

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Manoel Jacy Vilela Lima

**CONSTITUINTES MITOCONDRIAIS CIRCULANTES APÓS
TRANSPLANTE HEPÁTICO E A SUA CORRELAÇÃO COM
MARCADORES DE NECROSE CELULAR**

Faculdade de Medicina

Belo Horizonte 2015

Manoel Jacy Vilela Lima

**CONSTITUINTES MITOCONDRIAIS CIRCULANTES APÓS
TRANSPLANTE HEPÁTICO E A SUA CORRELAÇÃO COM
MARCADORES DE NECROSE CELULAR**

Tese apresentada ao curso de pós- graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da UFMG como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches.

Co-orientador: Prof. Dr. Cristiano Xavier Lima.

Faculdade de Medicina - UFMG

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Dr. Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitora: Prof^a. Dr^a. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Dr. Renato de Lima dos Santos

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Dr. Humberto José Alves

Coordenadora do Centro de Pós-Graduação: Prof^a. Dr^a. Sandhi Maria Barreto

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação: Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Simões e Silva

Chefe do Departamento de Cirurgia: Prof. Dr. Renato Santiago Gomes

Chefe do Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia: Prof^a. Dr^a. Ana Rosa Figueiredo Pimentel

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas

à Cirurgia e à Oftalmologia: Prof. Dr. José Renan da Cunha Melo

Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas

à Cirurgia e à Oftalmologia: Prof^a. Dr^a. Ivana Duval de Araújo

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia:

Prof. Dr. José Renan da Cunha Melo

Prof^a. Dr^a. Ivana Duval Araújo

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Prof^a.Dr^a. Maria Isabel Toulson Davisson Correa

Prof. Dr. Marco Aurélio Lana Peixoto

Prof. Dr. Marcio Bittar Nehemy

Representante Discente: José Carlos Souza Vilela

SUPORTE FINANCEIRO

Esta pesquisa recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) por meio do projeto APQ-02106-09 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por meio do projeto de bolsas de iniciação científica PIBIC/CNPq - 2009/2010.

AGRADECIMENTOS

Primeiro agradeço ao Professor Dr. Marcelo Dias Sanches, orientador, amigo, que sempre me incentivou e me deu a oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Professor Dr. Cristiano Lima Xavier, co-orientador que, com sua dedicação, inteligência, esforço e dinamismo nos introduziu na pesquisa básica de resposta inflamatória, que constitui uma fronteira do conhecimento, ciência de ponta. A ele sou grato por este trabalho e por meu grande entusiasmo.

Ao Professor Dr. Gustavo Batista de Menezes e ao Dr. Pedro Elias Marques Pereira Silva pelos seus trabalhos: fonte de conhecimento, inspiração e referência em lesão hepática inflamatória.

À Professora Dr^a. Daniele da Gloria de Souza e à Doutoranda Raquel Duque do Nascimento Arifa pela inestimável contribuição na dosagem dos DNA mitocondriais.

Aos médicos Guilherme de Freitas Araújo, Guilherme Cançado, Grisson Camilo de Lellis Junior, Rodrigo Ralemadhá Gonçalves Rodrigues e Jader de Freitas Maciel pelo empenho na coleta de dados e amostras de sangue dos pacientes, na época bolsistas de iniciação científica.

As enfermeiras Malvina Maria de Freitas Duarte, Ângela Aparecida Lima, Josely Santana Amorim pela colaboração na orientação dos pacientes na adesão à pesquisa.

Aos Professores Doutores Alcino Lázaro da Silva, José Renan da Cunha Melo e Paulo Roberto Savassi Rocha pelo exemplo e admiração.

Aos colegas e amigos quase irmãos Professor Dr. Sergio Alexandre da Conceição e Professora Dr^a. Magda Profeta da Luz, pelo convívio diário.

Aos colegas do Grupo de transplante pela caminhada dura mas solidária, em especial à equipe cirúrgica: Omar Lopes Cançado Júnior, Marcelo de Medeiros Chaves França, Leandro Ricardo de Navarro Amado, Maria Cecília Souto Lúcio de Oliveira, João Ricardo de Miranda Zocrato, Maria Eva Costa Zocrato, Silvia Zenóbio, Evandro Luis Oliveira Costa, Luiz Fernando Veloso e Alexandre Prado de Resende.

Ao colega Bruno Salomé de Moraes, pela valiosa ajuda na execução deste trabalho, sem a qual não seria possível realiza-lo.

Ao Professor Dr. Agnaldo Soares Lima, coordenador do Grupo de Transplante de Órgãos do IAG e autor do programa de coleta de dados do transplante, que muito me ajudou.

