente nas áreas de pesquisa relacionadas à saúde.

Segundo Prades et al. (2012), a água de coco pode agir como meio de crescimento de microorganismos, especialmente “nata de coco” *bacterium*; além de agir também como meio indutor para divisão celular de células maduras.

Outras propriedades promissoras da água de coco é a sua capacidade bactericida, a qual tem sua base bioquímica decorrente da presença de três peptídeos chamados Cn-AMPs. Essa descoberta poderá fomentar pesquisas com o uso da água de coco na formulação de novos antibióticos.

Existem outros estudos com água de coco, sugerindo propriedades antineoplásicas e neuroprotetoras, entretanto, ainda não comprovou quais as substâncias responsáveis por essas propriedades e nenhum autor explicou as características inerentes à planta utilizada e quais as condições do processamento (PRADES et al., 2012)

No meio científico, a água de coco foi reconhecida como produto alternativo para conservação de tecidos. No início da década de 80, já se pesquisava seu uso como conservante natural durante os experimentos com sêmen e embriões de ovinos e caprinos (NUNES, 1986).

A demonstração da eficácia da água de coco como meio de preservação tem sido corroborada em vários estudos. A água de coco foi avaliada como meio conservante de córneas de coelhos, e observou-se que não houve alteração estrutural expressiva em relação às córneas conservadas no Optisol®, produto padrão vendido comercialmente (NOGUEIRA; VASCONCELOS, 2000).

Foi utilizada também com sucesso na preservação de oócitos de murinos e na cultura de embriões, na cultura e preservação de folículos pré-antrais de caprinos *in vitro* (BLUME et al., 1997; SILVA et al., 2000; 2004; ANDRADE et al., 2002).

O avanço na quantidade e diversidade de pesquisas utilizando a água de coco demonstrou a necessidade de padronizar este produto, fundamentando assim de forma mais clara as suas propriedades benéficas e reduzindo os vieses relacionados à conservação. Esse procedimento foi alcançado com sucesso em 2002, com o processamento do líquido e transformação em pó (SALGUEIRO; NUNES, 2012).

O processamento manteve as propriedades físicas, químicas e biológicas do produto, bem como seu uso em vários estudos continuou demonstrando a sua eficácia. Muitos trabalhos solidificam o uso da água de coco em pó na reprodução animal (NUNES; SALGUEIRO, 1999; SILVA *et al.*, 2009; SALGUEIRO; NUNES, 2012).

Quadro 3 – Composição bioquímica da água de coco em pó ACP poro 100g.

Calorias (Kcal)	378	VITAMINAS	
Calorias (kJ)	1.585	Vitamina B1 (mg), tiamina	0,17
Calorias de Carboidratos (kcal)	372	Vitamina B3 (mg), nianina (ácido nicotínico e vitamina PP)	0,12
Carboidrato, por diferença (g)	93,00	Vitamina B5 (mg) ácido pantotênico	6,51
Frutose (g)	50,02	Vitamina B12 (mcg) cobalamina	0,22
Galactose (g)	0,00	Ácido Fólico (mcg)	312,00
Glicose (g)	34,97	Vitamina C (mg), ácido ascórbico	26,80
Proteína (g)	0,90	Vitamina D (mcg), calciferol	1,50
Gorduras totais (g)	0,300	Biotina	8,03
Gorduras saturadas (g)	0,000	AMINOÁCIDOS	
Gorduras monisaturadas (g)	0,000	Ácido Aspártico (mg)	0,70
Gorduras poli saturadas (g)	0,000	Ácido Glutâmico (mg)	172,00
Gorduras Trans	0	Alanina (mg)	38,60
Colesterol (mg)	0,00	Arginina (mg)	126,00
Fibra, total alimentar (g)	4,30	Cistina (mg)	14,80
Fibra (g)	-	Fenilalanina (mg)	38,00
Fibra Alimentar Insolúvel (g)	4,10	Glicina (mg)	36,40
Fibra Alimentar Solúvel (g)	0,20	Glutamina (mg)	172,00
Umidade (g)	3,00	Histidina (mg)	17,80
Cinzas (g)	1,30	Isoleucina (mg)	29,30
Sólidos Totais (g)	97,01	Leucina (mg)	54,20
MINERAIS		Lisina (mg)	33,10
Sódio, Na (mg)	105,000	Metionina (mg)	14,00
Cálcio, Ca (mg)	39,000	Prolina (mg)	32,00

Ferro, Fe (mg)	0,300
Fósforo, P (mg)	45,200
Magnésio, Mg (mg)	25,000
Manganês, Mn (mg)	1,100
Potássio, K (mg)	250,000

Serina	39,00
Tirosina (mg)	24,00
Treonina (mg)	28,20
Triptofano (mg)	8,40
Valina (mg)	48,00
Osmoralidade (mOsm/Kg H₂O; 10g em 100ml)	210
Grau de saturação em água g/ml	0,8

Fonte: ACP Biotecnologia (2017).

Nesse contexto, a água de coco se constitui em um dos mais promissores produtos biotecnológicos atualmente estudados na conservação de órgãos e tecidos. Deste modo, a necessidade de encontrar uma solução de preservação equivalente em qualidade às soluções padrões vigentes mais utilizados clinicamente, economicamente viável, de amplo acesso e fácil reprodutibilidade, torna a ACP uma alternativa em potencial.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Analisar a preservação morfológica de fígado de coelho após perfusão com solução hipotérmica à base de água de coco em pó.

3.1 ESPECÍFICOS

(a) Avaliar a qualidade da preservação hepática estática em solução à base de água de coco em pó, através da análise de lesões de isquemia em até 18 horas de isquemia.

(b) Comparar a qualidade de preservação entre a solução ACP e a solução UW de preservação hepática para transplantes, através da análise morfológica até 18h de isquemia.

(c) Gerar patente para a solução de ACP como solução de preservação hepática viável.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido de acordo com as recomendações das Normas Internacionais para Proteção Animal e do Código Brasileiro de Experimentação Animal (1988), “Princípios Éticos na Experimentação Animal”, segundo a Lei Federal nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto para Desenvolvimento da Educação (IPADE) do Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS) sob o Protocolo 027/15, conforme documento anexo (ANEXO A).

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen no Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIBE) da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

4.1 OS MODELOS ANIMAIS

Foram utilizados 10 (dez) Coelhos Nova Zelândia Brancos, do sexo masculino, provenientes do Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Ceará (UFC), com uma média de 120 dias de vida e pesando em média 1.200 g, mantidos em gaiolas, com ingestão livre de água e ração padronizada para coelhos. Nas 12 horas que antecedem o experimento, os animais foram mantidos em jejum alimentar, com ingestão de água *ad libitum*.

4.2 AS SOLUÇÕES

A solução padrão utilizada no estudo foi a *Static Preservation Solution* (SPS-1) (*Organ Recovery Systems* - EUA) que tem a mesma composição da solução da Universidade Wisconsin (UW). Foi utilizada a apresentação em bolsa plástica de 1 (um) litro, resfriada a 4º C.

A água de coco em pó (ACP) utilizada foi a ACP-405 (pH 7,4; 318 mOsm/L), cuja composição está representada no Quadro 4. O meio ACP-405 foi ressuspendido em água Milli-Q e procedida a esterilização física através

de filtro millipore (*Microlab Scientific*, China) de 0,22 micrômetros. A solução decorrente deste processo ficou armazenada em frascos plásticos estéreis, resfriados a 4° C. A composição da solução é ilustrada no Quadro 2.

Quadro 4 – Composição ACP-405.

ACP-405 (meio perfusão/conservação órgãos)	ACP / 100g	ACP-405 (3,56g)/50 ml
Caloriais (kcal)	378	265
Caloriais (kJ)	1585	1110
Calorias de Carboidratos (kcal)	372	260
Calorias de Lipídios (kcal)	3	2
Calorias de Proteínas (kcal)	4	3
Carboidrato, por diferença (g)	93,00	65,10
Açúcares totais em Glicose (g)	88,70	62,09
Amido (g)	0,00	0,00
Frutose (g)	50,02	35,01
Galactose (g)	0,00	0,00
Glicose (g)	34,97	24,48
Lactose (g)	0,00	0,00
Maltose (g)	0,00	0,00
Sacarose (g)	3,00	2,10
Tanino (mg)	0,00	0,00
Proteína (g)	0,90	0,63
Gorduras totais (g)	0,300	0,210
Gorduras saturadas (g)	0,000	0,000
Gorduras monoinsaturadas (g)	0,000	0,000
Gorduras trans (g)	0	0,00
Colesterol (mg)	0,00	0,00
Fibra, total alimentar (g)	4,30	3,01
Fibra (g)	-	
Fibra Alimentar Insolúvel (g)	4,10	2,87
Fibra Alimentar Solúvel (g)	0,20	0,14
Acidez total (mL de NaOH 1 N)	0,2 (Ác. Acético)	0,2 (Ác. Acético)
Umidade (g)	3,00	3,00
Sólidos Totais (g)	97,01	67,91
MINERAIS		
Sódio, Na (mg)	105,000	73,500
Cálcio, Ca (mg)	39,000	27,300
Ferro, Fe (mg)	0,300	0,210
Cobre, Cu (mg)	0,000	0,000
Fósforo, P (mg)	45,200	31,640

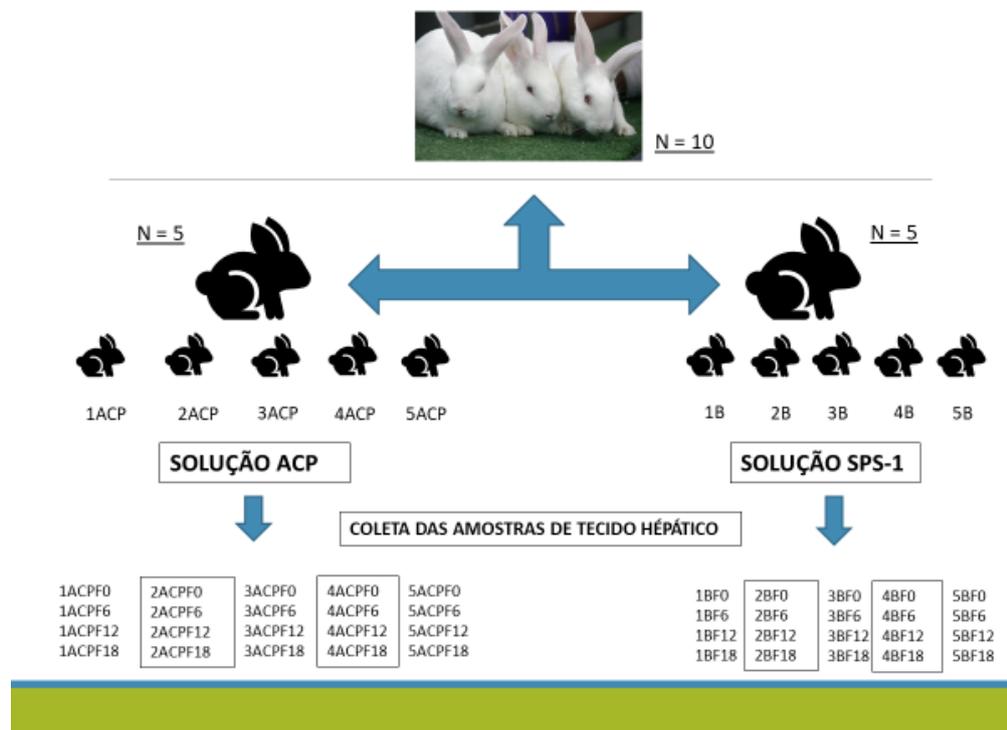
Magnésio, Mg (mg)	25,000	17,500
Manganês, Mn (mg)	1,100	0,770
Potássio, K (mg)	250,000	175,000
Selênio, Se (mg)	0,000	0,000
Zinco, Zn (mg)	0,000	0,000
Cloreto (mg)	-	-
Cromo (mcg)	0,000	0,000
Iodo (mcg)	0,000	0,000
Molibdênio (mg)	-	-
VITAMINAS		
Vitamina A (mcg) RAE, retinol	0,00	0,00
Vitamina B1 (mg), tiamina	0,17	0,12
Vitamina B2 (mg), riboflavina	0,00	0,00
Vitamina B3 (mg), niacina (ácido nicotínico e vitamina PP)	0,12	0,08
Vitamina B5 (mg), ácido pantotênico	6,51	4,56
Vitamina B6 (mg), piridoxina	0,00	0,00
Vitamina B12 (mcg), cobalamina	0,22	0,15
Ácido Fólico (mcg)	312,00	218,40
Vitamina C (mg), ácido ascórbico	26,80	18,76
Vitamina D (mcg), calciferol	1,50	1,05
Vitamina E (mg), d-alfa-tocoferol	0,00	0,00
Vitamina K (mcg), K1-filoquinona, Vitamina H, Biotina	8,03	5,62
Carotenos, alfa (mcg)	-	-
Carotenos, beta (mcg)	-	-
Colina, total (mg)	-	-
Folatos, total (mcg)	-	-
AMINOÁCIDOS		
Ácido Aspártico (mg)	0,700000	0,49000
Ácido Glutâmico (mg)	172,000000	120,40000
Alanina (mg)	38,600000	27,02000
Arginina (mg)	126,000000	88,20000
Cistina (mg)	14,800000	10,36000
Fenilalanina (mg)	38,000000	26,60000
Glicina (mg)	36,400000	25,48000
Glutamina (mg)	172,000000	120,40000
Histidina (mg)	17,800000	12,46000
Isoleucina (mg)	29,300000	20,51000
Leucina (mg)	54,200000	37,94000
Lisina (mg)	33,100000	23,17000
Metionina (mg)	14,000000	9,80000