A professora Dr^a. Paula Vidigal pela gentileza de fornecer as ilustrações para a apresentação.

Aos pacientes que concordaram em participar da pesquisa.

As secretárias da Residência Médica: Fatinha pelo apoio e estímulo, e a Erica pela paciência de me ensinar as dúvidas corriqueiras da computação.

Ao Marco Aurélio Leite dos Reis pelo auxílio constante nas dúvidas de computação.

Ao funcionário do transplante, Mateus Pedrosa, pela ajuda na recuperação dos dados dos pacientes.

Aos alunos e residentes, fonte de estímulo para continuar a estudar.

À minha querida mulher, companheira solidária e sempre presente na minha vida.

A meus queridos filhos: Mateus e Fernanda.

Às minhas irmãs: Glória, Vânia e Ezinha e ao irmão José Expedito meus grandes incentivadores. A lembrança constante da presença amiga da minha mãe.

À turma do bar do Didi pelas boas gargalhadas e descontração nas prosas jogadas fora nos fins de semana em Nepomuceno, sempre animadas pela cervejinha geladíssima e pelos tira-gostos irresistíveis, com a promessa de reaparecer depois de terminar o doutorado.

À Deus pela vida.

RESUMO

O sistema imunológico natural é essencial para a defesa do organismo contra vírus, bactérias e protozoários. Está presente na cadeia evolutiva desde os anelídeos. Macrófagos, neutrófilos e também outras células não diretamente relacionadas ao sistema imunológico apresentam receptores na sua membrana plasmática e no citoplasma que reconhecem estruturas presentes nas bactérias e nos vírus, dentre outros. A ativação dos receptores do sistema imunológico natural é fundamental para a defesa e limpeza dos tecidos, passo fundamental para a cicatrização. No transplante hepático ocorre lesão de isquemia e reperfusão e morte celular com extravasamento dos constituintes dos hepatócitos, desencadeando a resposta imunológica. Essa resposta é, geralmente, de pequena repercussão, mas em caso de estímulo excessivo pode ocasionar mais necrose e inflamação sistêmica, com consequências graves como o não funcionamento primário do enxerto, disfunção precoce do fígado e reação inflamatória sistêmica com falência de múltiplos órgãos. Entre os constituintes extravasados, destacam-se os mitocondriais. O objetivo desse trabalho foi avaliar a presença de constituintes mitocondriais circulantes no perioperatório de transplante hepático e correlacioná-los com as aminotransferases e o tempo de isquemia. Foram dosados os seguintes ácidos desoxirribonucleicos mitocondriais: DNA nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), DNA citocromo B e DNA citocromo C oxidase em amostras de sangue de pacientes submetidos a transplante hepático com doador cadáver, colhidas imediatamente antes da clampagem da veia porta e 8 horas após a reperfusão do enxerto. Verificou-se aumento significativo dos constituintes mitocondriais no período pós-operatório e esse aumento teve correlação com a elevação das aminotransferases (aspartatoaminotransferase - AST e alaninoaminotransferase - ALT). Estes achados podem contribuir para o melhor entendimento do fenômeno: resposta imunológica natural desencadeada pela lesão de isquemia e reperfusão no transplante hepático.

Palavras-chave: transplante hepático, lesão de isquemia e reperfusão, resposta inflamatória sistêmica, sistema imunológico natural

ABSTRACT

The natural immune system is essential to body's defense against viruses, bacteria and protozoa. It is present in evolutionary chain since annelids. Macrophages and neutrophils and other cells, not direct related to the immune system, have receptors on their membrane and cytoplasm that recognize viruses and bacteria. Natural immune system receptor's activation is critical for protection and cleaning of tissue, fundamental step towards healing. Ischemia and reperfusion injury and cell death occur in liver transplantation. The constituents of hepatocytes spill out of the cell triggering the immune response. This immune response has usually small impact but in case of excessive stimulation may cause more inflammation and necrosis stimulation, with serious consequences as no primary graft functions, early dysfunction of the liver and systemic inflammatory response with multiple organ failure. Among these molecular structures are the mitochondrial structures. The objective of this study was evaluate the presence of circulating mitochondrial constituents during perioperative period in liver transplantation and correlates them with aminotransferases and the ischemia time. . The following mitochondrial acids deoxyribonucleic were measured: DNA nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), DNA cytochrome B e DNA cytochrome C oxidases in blood samples of patients undergoing hepatic transplantation from cadaver donor collected immediately before portal vein clamping and eight hours after graft reperfusion. It was found a significant increase of the mitochondrial constituents after the transplant procedure and its association with the raise of hepatic enzymes (aspartatoaminotransferase - AST e alaninoaminotransferase - ALT). These findings may contribute for a better understanding of the phenomenon: natural immune response stimulated by ischemia and reperfusion injury in the hepatic transplantation.

Key words: hepatic transplantation, ischemia and reperfusion injury, systemic inflammatory response, natural immune system

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Difosfato de adenosina
AIF	Fator indutor de apoptose
AIM	Receptores tipo ausente em melanoma
ALT	Alaninoaminotransferase
AST	Aspartatoaminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
CARS	Síndrome da resposta antiinflamatória compensatória
CES	Células endoteliais sinusoidais
CK	Celulas de Kupffer
CLR	Receptores de lecitina tipo C
CNPq	Conselho Nacional de Pesquisa
Co	Coenzima
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CXCL	Quimiocina homóloga ao CXCL8 humano
CXCR2	Receptor de quimiocinas 2
DAMP	Padrão molecular associado a dano
DNA	Ácidos desoxirribonucleicos
DNASE	Desoxirribonuclease
EC	Endotélio sinusoidal
FADH	Flavina adenina dinucleotídeo reduzida
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais
Fas	Receptor da membrana plasmática
f-MLP	Peptídeo formilado
FPR1	Receptor peptídeo formilado 1
HC	Hospital das Clínicas
HIF-1	Fator 1 hipóxia induzido
HMGB-1	<i>High-mobility group box 1</i>
IAG	Instituto Alfa de Gastroenterologia
IC	Intervalo de confiança
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IR	Isquemia e reperfusão
IRA	Insuficiência renal aguda

kDa	Quilodálon
LIR	Lesão de isquemia e reperfusão
LPS	Lipopolissacarídeo
MOF	Falência de múltiplos órgãos
MPT	Permeabilidade mitocondrial
MPTP	Poros mitocondrial de permeabilidade transicional
mtDNA	DNA mitocondrial
mtDAMP	Padrão molecular associado a dano de origem mitocondrial
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo mais um átomo de hidrogênio e dois elétrons reduzida
NET	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NFκβ	Fator nuclear kappa beta
ng/μL	Nanograma/microlitro
NK	<i>Natural killer</i>
NLR	Receptor tipo NOD
PAM	Pressão arterial média
PAMP	Padrão molecular associado a patógeno
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pi	Fósforo inorgânico
PICS	Síndrome de persistente inflamação, imunossupressão e catabolismo.
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
Rip	Receptor que interage com a proteino-quinase 1
RLR	Receptor do tipo RIG-I
ROS	Espécie reativa de oxigênio
rpm	Rotação por minuto
SIRS	Síndrome de resposta inflamatória sistêmica
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TFAM	Fator A transcricional regulador da mitocôndria
TH	Transplante hepático
TLR4	Receptor tipo- <i>toll</i>
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variação da concentração plasmática de DNA mitocondrial.	49
Tabela 2 - Avaliação da associação do aumento de DNAm com o aumento de aminotransferases no plasma.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do sinusoide e a microcirculação hepática	21
Figura 2 - A fosforilação oxidativa	24
Figura 3 - A necrose de hepatócitos na LIR	33
Figura 4 - Mediadores e receptores envolvidos no recrutamento de neutrófilos para a lesão hepática estéril	35
Figura 5 - MPT induz morte de hepatócitos.....	38

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Indicações de transplante hepático.	48
Gráfico 2 - Comparação do valor de NADH entre T1 e T2 (n=46).....	50
Gráfico 3 --- Comparação do valor de citocromo B entre T1 e T2 (n=44).	51
Gráfico 4 - Comparação do valor de citocromo C oxidase entre T1 e T2 (n=47).	52
Gráfico 5 - Correlação entre os valores de NADH (ng/μL de DNA) e AST (U/L)	53
Gráfico 6 - Correlação entre os valores de NADH (ng/μL de DNA) e ALT (U/L)	54
Gráfico 7 - Correlação entre os valores de Citocromo B (ng/μL de DNA) e AST (U/L)	54
Gráfico 8 - Correlação entre os valores de Citocromo B (ng/μL de DNA) e ALT (U/L)	55
Gráfico 9 - Correlação entre os valores de Citocromo C (ng/μL de DNA) e AST (U/L)	55
Gráfico 10 - Correlação entre os valores de Citocromo C (ng/μL de DNA) e ALT (U/L)	56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais funções exercidas pelo fígado	19
---	----