Prolina (mg)	32,000000	22,40000
Serina (mg)	39,000000	27,30000
Tirosina (mg)	24,000000	16,80000
Treonina (mg)	28,200000	19,74000
Triptofano (mg)	8,400000	5,88000
Valina (mg)	48,000000	33,60000
REGULADORES DE pH		
Glicina (g)		0,31
Citrato de sódio (g)		0,56
Fosfato de sódio dibásico (g)		0,06
pH		7,4
Osmolaridade (mOsm/Kg H2O)		318

Fonte: ACP Biotecnologia (2017).

Ambas as soluções permaneceram resfriadas até o momento da utilização, quando eram então conectadas a um equipo de macro-gotas (Descarpack, São Paulo) para a respectiva perfusão.

Figura 5 – Distribuição dos animais conforme solução de preservação avaliada.



Fonte: Elaborada pela pesquisadora.

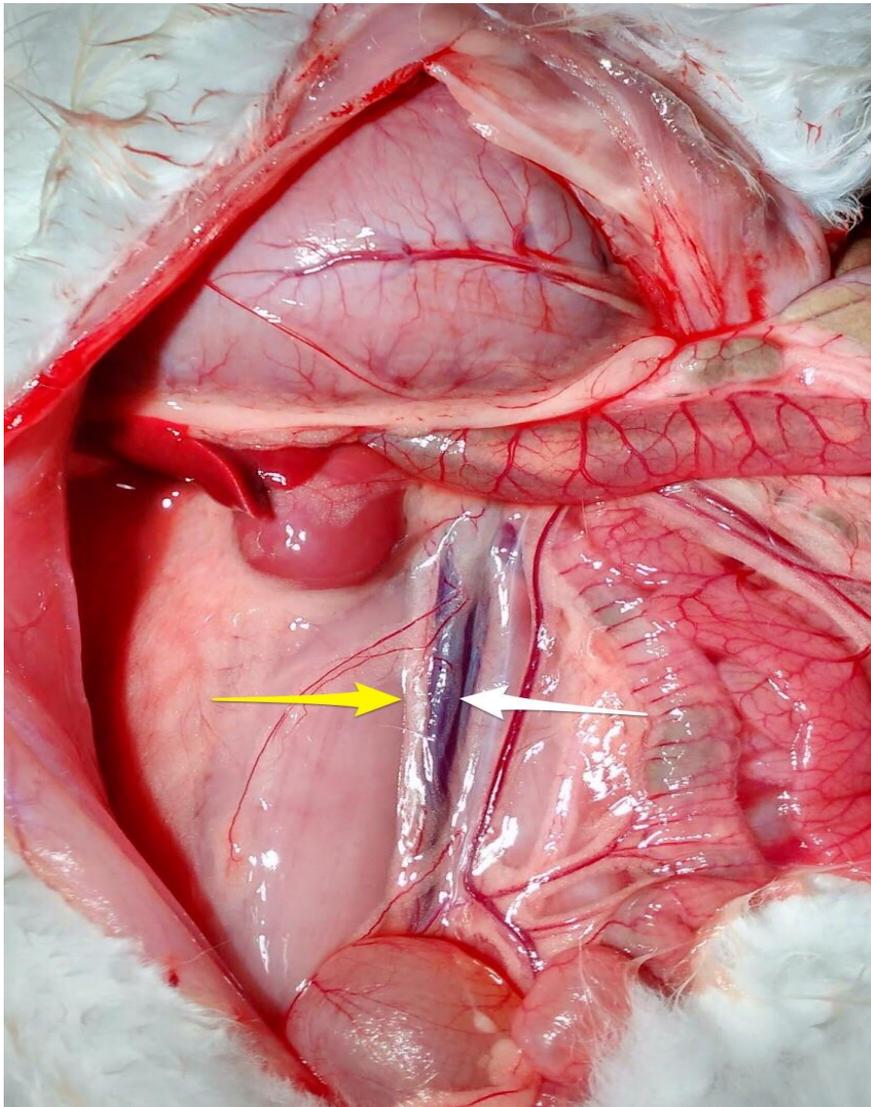
4.3 O PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram anestesiados com uretana (MP Biomedicals, EUA) na dose 1.200 mg/kg por via intraperitoneal e, após trinta minutos, com pentobarbital sódico (Cristália, Itapira, São Paulo) na dose 40 mg/kg, por via intramuscular. Após o animal encontrar-se anestesiado, procedeu-se a tricotomia da parede abdominal, seguida de antissepsia com solução de Digliconato de Clorexidina 1% - 10 mg/mL (Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo).

Realizou-se incisão mediana do apêndice xifóide até a região hipogástrica, dissecação por planos até a cavidade peritoneal. Realizou-se a inspeção dos órgãos abdominais. Após, procedeu-se ao rebatimento das alças intestinais, de modo a permitir a exposição da veia cava inferior, da aorta abdominal e de suas ramificações e da veia porta. A aorta abdominal e a veia cava inferior foram dissecadas até próximo à bexiga, realizando-se a ligadura dos vasos colaterais e o reparo de cada vaso com fios de algodão 2.0. A veia mesentérica superior foi dissecada e reparada, bem como a aorta infradiafragmática. A perfusão através da veia mesentérica superior foi realizada para preservação do fígado.

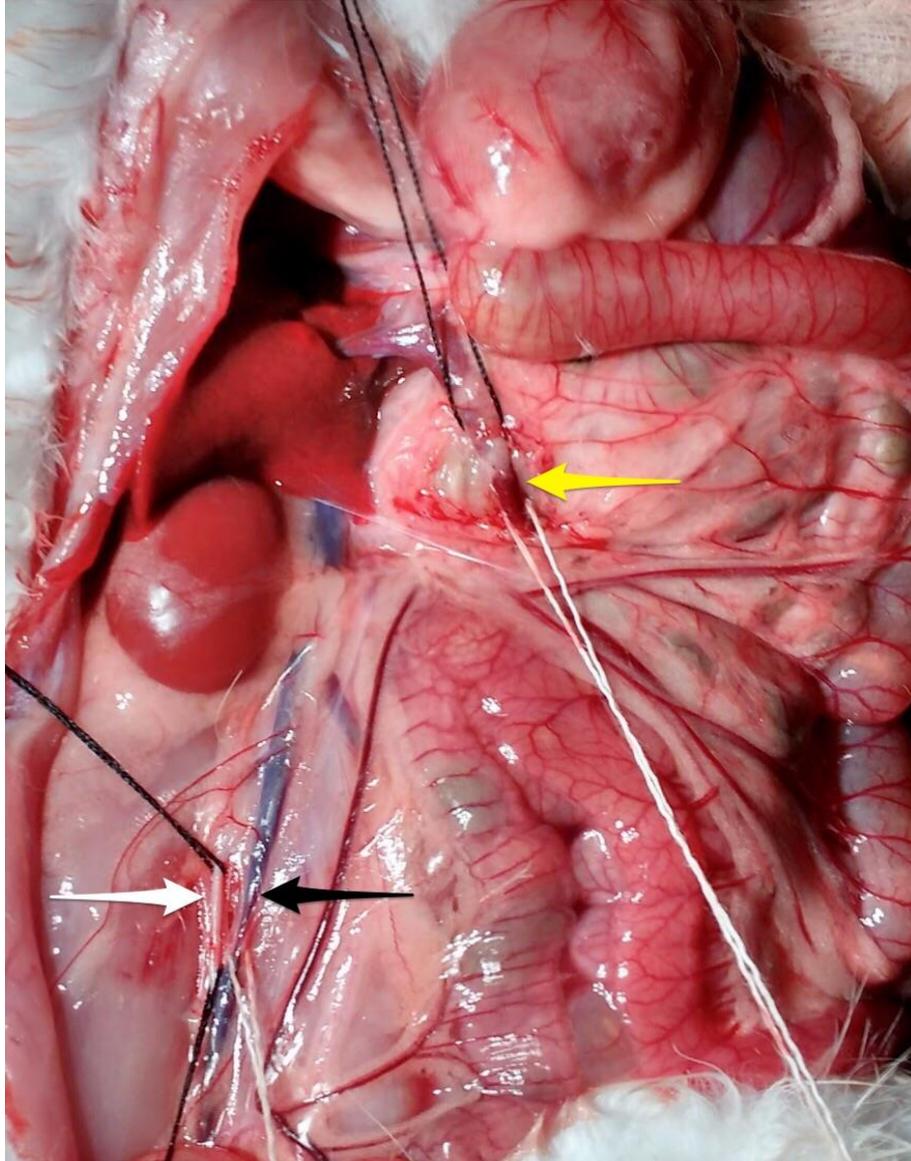
Seguem fotografias para ilustrar a dissecação dos vasos:

Figura 6 - Aorta abdominal (seta amarela) e veia cava inferior (seta branca).