SUMÁRIO¹

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. O fígado: anatomia e fisiologia.....	18
1.2. . A unidade funcional do fígado: lóbulo.....	19
1.3. . Mitocôndrias.....	21
1.4. . Lesão de isquemia e reperfusão.....	24
1.4.1. Tipos e fase da lesão de isquemia e reperfusão.....	26
1.4.2. Mitocôndria, o maior gerador de ROS na IR	27
1.4.3. ROS hepatocelular desencadeia a inflamação estéril.....	31
1.4.4. Os neutrófilos: efetores da resposta inflamatória.....	33
1.4.5. Mecanismo da morte celular na LIR.....	35
1.5. .. A inflamação: história e fisiopatologia.....	38
2. OBJETIVOS.....	43
3. MÉTODO.....	44
3.1. . Critérios de inclusão.....	44
3.2. . Critérios de exclusão.....	45
3.3. .. Coleta dos dados clínicos/demográficos dos pacientes.....	45
3.4. . Coleta das amostras de sangue.....	45
3.5. .. Análise das amostras de sangue.....	46
3.5.1. Quantificação de DNA mitocondrial circulante por <i>real-time</i> PCR.....	46
3.5.2. Dosagens de ALT e AST	47
3.6. .. Análise Estatística.....	47
4. RESULTADOS	48
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÃO	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
8. ANEXOS.....	73

1

Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas aprovadas pelo Acordo Ortográfico assinado entre os países que integram a Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP), em vigor no Brasil desde 2009. E foi formatado de acordo com a ABNT NBR 14724 de 17.04.2011.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O fígado: anatomia e fisiologia

O fígado é um órgão volumoso localizado na parte superior do abdome, tendo a forma de um ovoide seccionado em seu eixo maior, ficando à esquerda a parte mais delgada e a parte maior à direita. Seu peso varia consideravelmente, sendo correspondente a 2% do peso corporal, em geral de 1.600g a 2.000g. Recebe sangue venoso através da veia porta, proveniente das veias mesentéricas e esplênica. O sangue arterial chega ao fígado vindo do tronco celíaco, ramo da aorta. O fluxo sanguíneo pela veia porta é três vezes superior ao fluxo da artéria hepática, apesar de cada fornecer 50% do oxigênio para o fígado. A integridade da via biliar é mantida pela artéria hepática¹⁻³.

O fluxo sanguíneo que atravessa os sinusoides é de cerca de 1.100mL por minuto sendo que 350mL por minuto vem da artéria hepática. A pressão na veia hepática é de 0mmHg e na veia porta de 9mmHg. Esta se altera nos processos fibróticos do fígado e nas doenças que alteram a sua arquitetura, podendo a pressão venosa na porta atingir 40mmHg.

Tem consistência firme, de coloração vermelha amarronzada usualmente molda-se na cúpula diafragmática e nas últimas costelas⁴⁻⁶. É recoberto por uma cápsula fibrosa, ou cápsula de Glisson, e envolvido por serosa. No hilo hepático a cápsula fibrosa penetra no fígado, com ramificações que acompanham os vasos e os ductos biliares. Somente três áreas são desprovidas de peritônio: aquela em que o fígado se mantém em contato com o diafragma, a fosseta da vesícula e a fosseta da veia cava^{7,8}.

O suprimento sanguíneo da veia porta é pobre em oxigênio, mas carregado de nutrientes e substâncias resultantes da absorção intestinal. O sangue caminha lentamente no interior do fígado, nos capilares sinusoidais, permitindo íntimo contato com as células de defesa e os hepatócitos. Como está interposto entre o intestino e a circulação sistêmica, possui importante papel tanto no metabolismo quanto imunológico, na neutralização de produtos da digestão e de toxinas bacterianas intestinais absorvidas (QUADRO 1)⁹.

Quadro 1 - Principais funções exercidas pelo fígado

Metabolismo de carboidratos	Armazenar glicogênio Neoglicogênese Manter os níveis normais de glicose
Metabolismo de gorduras	Betaoxidação de ácidos graxos para a produção do colesterol e sais biliares Metabolismo de fosfolipídios
Metabolismo de proteínas	Desaminação de aminoácidos Formação da ureia e amônia Síntese de aminoácidos Produção de proteína plasmática, albumina, transferrina e ceruloplasmina
Outras	Produção dos fatores da coagulação, fibrinogênio e protrombina Armazenamento de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) Armazenamento de vitamina B12. Metabolização de drogas Metabolização e excreção de hormônios

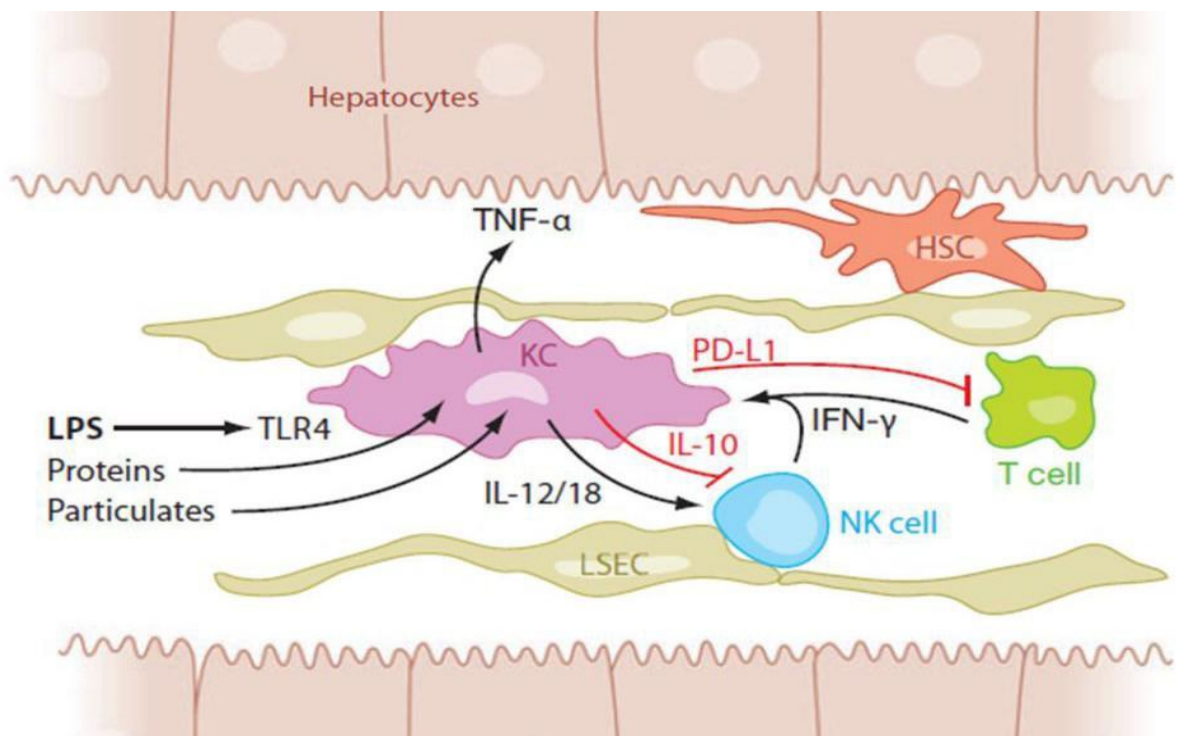
1.2. A unidade funcional do fígado: lóbulo

A unidade funcional do fígado é o lóbulo, de formato grosseiramente hexagonal, que consiste de cordões de hepatócitos separados por sinusoides que se dirigem radialmente para uma veia central, com a tríade porta nos vértices do hexágono. A veia central é tributária das veias hepáticas. Os lóbulos não têm separação nítida e o tecido conjuntivo é escasso. Os hepatócitos estão dispostos em lâminas com espessura reduzida, envolvendo os sinusoides e estes convergem até uma veia centrolobular, que converge para as veias hepáticas. Os ramos da veia porta, artéria hepática e duto biliar dividem-se em ramos menores à medida que penetram o parênquima hepático. Estão envolvidos por uma cápsula fibrosa originária da cápsula de Glisson¹⁰⁻¹².

Nos septos encontram-se pequenas vênulas portais e arteríolas hepáticas, que se abrem nos sinusoides. As células endoteliais que forram os sinusoides (CES) apresentam características distintas: são delgadas, não têm lâmina basal e possuem aberturas. Tais particularidades associadas ao fluxo lento do sangue nos capilares hepáticos permitem ao hepatócito contato com moléculas oriundas da absorção intestinal, que chegam ao fígado pela veia porta.

Os macrófagos encontram-se dentro dos sinusoides sobre as CES. Outras células do sistema imunológico podem ser encontradas nos sinusoides, como os linfócitos T, *natural killer* (NK) e NK T. No espaço de Disse, localizado entre os hepatócitos e as células endoteliais, encontram-se as células de Ito e outras células mesenquimais. As células de Ito podem armazenar lipídeos como a vitamina A. Podem, ainda, atuar como precursores na síntese de colágeno nas doenças parenquimatosas do fígado¹³.