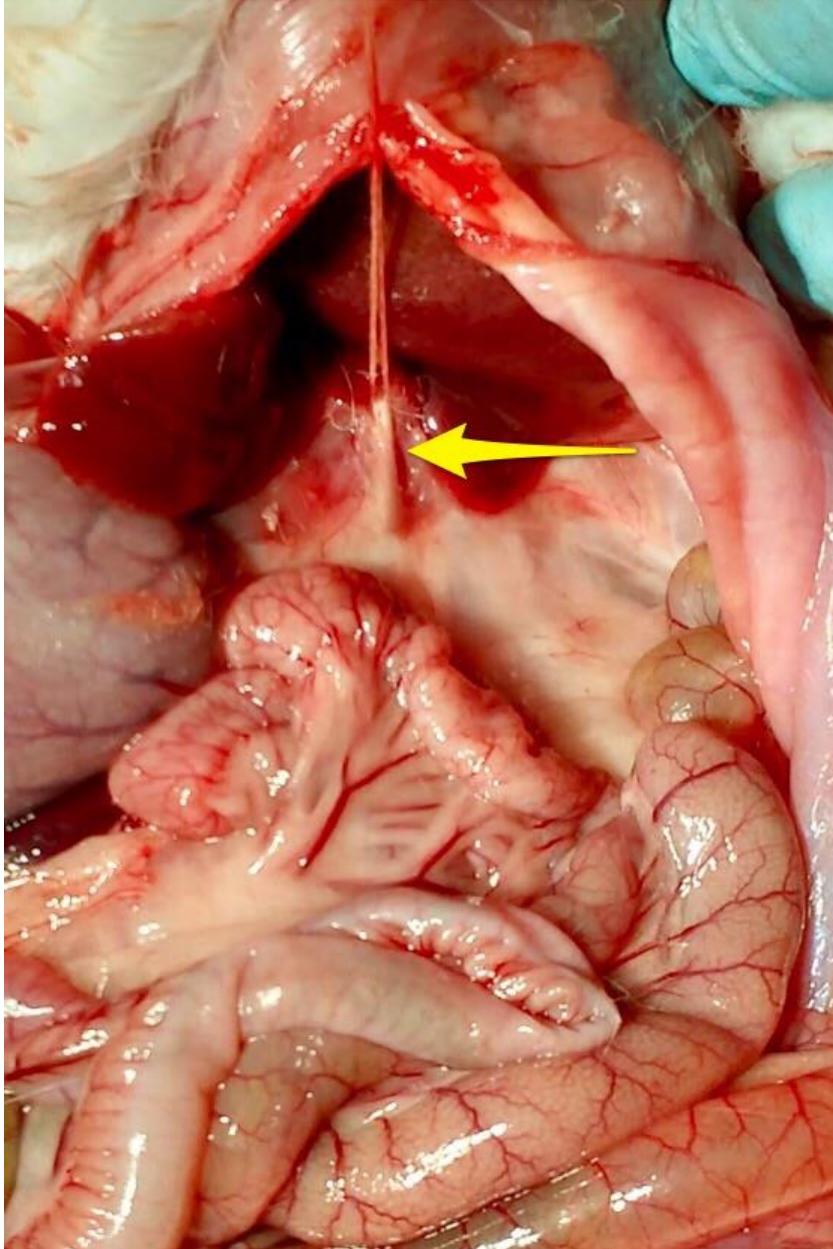
Fonte: Acervo da pesquisadora.

Figura 7 - Estruturas vasculares isoladas e reparadas. Nota-se a Aorta abdominal (seta branca), a Veia Cava Inferior (seta preta) e a Veia Mesentérica Superior (seta amarela).



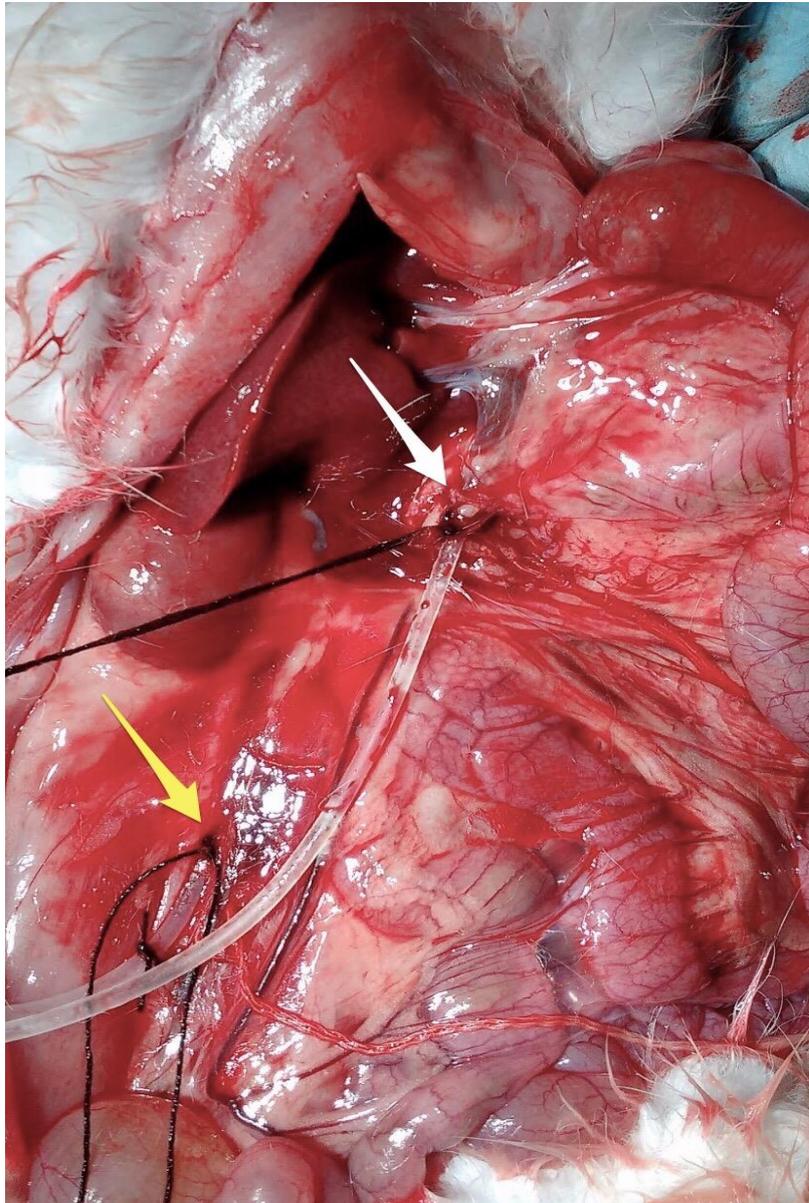
Fonte: Acervo da pesquisadora.

Figura 8 - Aorta infradiafragmática (seta amarela).



Fonte: Acervo da pesquisadora.

Figura 9 - Estruturas vasculares canuladas: Aorta abdominal (seta amarela) e Veia Mesentérica Superior (seta branca), procedimento padrão para perfusão de múltiplos órgãos.



Fonte: Acervo da pesquisadora.

Concluída a dissecação e isolamento das estruturas vasculares, foram administradas 100 UI de heparina sódica 5000 UI/mL (Cristália, Itapira, São Paulo) através da veia cava inferior. Procedeu-se, então, à ligadura da aorta, distal ao ponto de canulação, com colocação da cânula para perfusão (sonda Nelaton 6 Fr) na aorta abdominal e na veia mesentérica superior até a veia porta. As cânulas foram previamente preenchidas com o respectivo

líquido de perfusão armazenados em frasco (ACP) ou em bolsa (SPS-1), conectadas a equipos de macro-gotas (Descarpack, São Paulo).

Após a adequada canulação dos vasos, foi realizado o clampeamento da aorta infradiafragmática e da veia cava inferior, liberação da entrada da solução de preservação infundidas pela ação da gravidade na altura de 100 (cem) cm da mesa cirúrgica e o concomitante resfriamento da cavidade com gelo picado. Esta manobra permite o início da perfusão com isquemia zero, já que não há interrupção do fluxo dentro dos órgãos.

A veia cava supra-hepática e justa ilíaca foram seccionadas para o extravasamento da solução perfundida. O momento do clampeamento vascular e início da perfusão foi considerado o tempo 0 (zero) h. Após um tempo médio de 10 (dez) minutos de perfusão, 100 (cem) mililitros de solução perfundiram os órgãos por cada cânula.

Em 5 (cinco) animais foi realizado o procedimento descrito utilizando a SPS-1 (Grupo B), em outro grupo de 5 (cinco) animais foi utilizada a solução à base de ACP a temperatura padrão de 4°C (Grupo ACP).

Após a perfusão dos órgãos e o resfriamento da cavidade animal, foi feita a hepatectomia. Os fígados foram levados à bancada e submetidos à secção longitudinal com lâmina de bisturi nº 22, sendo acondicionados em frascos plásticos identificados como descrito a seguir: um fragmento hepático nomeado tempo 0 horas (zero) foi colocado em frasco com formaldeído tamponado a 10% (Quimesp, Guarulhos, São Paulo). Outros 3 (três) fragmentos foram acondicionados em 3 (três) frascos contendo a solução de preservação testada, resfriada a 4°C e subsequentemente colocados no formaldeído nos tempos 6 (seis) horas, 12 (doze) horas e 18 (dezoito) horas. Os grupos foram divididos e as amostras catalogadas conforme ilustrado nas tabelas 2 e 3:

Tabela 2 – Catalogação das amostras conforme numeração do animal e tempo de análise de isquemia fria na solução SPS-1.

Tempo de isquemia fria para análise (horas)				
ANIMAL	0	6	12	18
1	1BF0	1BF6	1BF12	1BF18
2	2BF0	2BF6	2BF12	2BF18
3	3BF0	3BF6	3BF12	3BF18
4	4BF0	4BF6	4BF12	4BF18
5	5BF0	5BF6	5BF12	5BF18

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 3 – Catalogação das amostras conforme numeração do animal e tempo de análise de isquemia fria na solução ACP.

Tempo de isquemia fria para análise (horas)				
ANIMAL	0	6	12	18
1	1ACPF0	1ACPF6	1ACPF12	1ACPF18
2	2ACPF0	2ACPF6	2ACPF12	2ACPF18
3	3ACPF0	3ACPF6	3ACPF12	3ACPF18
4	4ACPF0	4ACPF6	4ACPF12	4ACPF18
5	5ACPF0	5ACPF6	5ACPF12	5ACPF18

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Foram realizadas secções de 4 μ m das amostras preservadas em blocos de parafina para confecção de lâminas histológicas. As lâminas coradas em HE foram avaliadas qualitativamente pela descrição do patologista com experiência em transplantes de forma cega. Toda a secção do tecido foi analisada sob microscopia óptica (Nikon E 200; Tokyo, Japan)

Como forma de quantificação de lesão histológica foi utilizado o método para quantificação do escore previamente realizado por Suzuki et al. (1993).

A descrição qualitativa procurou avaliar a viabilidade dos hepatócitos observando-se os seguintes itens para detectar sinais indicativos de lesão tecidual ou celular: 1- Preservação dos lóbulos hepáticos

(ordenação e integridade dos cordões celulares em relação à veia centro lobular). 2- Avaliação da integridade da veia centrolobular (VCL). 3- Avaliação da integridade do espaço porta (EP). 4- Avaliação da congestão ou dilatação dos capilares sinusóides hepáticos. 5- Sinais de extravasamento de hemácias nos sinusóides hepáticos. 6- Integridade dos núcleos dos hepatócitos (tamanho, coloração e fragmentação) 7- Integridade da membrana celular e estrutura dos hepatócitos. 8- Avaliação da infiltração gordurosa no citoplasma das células (inclusões de gorduras).