As células de Kupffer (CK) em conjunto com CES formam o maior sistema reticuloendotelial do corpo, que basicamente têm a função de capturar antígenos, microrganismos, células neoplásicas e células senescentes eliminando-as do sangue¹⁴. Essa função de filtro impede que grandes quantidades de lipopolissacarídeo (LPS), restos celulares e microrganismos da microbiota atinjam a circulação sistêmica, prevenindo a disseminação de patógenos em condições homeostáticas e patológicas (FIG. 3)¹⁵.



Cordões de hepatócitos revestidos de células endoteliais com fenestração. Dentro do capilar, células imunológicas: células de Kupffer (rosa), linfócito T (verde) e NK (azul) e a célula de ITO (laranja) entre hepatócito e célula endotelial. Estrutura que permite ao fígado sua dupla função: metabólica e imunológica.

Fonte: extraído de Crispe¹⁶

Figura 1 - Estrutura do sinusoide e a microcirculação hepática

1.3. Mitocôndrias

As mitocôndrias ocupam uma porção substancial de volume das células eucariontes. Sem as mitocôndrias as células animais seriam dependentes do metabolismo da glicólise anaeróbica para produzir o seu trifosfato de adenosina

(ATP). Quando a glicose é convertida em piruvato pela glicólise, apenas pequena fração de toda a energia livre potencialmente disponível da glicose é liberada.

Na mitocôndria, o metabolismo dos açúcares é completado: o piruvato é oxidado pelo oxigênio molecular a dióxido de carbono e água. A energia liberada é aproveitada tão eficientemente, que são produzidas 36 moléculas de ATP para cada molécula de glicose oxidada. Em contraste, somente duas moléculas de ATP são produzidas pela glicólise¹⁷.

A mitocôndria possui uma membrana externa e outra interna, definindo dois compartimentos: o espaço interno ou matriz e o espaço intermembranas. A membrana externa comporta-se como um filtro e é permeável a toda molécula de 5kDa (quilodáltons) ou menores, incluindo pequenas proteínas. Tais moléculas podem passar para o espaço intermembrana, mas a maioria não pode passar para o espaço interno.

A matriz mitocondrial contém uma variedade de enzimas, incluindo aquelas que convertem piruvato e ácidos graxos em acetil coenzima A (CoA) e aquelas que convertem acetil CoA em CO₂, a partir do ciclo do ácido cítrico.

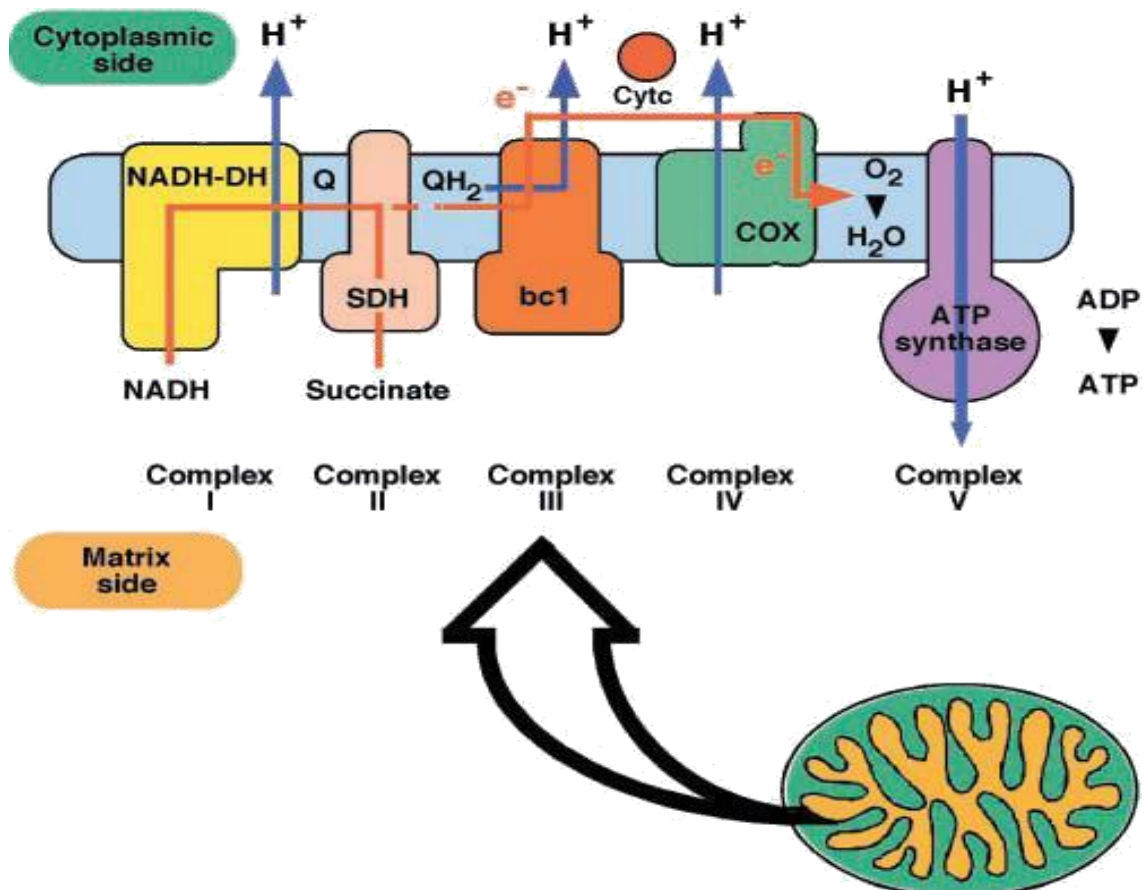
Grandes quantidades de NADH e FADH₂ são produzidas. Os elétrons do nicotinamida adenina dinucleotídeo mais um átomo de hidrogênio e dois elétrons reduzida (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo reduzida (FADH₂) combinam com O₂ e a grande quantidade de energia liberada dessas reações é usada para a síntese de ATP. A transferência de elétrons do NADH para o O₂ é uma reação altamente energética e, para que possa ser usada pela mitocôndria, a energia deve ser liberada gradualmente pela passagem dos elétrons através de uma série de carregadores, que constituem a cadeia de transporte de elétrons. Estes carregadores estão organizados em quatro complexos na membrana mitocondrial