A intensidade de lesão morfológica foi quantificada como se segue:

Congestão

- 0- Ausente
- 1- Mínima (< 5%)
- 2- Leve (5 a 30%)
- 3- Moderada (30 a 60%)
- 4- Grave (> 60%)

Vacuolização citoplasmática

- 0- Ausente
- 1- Mínima (<5%)
- 2- Leve (5 a 30%)
- 3- Moderada (30 a 60%)
- 4- Severa (>60%)

Necrose

- 0- Ausente
- 1- Células isoladas
- 2- < 30%
- 3- 30 a 60%
- 4- > 60%

A soma desses dois escores, representando a intensidade e a extensão das lesões, formaram um escore global que pode variar de 0 a 12. O escore global foi então escalonado da seguinte forma:

Escore global:

0- Ausente

1-4: Leve

5-8: Moderada

9-12: grave

A graduação dos sinais indicativos de lesões (ausentes, leves, moderados e acentuados) foi estabelecida de acordo com critérios pré-estabelecidos no projeto-piloto, devido à ausência na literatura de graduações padronizadas só para lesão de isquemia (SUZUKI et al, 1993).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística do comportamento da variável soma entre os dois tipos de solução utilizada no estudo, solução à base de água de coco (ACP) e solução SPS-1, foi verificada *a priori*, a normalidade dos dados, por meio do teste de Shapiro-Wilk, e após a negativa desta, foi realizado o teste de Mann-Whitney em cada um dos tempos. Na comparação entre os tempos foi utilizado o teste Friedman. As análises foram realizadas utilizando o *Software R 3.3.1*. Adotou-se um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

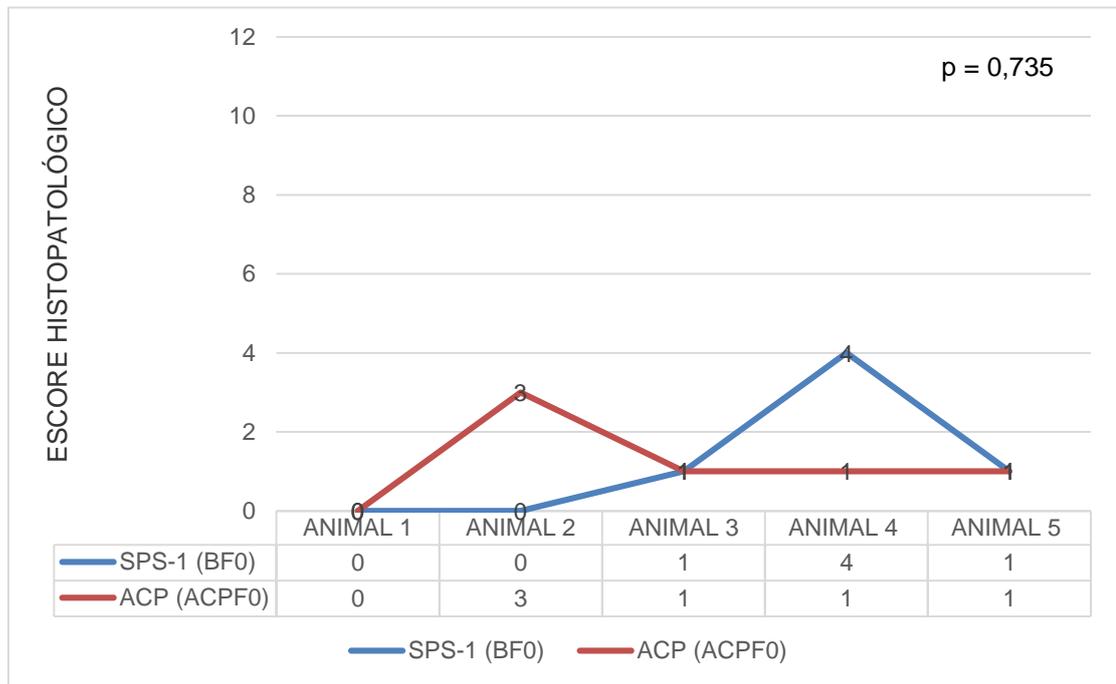
Os primeiros cinco animais foram perfundidos com a solução padrão SPS-1. A segunda fase do experimento foi realizada com a perfusão da solução à base de ACP reconstituída poucas horas antes do início das cirurgias e estavam em descongelamento, previamente conservadas a 4°C, no momento em que foram utilizadas. Após análise histológica, ilustrada nas Tabelas 2 e 3, nota-se certa uniformidade do escore final de preservação.

5.1 ANÁLISE NO TEMPO “ZERO”

No tempo 0 h, ou seja, pouco tempo após o clampeamento da circulação intracorpórea, teoricamente, teríamos o menor grau de lesão celular. As amostras em geral seguiram essa tendência. Na análise das amostras preservadas em solução SPS-1, as amostras 1 e 2 demonstraram ausência de lesão (escore final 0 e 0, respectivamente), enquanto as amostras 3 e 5 apresentaram apenas alteração leve (1 e 1, respectivamente). Porém, na avaliação histopatológica do animal 4 (amostra 4) podemos perceber um resultado pior já no tempo 0h, escore 4, mas ainda caracterizando uma lesão leve.

Para o mesmo tempo, a avaliação das amostras preservadas em solução ACP reconstituída demonstrou os seguintes resultados. A amostra 1 não apresentou qualquer sinal de lesão isquêmica. Nesse mesmo tempo, as amostras 2, 3, 4 e 5 apresentaram algumas alterações leves. Na amostra 2, foi evidenciado presença de vacuolização totalizando um escore 3, graduado como alteração leve. Nas amostras 3, 4 e 5, foram encontradas somente lesões compatíveis com necrose perfazendo o escore 1, grau leve. Ver comparação no gráfico 1.

Gráfico 1 - Comparação no tempo “zero” entre os escores histopatológicos finais nas soluções ACP e SPS-1.

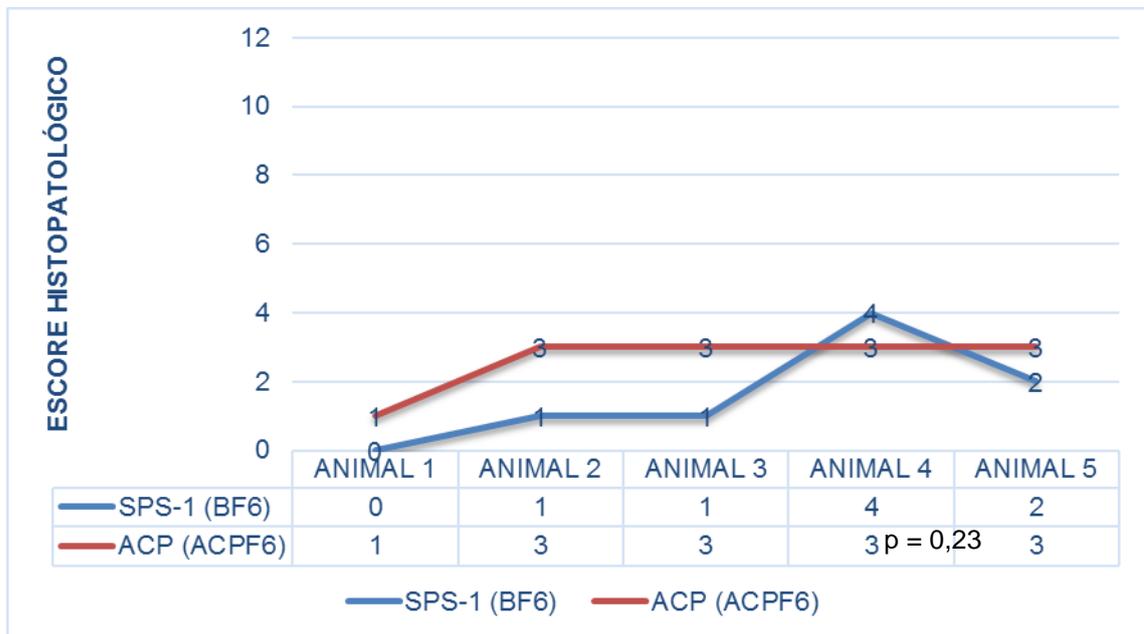


Fonte: Elaborado pela pesquisadora.

5.2 ANÁLISE NO TEMPO 6 HORAS (h)

Em solução SPS-1, as amostras 1, 3 e 4 permaneceram com o mesmo escore final do tempo 0h (respectivamente 0, 1 e 4); enquanto a amostra 2 mudou seu escore final para 1 e a amostra 5 para 2, graduados como leves. Em solução ACP reconstituída, na amostra 1 houve mudança do escore final para 1, com o aparecimento de vacuolização. A amostra 2 permaneceu com a mesma pontuação. Já as amostras 3, 4 e 5 tiveram seus escores modificados, perfazendo somatório de 3 (vacuolização -1/necrose -2), grau leve. Ver comparação no gráfico 2.

Gráfico 2 - Comparação no tempo 6h entre os escores histopatológicos finais nas soluções ACP e SPS-1.



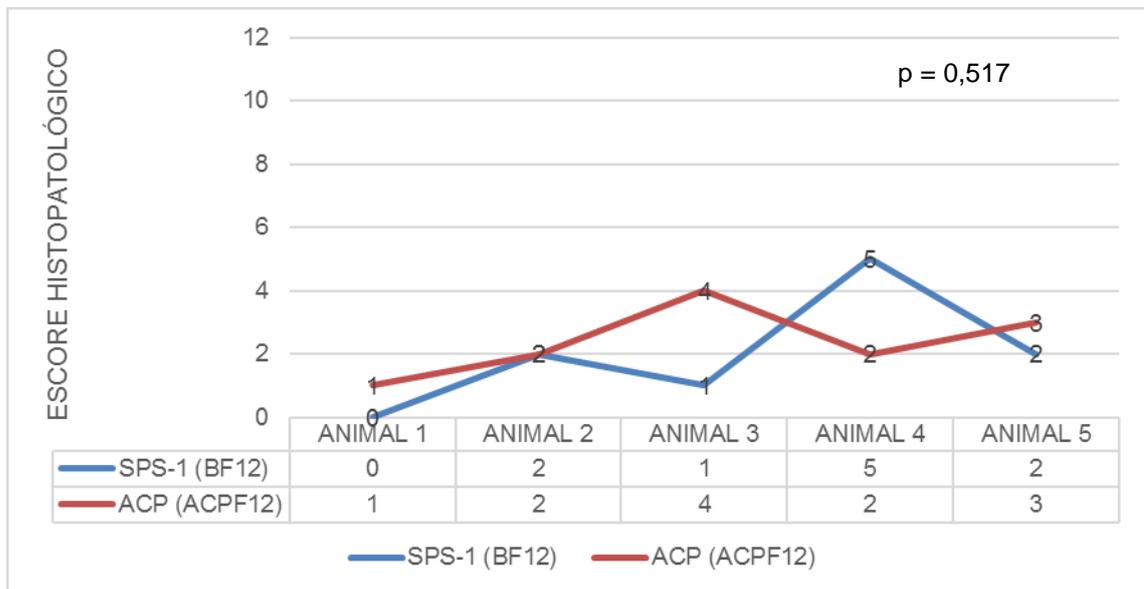
Fonte: Elaborado pela pesquisadora.

5.3 ANÁLISE NO TEMPO 12H

Na solução SPS-1, as amostras 2 e 4 apresentaram novamente alterações em seus escores finais: amostra 2 com somatório 2 (permanecendo como grau de lesão leve) e a amostra 4 com somatório 5. Na amostra 4, a mudança do escore final também representou uma reclassificação da gradação da lesão, de leve para moderada. As amostras 1, 3 e 5 continuaram com a mesma pontuação, continuando com grau de injúria caracterizado como leve.

Na solução ACP, as amostras 1 e 5 permaneceram com mesma pontuação do tempo 6h (escore 1 e 3, respectivamente), sendo classificada a injúria como leve. As amostras 2 e 4 apresentaram redução dos seus respectivos escores para 2. Na amostra 2 houve redução da pontuação na avaliação de vacuolização, enquanto na amostra 4 houve redução na avaliação de necrose. A amostra 3 apresentou aumento do somatório final para 4, com aumento da presença de vacuolização, mas ainda configurando lesão leve.

Gráfico 3 - Comparação no tempo 12h entre os escores histopatológicos finais nas soluções ACP e SPS-1.



Fonte: Elaborado pela pesquisadora.

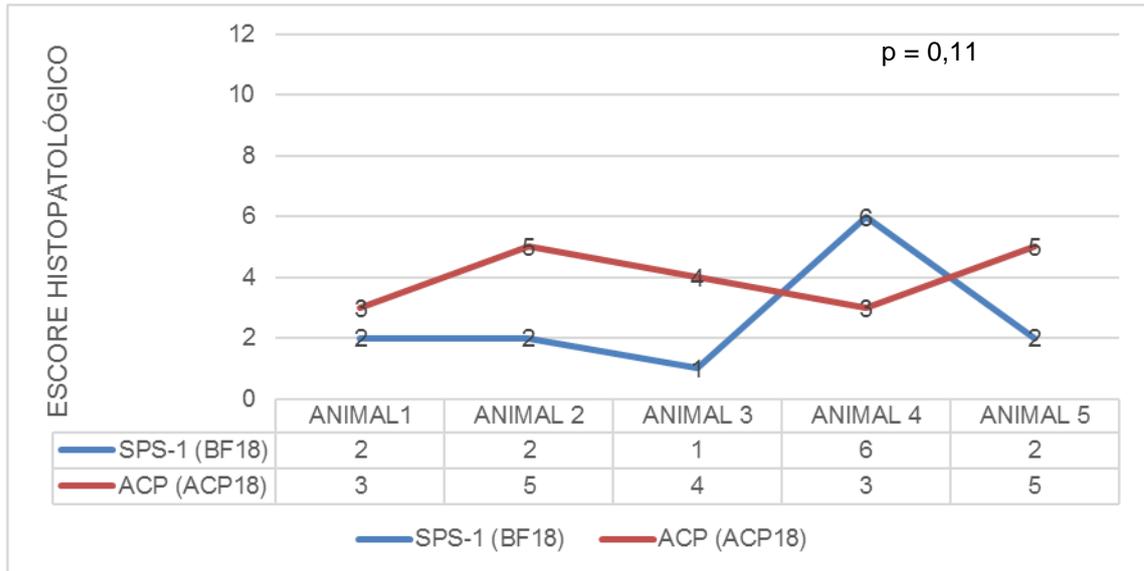
5.4 ANÁLISE DO TEMPO 18H

Na última fase da avaliação, tempo 18h, em solução SPS-1, apenas as amostras 1 e 4 apresentaram mudanças na pontuação final. A amostra 1 foi de 0 para 2, no somatório, porém isso significou apenas grau leve de lesão, enquanto a amostra 4 aumentou ainda mais seu escore final para 6, entretanto permaneceu como lesão de grau moderado. As outras amostras (2, 3 e 5) permaneceram com os escores finais semelhantes, sendo classificadas como lesão de grau leve (2,1 e 2 respectivamente), em conclusão.

Na avaliação das amostras preservadas em solução ACP reconstituída, as amostras 1 e 2 apresentaram mudanças do escore global para 3 e 5, respectivamente, configurando graus de lesão leve e moderado (houve aumento do grau de vacuolização nas duas amostras e o aparecimento de necrose). As amostras 4 e 5 também evoluíram com aumento dos seus escores globais para 4 e 5, configurando gradação final de injúria como leve e moderada, respectivamente. Na amostra 4, houve aumento do grau de necrose; enquanto na amostra 5 ocorreu aumento da vacuolização. A amostra 3 permaneceu com a mesma pontuação do tempo

12h (escore 4), ou seja, permanecendo com a classificação do grau de injúria leve.

Gráfico 4 - Comparação no tempo 18h entre os escores histopatológicos finais nas soluções ACP e SPS-1.



Fonte: Elaborado pela pesquisadora.

Nos quadros 5 e 6 encontramos a caracterização evolutiva da análise morfológica nos respectivos tempos, agrupadas por grupo padrão (solução SPS-1) e grupo de teste (solução ACP reconstituída).

Quadro 5 – Análise morfológica e classificação do grau de injúria das amostras preservadas em solução ACP reconstituída conforme tempo.

Amostras	Congestão	Vacuolização	Necrose	Soma	Grau de lesão
1ACPF0	0	0	0	0	Ausente
1ACPF6	0	1	0	1	Leve
1ACPF12	0	1	0	1	Leve
1ACPF18	0	2	1	3	Leve
2ACPF0	0	3	0	3	Leve
2ACPF6	0	3	0	3	Leve
2ACPF12	0	2	0	2	Leve
2ACPF18	0	3	2	5	Moderada
3ACPF0	0	0	1	1	Leve
3ACPF6	0	1	2	3	Leve
3ACPF12	0	2	2	4	Leve
3ACPF18	0	2	2	4	Leve
4ACPF0	0	0	1	1	Leve
4ACPF6	0	1	2	3	Leve
4ACPF12	0	1	1	2	Leve
4ACPF18	0	1	2	3	Leve
5ACPF0	0	0	1	1	Leve
5ACPF6	0	1	2	3	Leve
5ACPF12	0	1	2	3	Leve
5ACPF18	0	3	2	5	Moderada

Fonte: Elaborado pela pesquisadora.

Quadro 6 – Análise morfológica e classificação do grau de injúria das amostras preservadas em solução SPS-1 reconstituída conforme tempo.

Amostras	Congestão	Vacuolização	Necrose	Soma	Grado de Lesão
1BF0	0	0	0	0	Ausente
1BF6	0	0	0	0	Ausente
1BF12	0	0	0	0	Ausente
1BF18	0	0	2	2	Leve
2BF0	0	0	0	0	Ausente
2BF6	0	1	0	1	Leve
2BF12	0	1	1	2	Leve
2BF18	0	1	1	2	Leve
3BF0	0	1	0	1	Leve
3BF6	0	1	0	1	Leve
3BF12	0	1	0	1	Leve
3BF18	0	1	0	1	Leve
4BF0	0	4	0	4	Leve
4BF6	0	4	0	4	Leve
4BF12	0	4	1	5	Moderada
4BF18	1	4	1	6	Moderada
5BF0	0	1	0	1	Leve
5BF6	0	2	0	2	Leve
5BF12	0	2	0	2	Leve
5BF18	0	2	0	2	Leve

Fonte: Elaborado pela pesquisadora.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Tabela 4 - Distribuição dos valores de Soma entre os tipos de solução'

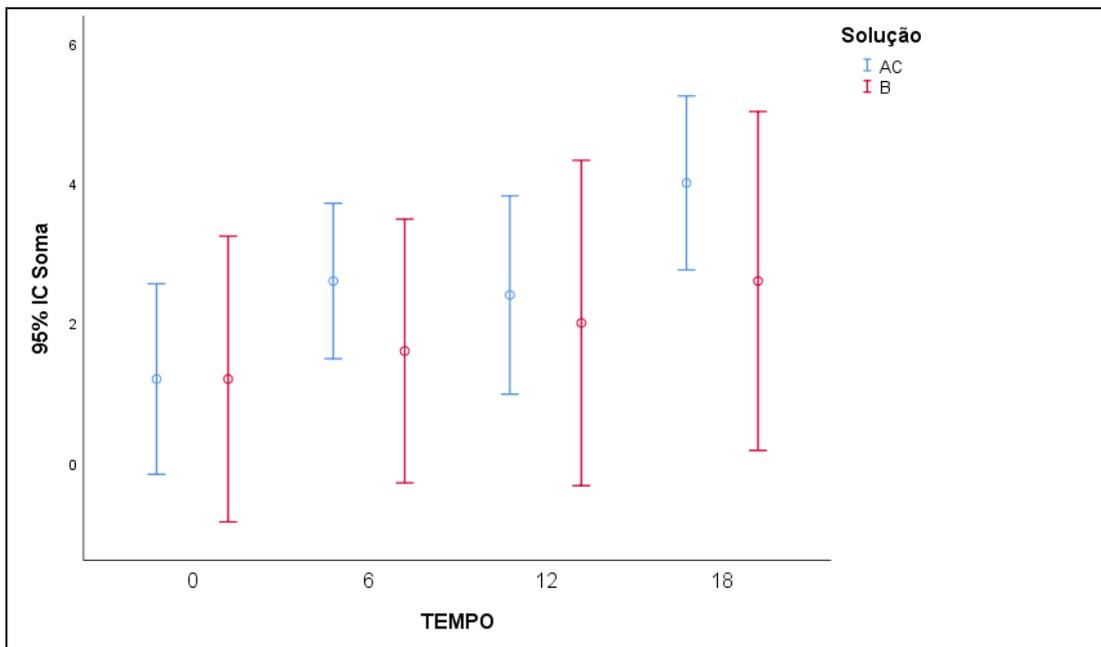
TEMPO (h)	GERAL	ACP	SPS-1	p ^a
0	1 (0 - 4)	1 (0 - 3)	1 (0 - 4)	0,735
6	3 (0 - 4)	3 (1 - 3)	1 (0 - 4)	0,23
12	2 (0 - 5)	2 (1 - 4)	2 (0 - 5)	0,517
18	3 (1 - 6)	4 (3 - 5)	2 (1 - 6)	0,11
p ^b	<0,01	0,014	0,029	

Fonte: Elaborada pela pesquisadora.

Obs.: Dados expressos em Mediana (Mínimo – Máximo) a: Teste de Mann-Whitney; b: Teste de Friedman

O teste Mann-Whitney não indicou diferença significativa entre os valores de Soma da solução AC e da B em nenhum dos tempos estudados. Na análise da Soma ao decorrer do tempo, utilizou-se o teste Friedman, detectando diferença significativa entre os tempos no Geral, $p < 0,01$, na substância AC, $p = 0,014$, e B, $p = 0,029$. Assim houve crescimento no valor de Soma nas categorias investigadas neste estudo.

Gráfico 5 - Comportamento da Soma nas duas soluções em cada um dos tempos.



Fonte: Elaborado pela pesquisadora.

Conforme exposto, a média da soma é demonstrada nos pontos e as barras são os intervalos de confiança. É possível perceber que entre as soluções ACP e a SPS-1, não houve diferença estatisticamente significativa entre as soluções.

6 DISCUSSÃO

O transplante de fígado, atualmente, é o único tratamento curativo para pacientes portadores de hepatopatia crônica terminal e falência hepática aguda. A sobrevida em 5 anos tem sido superior a 80% nos centros transplantadores de referência. O progresso nos resultados obtidos com o transplante de fígado se deve ao refinamento das etapas envolvidas em todo o processo de transplantação (técnicas cirúrgicas, preservação do enxerto, imunossupressão) (FEIERMAN, 2004; STEADMAN, 2004; MOORE et al., 2005; STARZL, 2005).

O transplante hepático, por se tratar de um procedimento de alta complexidade, possui ainda altas taxas de morbidade e mortalidade. Os pacientes podem evoluir com disfunção primária do enxerto, não função do enxerto, trombose de artéria hepática, rejeição aguda, rejeição crônica, recidiva da infecção do enxerto pelo vírus B ou C, recidiva de neoplasias, óbito intra-operatório por sangramento etc. Diversos fatores podem estar associados às referidas complicações e um dos mais relacionados é a injúria hepática decorrente do período de isquemia a qual o órgão foi submetido (MONGE; FERNANDEZ-QUERO; NAVIA, 2002).

O dano hepático induzido pela lesão isquemia/reperfusão é de natureza complexa e multifatorial, além de não ser completamente compreendido. O entendimento deste processo é de suma importância já que o dano orgânico ocorrido nesta fase tem relação direta com a viabilidade do enxerto. As complicações associadas a essa injúria são o não funcionamento primário, a disfunção primária do enxerto e a colangiopatia (estenoses biliares não anastomóticas) (LEMASTERS; BUNZENDAHL; THURMAN, 1995).

A disfunção primária do enxerto se caracteriza por um conjunto de alterações clínicas e laboratoriais transitórias representativas da má função do enxerto hepático após o transplante. O não funcionamento primário do enxerto se manifesta como um evento mais grave, catastrófico, no qual ocorrem necrose hepática grave, rápida elevação das transaminases,

coagulopatia, elevação do lactato, instabilidade hemodinâmica, hipoglicemia, e falência respiratória e renal. Contrariamente à disfunção primária do enxerto, na qual as manifestações são habitualmente transitórias e o fígado transplantado recupera a função, no não funcionamento primário ocorre a perda do enxerto e existe uma demanda por retransplante de urgência (POKORNY et al, 2000; UEMURA et al, 2007; NOVELLI et al, 2008).

Apesar do avanço nas técnicas do transplante, estas complicações continuam ocupando espaço importante no contexto clínico. Dessa forma, a redução da injúria isquêmica possibilitaria o aumento na disponibilidade de enxertos viáveis e melhores resultados pós-transplante, dada ainda a escassez de órgãos para transplante.