interna. Um quinto complexo proteico serve para acoplar as reações geradoras de energia do transporte de elétrons à síntese de ATP.

Os complexos enzimáticos transportadores de elétrons acoplam o transporte de elétrons energeticamente favorável com o bombeamento de íon de hidrogênio (H^+) para fora da matriz mitocondrial. Os prótons somente conseguem atravessar a membrana interna através de um canal proteico, já que a bicamada de fosfolípides da membrana interna é impermeável ao hidrogênio. O gradiente eletroquímico de prótons resultante é adaptado para sintetizar ATP por meio do quinto complexo envolvido na fosforilação oxidativa, a ATP sintetase, através da qual o H^+ flui de volta à matriz. A ATP sintetase é uma máquina acopladora reversível que normalmente converte o refluxo de H^+ em energia de ligação do fosfato no ATP, catalisando a reação difosfato de adenosina + fosfato inorgânico ATP ($ADP + P_i \rightarrow ATP$). Mas pode também trabalhar na direção oposta e hidrolisar o ATP para bombear H^+ , se o gradiente de prótons for reduzido (FIG. 2).

A combinação dessas reações é responsável por eficiente troca ATP-ADP entre mitocôndria e citosol, o que mantém o estoque de ATP, que pode ser usado pelas células em suas múltiplas funções, dependentes de energia¹⁷.

É aceito que a mitocôndria e plastídios (cloroplastos) evoluíram de procarióticos que foram englobados por células eucariotas há cerca de $1,5 \times 10^9$ anos atrás. Isso explica por que mitocôndrias têm seus próprios ácidos desoxirribonucleicos (DNA), os quais codificam algumas proteínas. Na evolução perderam muito do seu genoma e tornaram-se altamente dependentes de proteínas codificadas pelo núcleo, sintetizadas no citosol e, finalmente, importada para a mitocôndria. As células hospedeiras tornaram-se altamente dependentes da organela pela grande quantidade de ATP necessário para conduzir suas funções: biossíntese, bombeamento de íons e seus movimentos.



As enzimas da membrana mitocondrial interna envolvidas na fosforilação oxidativa. Em amarelo, o complexo I; em rosa, o complexo II; em vermelho, o complexo III; em verde, o complexo IV; e em roxo, o complexo V. Com exceção do complexo II, todos os outros transportam prótons através da membrana interna. O gradiente de próton é usado pela ATP sintetase (complexo V) para produzir ATP. Os prótons do NADH entram na cadeia de elétrons pelo complexo I e os elétrons do FAD pelo complexo II.

Fonte: extraído de Saraste¹⁷.

Figura 2 - A fosforilação oxidativa

1.4. Lesão de isquemia e reperfusão

A lesão de isquemia e reperfusão (LIR) acontece quando o fluxo sanguíneo é restabelecido para um tecido isquêmico, podendo resultar em morte celular e de tecidos. Esse fenômeno é frequente em situações como isquemia miocárdica, acidente vascular cerebral, choque, trauma, hemorragia, cirurgia e transplante. É preocupação constante no transplante, em que inevitavelmente ocorre

interrupção temporária do fluxo sanguíneo para o órgão e revascularização. Durante a fase de isquemia, o metabolismo aeróbico diminui devido a pouca disponibilidade de oxigênio. E com a repercussão ocorre lesão celular oxidativa, que é caracterizada pela geração de excesso de radicais livres¹⁸.