Um dos fatores mais críticos para a manutenção da viabilidade do enxerto durante o período isquêmico são as soluções de preservação. Desde os trabalhos iniciais, o foco de aprimoramento está nesse ponto, devido ao fato de ser muito mais difícil intervir nos mecanismos relacionados à isquemia quente/reperfusão. A solução mais utilizada atualmente é a solução de Belzer ou UW. Entretanto, ela ainda não é a ideal por apresentar custo elevado, alta viscosidade, e não impedir a disfunção primária do enxerto. Durante o procedimento de captação, é realizada a perfusão do enxerto com a solução de preservação (UPADHYA; STRASBERG, 2000).

De acordo com Segmeister et al. (2002), o custo do transplante hepático na Europa é menor do que nos Estados Unidos, porém, todos são bastante elevados: Suíça: 118.457 euros; Reino Unido: 49.920 a 70.200 euros; e Estados Unidos: 156.000 a 217.674 euros. Estes valores refletem a complexidade e a variação de gravidade entre os pacientes a serem transplantados.

Williams, Vera e Evans (1987) demonstraram que o valor médio do transplante hepático foi de US\$ 63.088, para pacientes estáveis, e de US\$ 143.591, para pacientes graves.

Segundo Coelho et al. (1997), o custo total do transplante hepático (captação e implante do enxerto) no Brasil foi de 21.582,90 dólares no

transplante cadavérico. Sendo o valor atual de 1 dólar equivalente a 3,84 reais, a conversão monetária resultaria em uma quantia total de 82.874,88 reais (bolsa de valores). Diante do valor do procedimento, percebe-se a necessidade de encontrar meios para reduzir os custos do processo sem interferir na qualidade do resultado, principalmente em um país com recursos limitados e graves problemas no âmbito da saúde pública.

Nesse ponto, além da necessidade de pesquisas envolvendo o desenvolvimento de novas técnicas com melhor desempenho, há ainda a motivação para a redução dos custos. As soluções de preservação são, atualmente, um dos principais alvos nesse contexto. As principais soluções utilizadas no transplante hepático são a solução UW, HTK e Euro-Collins. A média de valores para cada solução é respectivamente 282 dólares, 211 dólares e 40 dólares (UFRGS). Os valores de 1L de cada solução é bastante variável. A quantidade a ser utilizada é determinada conforme o peso do doador, podendo variar entre 0.8L até 5L de solução, durante a captação do fígado (ABTO livro). Dessa forma, durante o processo total a média de custo com solução de preservação pode, utilizando a cotação de 1 dólar = 3,84 reais, chegar à 5.414,40 reais.

Nessa perspectiva, a solução à base de água de coco se apresentou como um bioproduto promissor. A água de coco é rica em proteínas, aminoácidos, carboidratos, vitaminas, minerais e hormônios do crescimento, cruciais para o crescimento tissular. Ademais, a literatura tem evidenciado as propriedades diversas da água de coco relacionadas ao poder nutricional (eletrólitos e minerais) e na interferência dessa na resposta inflamatória (DebMANDAL; MANDAL, 2011).

Vários estudos demonstram que a água de coco verde (endosperma da *Cocos nucifera* L.) pode ser usada com sucesso na preservação dos folículos pré-antrais de caprinos e ovinos, sêmen de ovelhas, porcos e humanos. Além disso, a solução foi testada também como meio de conservação e maturação de oócitos imaturos de ovários bovino e como meio de cultura para embriões de camundongos e bovinos (COSTA et al., 2002; SILVA et al., 2010; CESAR et al., 2015).

A água de coco modificada também foi avaliada comparativamente à solução de Belzer, solução com composição semelhante à utilizada nesse estudo, para conservação de enxertos esplênicos, cutâneos e ovarianos de ratos, demonstrando a capacidade de preservação dos respectivos tecidos em água de coco, bem como de sua função (CESAR et al., 2015).

No presente estudo, foi utilizado um modelo animal de coelho para comparar a preservação de fígado usando solução ACP e SPS-1, contabilizando 05 animais em cada grupo, conforme estudos prévios como Jamieson et al. (1988); Butter et al. (1995); e Imran et al. (2009).

Uma diferença importante neste trabalho foi a realização da perfusão do órgão, técnica que diferiu das publicações mais recentes. Outro aspecto a se considerar é a escassez de pesquisas avaliando comparativamente a preservação hepática com solução à base de água de coco. No nosso trabalho, avaliamos morfológicamente a validação do uso da solução ACP como solução de preservação para tecido hepático.

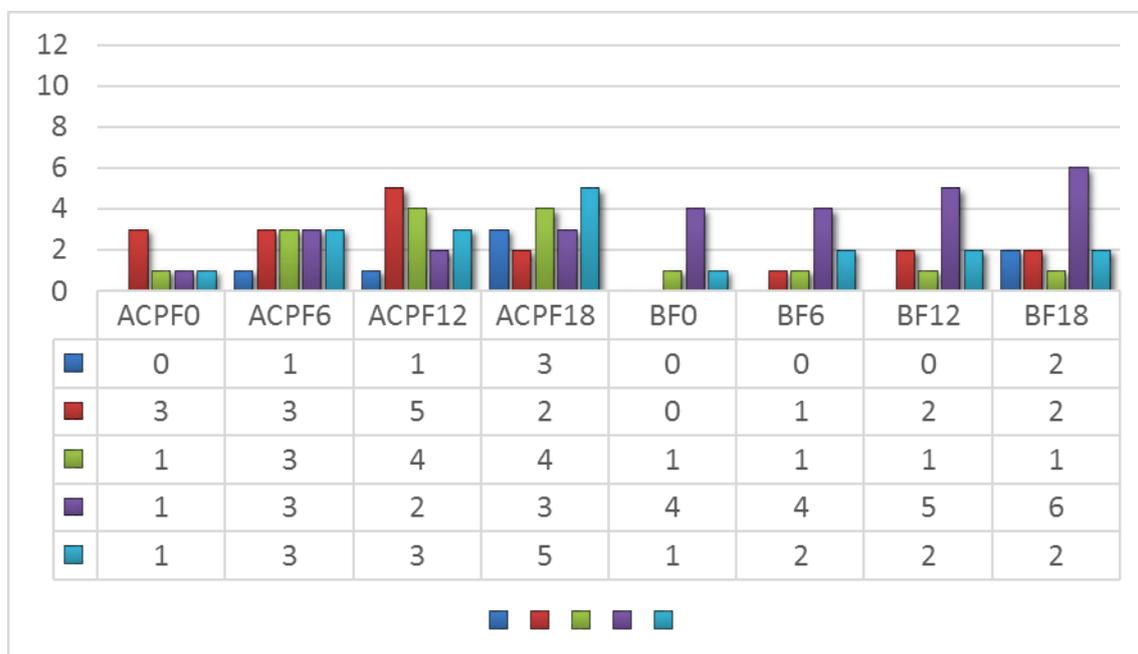
Ao compararmos os resultados entre o grupo teste e o grupo controle, nota-se que os resultados finais do grupo teste foram semelhantes ao do grupo controle. Todavia, o grupo controle apresentou melhores resultados numéricos finais, apesar de que, ao utilizarmos a classificação quanto ao grau de injúria, as graduações seguiram a mesma tendência. Na pontuação final, as amostras 2 e 5 do grupo teste apresentaram, ao final do tempo 18h, escore 5, compatível com lesão moderada; enquanto no grupo controle a amostra 4 apresentou escore 6, também compatível com lesão moderada. As amostras 1, 2, 3 e 5 do grupo controle, ao final do tempo 18h, apresentaram escores 0/2/1/2 respectivamente; enquanto as amostras 1,3 e 4 finalizaram seus escores com 3/4/3.

Apesar das diferenças numéricas absolutas, quando realizamos o tratamento dos dados, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as soluções, independente do tempo de análise (zero, 6h, 12h e 18h). Ao realizarmos a análise morfológica qualitativa, a descrição dos resultados também seguiu a mesma tendência da análise estatística, principalmente nas análises dos tempos 6h e 12h. Vários estudos têm

demonstrado que o tempo de isquemia superior a dez horas está diretamente relacionado com um mau funcionamento do enxerto (HOYER et al, 2015; NEVES et al, 2016).

Ao fazer a análise do tempo 12h, o que seria associado ao limite crítico de tempo para utilização de um enxerto adequado, observamos resultados interessantes. Nesse ponto, percebemos uma semelhança dos escores entre os grupos teste e controle. A comparação entre os grupos encontra-se no gráfico abaixo (gráfico 6):

Gráfico 6 – Comparação dos escores histopatológicos em todos os tempos nas soluções SPS-1 e ACP.



Fonte: Elaborado pela pesquisadora.

Esse resultado, dado à similaridade dos achados morfológicos entre as amostras, pode indicar o potencial relacionado ao uso de solução ACP como meio de preservação para órgãos. Alguns trabalhos estão sendo desenvolvidos para validar o uso dessa solução em órgãos.

A hipótese para a presença de lesão isquêmica na solução ACP relacionada ao próprio composto seria o fato de que a solução contém concentração elevada de potássio, o que poderia explicar a diferença de conservação entre as soluções, com tendência à maior vacuolização com a

ACP. Além disso, a variação da amostragem da secção do tecido deve ser lembrada, considerando também a pequena amostra estudada. A pressão osmótica da solução deve ser aprimorada no sentido de diminuir o potencial de edema celular. A forma de reconstituição e acondicionamento devem ser melhor desenvolvidos e padronizados, sendo a dependência da cadeia do frio um limitador no uso da solução.

Com esse resultado, estudos mais abrangentes podem ser realizados, para avaliar além da condição morfológica, a função do órgão avaliado; além da pesquisa de biomarcadores de lesão isquêmica. Ademais, é necessário pesquisar também a lesão de reperfusão, sendo esta a injúria mais estudada e outro fator crítico no processo de transplantação de órgãos.

A sugestão de utilização de um produto natural e de baixo custo para proporcionar uma preservação hepática adequada é extremamente válida, principalmente na realidade do sistema público de saúde, onde os recursos financeiros são precários.

7 CONCLUSÃO

A solução à base de água de coco em pó foi equiparável à solução padrão na avaliação de preservação morfológica até o tempo estabelecido para a rotina dos transplantes, sendo portanto o trabalho pioneiro em fígado.

Embora os resultados em relação à validade do uso da solução ACP reconstituída para preservação de fígado sejam animadores, o impacto dos resultados foi comprometido pelo número das amostras. Sugere-se que esse estudo seja continuado para a obtenção de um número expressivo de animais e também para compreender quais substâncias poderiam melhorar o resultado da ACP como solução de preservação.

Espera-se que esse estudo preliminar seja base para uma nova perspectiva de uso da água de coco como bioproduto eficaz e promissor, além de poder fundamentar a geração de uma nova patente útil para o Brasil.

REFERÊNCIAS

- ALEIXO, P.C.; NOBREGA, J.A.; SANTOS JÚNIOR, D.; MULLER, R.C.S. Determinação direta de selênio em água de coco e em leite de coco utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 310-312, 2000.
- ANDRADE, E. R.; AMORIM, C.A.; MATOS, M.H.T.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, J.R.V.; DODE, M.A.N.; FIGUEIREDO, J.R. Evaluation of saline and coconut water solutions in the preservation of sheep preantral follicles in situ. **Small Ruminant Research**, v.43, p.235-243, 2002.
- ARAGÃO, W. M. Produção de água de coco de cultivares de coqueiro verde. Sergipe: Embrapa, **Comunicado Técnico**, n. 42, 2005. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/34803/1/cot-42.pdf>. Acesso em: 13 maio 2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS – ABTO. Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada Estado. **Registro Brasileiro de Transplantes**, n. 4. 2016. Disponível em: <http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2016/RBT2016-leitura.pdf>. Acesso em: 10 out. 2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS – ABTO. **Registro Brasileiro de Transplante**, ano XXIV, n.2, Jan./Jun. 2018. Disponível em: <http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2018/rbt2018-1-populacao.pdf>. Acesso em: 09 out. 2018.
- BALFOUSSIA, D.; YERRAKALVA, D.; HAMAOU, K.; PAPALLOIS, V. Advances in machine perfusion graft viability assessment in kidney, liver, pancreas, lung, and heart transplant. **Experimental and Clinical Transplantation**, v.10, n.2, p.87-100, Apr. 2012.
- BARROS, M. A. P. **Avaliação da função hepática após o transplante de fígado**: estudo comparativo utilizando solução de Belzer e Collins. 2008. 58f. Dissertação. (Mestrado em Cirurgia) - Programa De Pós-Graduação Em Cirurgia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.
- BEJAOUI, M.; PANTAZI, E.; FOLCH-PUY, E.; BAPTISTA, P.M.; GARCÍA-GIL, A.; ADAM, R.; ROSELLÓ-CATAFAU, J. Emerging concepts in liver graft preservation. **World Journal of Gastroenterology**, v.21, n.2, p.396–407, Jan. 2015.
- BELZER, F.O.; SOUTHARD, J.H. Principles of solid-organ preservation by cold storage. **Transplantation**, v.45, n.4, p. 673-676, 1988.
- BEN ABDENNEBI, H.; STEGHENS, J.P.; MARGONARI, J.; RAMELLA-VIRIEUX, S.; BARBIEUX, A.; BOILLOT, O. High-Na⁺ low-K⁺ UW cold storage solution reduces reperfusion injuries of the rat liver graft. **Transplant International**, v.11, n.3, p.223-230, 1998.

BERENDSEN, T.A.; BRUINSMA, B.G.; PUTS, C.F.; SAEIDI, N.; USTA, O.B.; UYGUN, B.E.; IZAMIS, M.L.; TONER, M.; YARMUSH, M.L.; UYGUN, K. Supercooling enables long-term transplantation survival following 4 days of liver preservation. **Nature Medicine**, v.20, n.7, p.790-793, Jul. 2014.

BLUME, H.; VALE FILHO, V.R.; MARQUES, J.R.A.P; SATURNINO, H.M. Uso da água de coco no cultivo de embriões bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.21, n.1, p.78-81. 1997.

BRETSCHNEIDER, H.J. Myocardial protection. **Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v.28, n.5, p.295-302, Oct. 1980.

BUTTER, G. DEN, SAUNDER, A.; MARSH, D. C.; BELZER, F. O.; SOUTHARD, J. H. Comparison of solutions for preservation of the rabbit liver as tested by isolated perfusion. **Transplant International**, v.8, n.6, p.466–471, 1995.

CAMACHO, V.R.R. **A relação entre o dano de isquemia / reperfusão e o estímulo à fibrogênese em modelo experimental em fígado de ratos: comparando diferentes soluções de preservação.** 2010. 78f. Tese (Doutorado em Ciências em Gastroenterologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CAMPBELL-FALCK, D.; THOMAS, T.; FALCK, T.M.; TUTUO, N.; CLEM, K. The intravenous use of coconut water. **American Journal of Emergency Medicine**, v.18, n.1, p.108–111, Jan. 2000.

CESAR, J.M.S.; PETROIANU, A.; VASCONCELOS, L.S.; CARDOSO, V.N.; MOTA, L.G.; BARBOSA, A.J.A.; SOARES, C.D.V.; OLIVEIRA, A.L. Preliminary study of coconut water for graft tissues preservation in transplantation. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v.42, n.1, p.43–48, 2015.

CLAVIEN, P.A.; HARVEY, P.R.; STRASBERG, S.M. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts: an overview and synthesis of current studies. **Transplantation**, v.53, n.5, p.957-978, May 1992.

COELHO, J. C. U.; WIEDERKEHR, J. C.; LACERDA, M. A.; CAMPOS, A. C. L.; ZENI NETO, C.; MATIAS, J. E. F.; CAMPOS, G. M. R. Custo do transplante hepático no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.53–57, 1997.

COSTA, S.H.F.; SANTOS, R.R.; FERREIRA, M.A.L.; MACHADO, V.P.; RODRIGUES, A.P.R.; OHASHI, O.M.; FIGUEIREDO, J.R. Preservation of goat preantral follicles in saline or coconut water solution. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.39, n.6, p.324-330, 2002.

CTENAS, M.L.B.; CTENAS, A.C.; QUAST, D. Coco. In: CTENAS, M.L.B.; CTENAS, A.C.; QUAST, D. **Frutas das terras brasileiras.** São Paulo: C2, 2000. p. 99-103.

- DebMANDAL, M.; MANDAL, S. Coconut (*Cocos nucifera* L.: Areaceae): in health promotion and disease prevention. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.4, n.3, p.241-247, Mar. 2011.
- EDIRIWEERA, E.R.H.S.S. Medicinal uses of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Cocoinfo Int.** v.10, p.11–21, 2003.
- EL-WAHSH, M. Liver graft preservation: an overview. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v.6, n.1, p.12-16, Feb. 2007.
- FAHY, G.M.; WOWK, B.; WU, J.; PHAN, J.; RASCH, C.; CHANG, A.; ZENDEJAS, E. Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances. **Cryobiology**, v.48, n.2, p.157-178, Apr. 2004.
- FEIERMAN, D. E. The growing field of anesthesia for liver transplantation. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, v.18, n.6, p.825-826, Dec. 2004.
- FREITAS, A.C.T.; MATOS, D.M.N.; MILSTED, J.A.T.; COELHO, J.C.U. Efeitos do tempo de isquemia fria sobre os enxertos hepáticos. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v.30, n.4, p.239–243, 2017.
- FULLER, B.J.; PETRENKO, A.Y.; RODRIGUEZ, J.V.; SOMOV, A.Y.; BALABAN, C.L.; GUIBERT, E.E. Biopreservation of hepatocytes: current concepts on hypothermic preservation, cryopreservation, and vitrification. **Cryo Letters**, v.34, n.4, p.432-452, Jul./Aug. 2013.
- GARRERA, J.V.; KARIM, N.A. Liver preservation: is there anything new yet? **Current Opinion in Organ Transplantation**, v.13, n.2, p.148-154, Apr. 2008.
- GIOVANARDI, R. O. Efeitos do pré-condicionamento isquêmico e do pré-condicionamento farmacológico com a infusão de L-arginina intraportal sobre as lesões de isquemia e reperfusão. 2006. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Universidade Federal Do Rio Grande do Sul Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, 2006.
- GNAIGER, E.; KUZNETSOV, A.V.; KÖNIGSRAINER, A.; MARGREITER, R. Autooxidation of glutathione in organ preservation solutions. **Transplantation Proceedings**, v.32, n.1, p.14, Feb. 2000.
- GRAHAM, J.A; GUARRERA, J.V. “Resuscitation” of marginal liver allografts for transplantation with machine perfusion technology. **Journal of Hepatology**, v.61, n.2, p.418-431, Aug. 2014.
- GREZZANA FILHO, T.J.M. **Correlação entre os níveis de glutatião (GSH) pré-reperfusão com lesão tecidual hepática pós-reperfusão no transplante de fígado**. 2003. Dissertação (Mestrado em Medicina Cirurgia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.
- GUAN, L.Y.; FU, P.Y.; LI, P.D.; LI, Z.N.; LIU, H.Y.; XIN, M.G.; LI, W. Mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effects of nitric oxide. **World J Gastrointest Surg**, v.6, n.7, p.122-128, Jul. 2014.

GUIBERT, E.E.; PETRENKO, A.Y.; BALABAN, C.L.; SOMOV, A.Y.; RODRIGUEZ, J.V.; FULLER, B.J. Organ Preservation: Current Concepts and New Strategies for the Next Decade. **Transfus Med Hemother**, v.38, n.2, p.125-142, Apr. 2011.

HOLSCHER, M.; GROENEWOUD, A.F. Current status of the HTK solution of Bretschneider in organ preservation. **Transplantation Proceedings**, v.23, n.5, p.2334-2337, Oct. 1991.

HOYER, D.P.; PAUL, A.; GALLINAT, A.; MOLMENTI, E.P.; REINHARDT, R.; MINOR, T.; SANER, F.H.; CANBAY, A.; TRECKMANN, J.W.; SOTIROPOULOS, G.C.; MATHÉ, Z. Donor information based prediction of early allograft dysfunction and outcome in liver transplantation. **Liver International**, v.35, n.1, p.156-163, Jan. 2015.

IMRAN, A. A.; SAEED, A. K.; HASAN, M.; CHAUDRHY, N. A. Differential preservation of rabbit kidney and liver tissue in ringer lactate, euro collins and University of Wisconsin solutions. **Biomedica**, v.25, p.32–35, Jan./Jun. 2009.

ISHIGAMI, F.; NAKA, S.; TAKESHITA, K.; KURUMI, Y.; HANASAWA, K.; TANI, T. Bile salt tauroursodeoxycholic acid modulation of Bax translocation to mitochondria protects the liver from warm ischemia-reperfusion injury in the rat. **Transplantation**, v.72, n.11, p.1803-1807, 2001.

JAMIESON, N. V.; SUNDBERG, R.; LINDELL, S.; SOUTHARD, J. H.; BELZER, F. O. The isolated perfused rabbit liver as a model for assessment of organ preservation. **Transplantation Proceedings**, v.20, n.5, p.996–997, 1988.

JAMIESON, N.V. An overview of abdominal organ preservation for transplantation. In: HESSE, U.J.; DE HEMPTINNE, B. (Eds.) **Organ preservation with UW and HTK solution**. Lengerich: Pabst Science Publishers, 1999. p.19-36.

JIA, J.J.; LI, J.H.; JIANG, L.; LIN, B.Y., WANG, L.; SU, R.; ZHOU, L.; ZHENG, S.S. Liver protection strategies in liver transplantation. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v.14, n.1, p.34-42, Feb. 2015.

KALIL, A. N. et al. Transplante de fígado em crianças. In: GARCIA, C.D.; PEREIRA, J.D.; GARCIA, V.D. **Doação e transplante de órgãos e tecidos**. São Paulo: Segmento Farma, 2015. p. 385-401.

KEEFFE, E.B. Liver transplantation: current status and novel approaches to liver replacement. **Gastroenterology**, v.120, n.3, p.749-762, Feb. 2001.

KOHLI, V.; SELZNER, M.; MADDEN, J.F.; BENTLEY, R.C.; CLAVIEN, P.A. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. **Transplantation**, v.67, n.8, p.1099-1105, 1999.

LATCHANA, N.; PECK, J.R.; WHITSON, B.A.; HENRY, M.L.; ELKHAMMAS, E.A.; BLACK, S.M. Preservation solutions used during abdominal transplantation: current status and outcomes. **World J Transplant**, v.5, n.4, p.154-164, Dec. 2015.

LEAKE, I. Liver transplantation. Out in the cold: new supercooling technique extends liver storage time. **Nature Reviews Gastroenterology Hepatology**, v.11, n.9, p.517, Sep. 2014.

LEMASTERS, J. J.; BUNZENDAHL, H.; THURMAN, R. G. Preservation of the liver. In: MADDREY, W. C.; SCHIFF, E.; SORRELL, M. F. **Transplantation of liver**. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 251-268. Cap. 16.

LEMASTERS, J.J.; BUNZENDAHL, H.; THURMAN, R.G. Reperfusion injury to donor livers stored for transplantation. **Liver Transplantation and Surgery**, v.1, n.2, p.124-138, 1995.

LI, J.; BILLIAR, T.R. Nitric Oxide. IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. **American Journal of Physiology**, v.276, n.5, p.G1069-1073, May 1999.

LI, J.; LI, R.J.; LV, G.Y.; LIU, H.Q. The mechanisms and strategies to protect from hepatic ischemia-reperfusion injury. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v.19, n.11, p.2036-2047, Jun. 2015.

MADREY, W.C.; SCHIFF, E.R.; SORREL, M.F. **Transplantation of the liver**. 3.ed. Philadelphia: Lippincot, Williams and Wilkins, 2001.

MARSH, D.C.; LINDELL, S.L.; FOX, L.E.; BELZER, F.O.; SOUTHARD, J.H. Hypothermic preservation of hepatocytes. I. Role of cell swelling. **Cryobiology**, v.26, n.6, p.524-534, Dec. 1989.

McANULTY JF. Hypothermic organ preservation by static storage methods: Current status and a view to the future. **Cryobiology**, v.60, n.3 Suppl, p.S13-9, Jul. 2010.

MEINE, M.H.M.M. **Ensaio clínico randomizado da preservação de enxertos hepáticos com solução de perfusão de UW e HTK no transplante ortotópico de fígado**. 2005. 118f. Dissertação. (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MONGE, E.; FERNANDEZ-QUERO, L.; NAVIA J. Complicaciones médicas postoperatorias precoces Del trasplante hepático ortotópico em adultos. **Revista Española de Anestesiología y Reanimación**, v.49, p.29-540, 2002.

MOORE, D. E.; FEURER, I. D.; SPEROFF, T.; GORDEN, D. L.; WRIGHT, J. K.; CHARI, R. S.; PINSON, C. W. Impact of donor, technical, and recipient risk factors on survival and quality of life after liver transplantation. **The Archives of Surgery**, v.140, n.3, p.273-277, 2005.

MORARIU, A.M.; Vd PLAATS, A.V.; OEVEREN, W.; T'HART, N.A.;

- LEUVENINK, H.G.; GRAAFF, R.; PLOEG, R.J.; RAKHORST, G. 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, Jul. 2003.
- MUHLBACHER, F.; LANGER, F.; MITTERMAYER, C. Preservation solutions for transplantation. **Transplantation Proceedings**, v.31, n.5, p.2069-2070, 1999.
- NATORI, S.; SELZNER, M.; VALENTINO, K.L.; FRITZ, L.C.; SRINIVASAN, A.; CLAVIEN, P.A.; GORES, G.J. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism. **Transplantation**, v.68, n.1, p.89-96, 1999.
- NEBRIG, M.; NEUHAUS, P.; PASCHER, A. Advances in the management of the explanted donor liver. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v.11, n.8, p.489-496, Aug. 2014.
- NEVES, D. B.; RUSI, M. B.; DIAZ, L. G. G.; SALVALAGGIO, P. Primary graft dysfunction of the liver: definitions, diagnostic criteria and risk factors. **Einstein**, São Paulo, v.14, n.4, p.567–572, 2016.
- NOGUEIRA, R. D. M.; VASCONCELOS, P. R. L. Água de coco como meio de cultura em meio corneal de armazenamento: estudo experimental em coelhos. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 59, n. 6, p. 395-401, 2000.
- NOVELLI, G.; ROSSI, M.; POLI, L.; MORABITO, V.; BUSSOTTI, A.; PUGLIESE, F.; RUBERTO, F.; NOVELLI, S.; MENNINI, G.; BERLOCO, P.B. Primary nonfunction: timing retransplantation versus hemodynamic parameters and kidney function. **Transplantation Proceedings**, v.40, n.6, p.1854-1857, Jul./Ago. 2008.
- NUNES, J. F. A inseminação artificial como método alternativo para o melhoramento da caprinocultura leiteira. In: SIMPÓSIO DA CAPRINOCULTURA DO ESTADO DO RIO, 1., **Anais**. Niterói, 1986.
- NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M. Utilização da água de coco como diluente do sêmen de caprinos e ovinos. **Revista Científica de Produção Animal**, Areia, v.1, n.1, p.17-46, 1999.
- OLSCHEWSKI, P.; HUNOLD, G.; EIPEL, C.; NEUMANN, U.; SCHÖNING, W.; SCHMITZ, V.; PUHL, G. Improved microcirculation by low-viscosity histidine-tryptophan- ketoglutarate graft flush and subsequent cold storage in University of Wisconsin solution: Results of an orthotopic rat liver transplantation model. **Transplant International**, v.21, n.12, p.1175–1180, 2008.
- OP DEN DRIES, S.; KARIMIAN, N.; SUTTON, M.E.; WESTERKAMP, A.C.; NIJSTEN, M.W.N.; GOUW, A.S.H.; PORTE, R.J. Ex vivo normothermic machine perfusion and viability testing of discarded human donor livers. **American Journal of Transplantation**, v.13, n.5, p.1327–1335, May 2013.

POKORNY, H.; GRUENBERGER, T.; SOLIMAN, T.; ROCKENSCHAUB, S.; LÄNGLE, F.; STEININGER, R. Organ survival after primary dysfunction of liver grafts in clinical orthotopic liver transplantation. **Transplant International**, v.13, n.Suppl.1, p.S154-157, 2000.

PRADES, A.; DORNIER, M.; DIOP, N.; PAIN, J.P. Coconut water uses, composition and properties: a review. **Fruits**, Korbeek, v.67, n.2, p.87-107, Mar. 2012.

PUMMER, S.; HEIL, P.; MALECK, W.; PETROIANU, G. Influence of coconut water on hemostasis. **American Journal of Emergency Medicine**, v.19, n.4, p.287–289, Jul. 2001.

ROSA, M. F.; ABREU, F. A. P. **Água de coco**: métodos de conservação. Fortaleza: SEBRAE/CE, EMBRAPA, 2000. 42 p.

SAGMEISTER, M.; MULLHAUPT, B.; KADRY, Z.; KULLAK-UBLICK, G.A.; CLAVIEN, P.A.; RENNER, E.L. Cost-effectiveness of cadaveric and living-donor liver transplantation. **Transplantation**, v.73, n.4, p.616-622, Feb. 2002.

SALGUEIRO, C.C.M; NUNES, J.F. Água de coco em pó em biotécnica da reprodução de caprinos. **Ciência Animal**, Goiânia, v. 22, n.1, p.20-32, 2012.

SHIRAIISHI, M.; HIROYASU, S.; NAGAHAMA, M.; MIYAGUNI, T.; HIGA, T.; TOMORI, H.; OKUHAMA, Y.; KUSANO, T.; MUTO, Y. Role of exogenous L-arginine in hepatic ischemia-reperfusion injury. **Journal of Surgical Research**, v.69, n.2, p.429-434, May 1997.

SILVA, A.E.; CAVALCANTE, L.F.; RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. 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, Dec. 2010.

SILVA, F.O.; ARAÚJO, R.V.S.; SCHIRATO, G.V.; TEIXEIRA, E.H.; MELO JÚNIOR, M.R.; CAVADA, B.S.; LIMA FILHO, J.L.; CARNEIRO-LEÃO, A.M.A.; PORTO, A.L.F. Perfil de proteases de lesões cutâneas experimentais em camundongos tratadas com a lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n. 6, p. 1808-1814, Set.2009.

SILVA, J. R. V.; LUCCI, C.M.; CARVALHO, F.C.; BÁO, S.N.; COSTA, S.H.; SANTOS, R.R.; FIGUEIREDO, J.R. Effect of coconut water and Braun-Collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved in situ. **Theriogenology**, v. 54, n.5 p.809-822, Sep. 2000.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; COSTA, S. H. F.; ANDRADE, E. R.; NUNES, A. P. A.; FERREIRA, F. V. A.; FIGUEIREDO, J. R. Survival and growth of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. **Animal Reproduction Science**, v.81, n.3–4, p.273–286, 2004.

SOUTHARD, J.H.; BELZER, F.O. Organ preservation. **Annual Review of Medicine**, v.46, p.235-247, 1995.

SOUTHARD, J.H.; BELZER, F.O. Principles of organ preservation. In: BUSUTTIL, R.; KLINTMALM, B.B. (Ed.) **Transplantation of the liver**. Philadelphia: WB Saunders Company, 1996. p. 379.

STARLZ, T.E. The saga of liver replacement with particular reference to the reciprocal influence of liver and kidney transplantation (1955-1967). **Journal of the American College of Surgeons**, v.195, n.5, p.587-610, Nov. 2002.

STARZL, T. E. The mystique of organ transplantation. **Journal of the American College of Surgeons**, v.201, n.2, p.160- 170, Aug. 2005.

STEADMAN, R. H. Anesthesia for liver transplant surgery. **Anesthesiology Clinics of North America**, v.22, n.4, p.687-711, 2004.

STEFANOVICH, P.; EZZELL, R.M.; SHEEHAN, S.J.; TOMPKINS, R.G.; YARMUSH, M.L.; TONER, M. Effects of hypothermia on the function, membrane integrity, and cytoskeletal structure of hepatocytes. **Cryobiology**, v.32, n.4, p.389-403, Aug. 1995.

SUZUKI, S.; TOLEDO-PEREYRA, L.H.; RODRIGUEZ, F.J.; CEJALVO, D. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury: modulating effects of FK506 and cyclosporine. **Transplantation**, v.55, n.6, p.1265-1272, Jun. 1993.

TAYLOR, M.J.; BAICU, S.C. Current state of hypothermic machine perfusion preservation of organs: The clinical perspective. **Cryobiology**, v.60, n.3 Suppl., p.S20-S35, Jul. 2010.

UEMURA, T.; RANDALL, H.B.; SANCHEZ, E.Q.; IKEGAMI, T.; NARASIMHAN, G.; McKENNA, G.J.; CHINNAKOTTA, S.; LEVY, M.F.; GOLDSTEIN, R.M.; KLINTMALM, G.B. Liver retransplantation for primary nonfunction: analysis of a 20-year single-center experience. **Liver Transplantation**, v.13, n.2, p.227-233, 2007.

UPADHYA, G.A.; STRASBERG, S.M. Glutathione, lactobionate, and histidine: cryptic inhibitors of matrix metalloproteinases contained in University of Wisconsin and histidine/tryptophan/ketoglutarate liver preservation solutions. **Hepatology**, v.31, n.5, p.1115-1122, 2000.

WEEDER, P.D.; VAN RIJN, R.; PORTE, R.J. Machine perfusion in liver transplantation as a tool to prevent non-anastomotic biliary strictures: rationale, current evidence and future directions. **Journal of Hepatology**, v.63, n.1, p.265-275, Jul. 2015.

WIESNER, R.H.; RAKELA, J.; ISHITANI, M.B.; MULLIGAN, D.C.; SPIVEV, J.R.; STEERS, J.L.; KROM, R.A. Recent advances in liver transplantation. **Mayo Clin Proc**, v.78, n.2, p.197-210, Feb. 2003.

PWILLIAMS, J.W. History of Transplantation. In: WILLIAMS, J.W. **Hepatic Transplantation**. W.B.Saunders Company, 1990. p.31-43.

WILLIAMS, J.W.; VERA, S.; EVANS, L.S. Socioeconomic aspects of hepatic transplantation. **American Journal of Gastroenterology**, v.82, n.11, p.1115-1119, Nov. 1987.

ZAOUALI, M.A.; BEN ABDENNEBI, H.; PADRISSA-ALTÉS, S.; MAHFOUDH-BOUSSAID, A.; ROSELLÓ-CATAFAU, J. Pharmacological strategies against cold ischemia reperfusion injury. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v.11, n.4, p.537-555, Mar. 2010.

ANEXO

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética



CEUA INSTITUTO PARA DESENVOLVIMENTO DA EDUCAÇÃO LTDA IPADE
CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS

Of. No. 027/15

Protocolo do CEUA: 027/15

Pesquisador Responsável: Prof. ROMULO DA COSTA FARIAS

Título do Projeto: ESTUDO COMPARATIVO DA PRESERVAÇÃO DE ORGÃOS E TECIDOS UTILIZANDO SOLUÇÃO DA UNIVERSIDADE WISCONSIN E SOLUÇÃO À BASE DE ÁGUA DE COCO.

Levamos ao conhecimento de V. Sa que a Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA – IPADE considerou **APROVADO** o projeto supracitado na reunião do dia 26(vinte e seis) de novembro de 2015.

Descrição do animal utilizado:

Espécie: Coelho

Número 14
Amostral:

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE ao término do estudo, período máximo 26/11/2016.

Fortaleza, 26 de novembro de 2015.

Olga Vale Oliveira Machado
Coordenadora

CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE

Procurador (201) 112

22/01/16

Romulo da Costa Farias