A LIR, apesar de ser estéril, tem um componente imunológico marcante. Macrófagos e neutrófilos são recrutados para o sítio de isquemia, onde mediadores inflamatórios como as citocinas se acumulam. A atração das células inflamatórias para a área de lesão levou à descoberta de muitas moléculas endógenas que estimulam receptores pró-inflamatórios no leucócito e macrófago. Com a ruptura da mitocôndria e da membrana plasmática, os constituintes da célula são expostos e podem estimular uma série de receptores nas células vizinhas, entre elas os leucócitos e macrófagos^{18,19}. Estão envolvidos na resposta inflamatória estéril da LIR os mesmos receptores da resposta inflamatória originalmente atribuída aos microrganismos, os receptores de reconhecimento de padrões (PRR).

Vários mediadores de recrutamento de leucócitos em sítios de inflamação aguda já foram bem estabelecidos, como as quimiocinas homólogas ao CXCL8 humano (CXCL) CXCL1 e CXCL2 homólogos murinhos da CXCL8 humana²⁰, o fator de complemento C5a, leucotrieno B4 e peptídeos formilados (f-MLP)²¹.

A LIR é iniciada pela liberação de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS), que são gerados pelos hepatócitos durante a fase inicial de isquemia. Embora as ROS sejam consideradas parte da fisiologia normal das células por ativarem várias vias metabólicas em situações de hipóxia e isquemia, desempenhando papel protetor, elas também podem desencadear a resposta imune estéril que irá resultar no recrutamento de neutrófilos e lesão autofágica do fígado, com apoptose e necrose do tecido hepático²².

Um grande desafio para o aumento do número de doadores é a LIR, que constitui importante causa de morbidade e mortalidade nas grandes ressecções hepáticas e no transplante de fígado²³. O dano hepatocelular que envolve a retirada do fígado, conservação e a revascularização é crítico para o não funcionamento primário do órgão, disfunção tardia e alta incidência de rejeição crônica e aguda²⁴. Embora os mecanismos fisiopatológicos da LIR tenham sido largamente pesquisados, muitos continuam, até o momento, incompreendidos. O completo entendimento dos mecanismos da LIR e o desenvolvimento de estratégias para a sua redução são fundamentais para a redução das complicações das ressecções hepáticas e do transplante, podendo, de forma segura e confiável, expandir o *pool* de doadores²⁴.

1.4.1. Tipos e fase da lesão de isquemia e reperfusão

A isquemia pode ser definida segundo a sua extensão e se foi devida à oclusão total, parcial ou de pequenas áreas. As lesões de reperfusão acontecem com o restabelecimento do fluxo sanguíneo após o período de privação de sangue. As alterações patológicas da reperfusão estão relacionadas ao tempo e à extensão do evento isquêmico. A isquemia pode ser quente ou fria. A isquemia quente acontece na temperatura do corpo, em torno de 37°C, enquanto a isquemia fria ocorre entre 4°C e 7°C. Clinicamente, a isquemia quente ocorre na isquemia miocárdica, trauma e cirurgia, enquanto a isquemia fria ocorre no transplante.

Muito importantes são a temperatura alcançada no órgão e a duração da isquemia. A isquemia quente é mais lesiva às células e ao metabolismo, enquanto a isquemia fria protege a célula, por diminuir o metabolismo celular e a demanda de

ATP. A isquemia fria é usada na preservação de órgãos para transplante e em muitas cirurgias, como a cirurgia neurológica, trauma e ressecções hepáticas.

As ROS aumentam tanto em órgãos submetidos à isquemia fria quanto à quente, mas são consideravelmente maiores na isquemia quente²⁵. A relação nicotinamida adenina dinucleotideo mais um átomo de hidrogênio e dois elétrons reduzida/ nicotinamida adenina dinucleotideo (NADH/ NAD) declina paralelamente ao aumento da geração de ROS, devido à reação da flavina reduzida com complexo I e oxigênio para gerar superóxido de oxigênio durante a reperfusão.

Existem evidências de que o radical peróxido de hidrogênio e radical hidroxila podem contribuir para a lesão tecidual após isquemia fria

1.4.2. Mitocôndria, o maior gerador de ROS na IR

Cada célula hepática contém entre 1.000 e 2.000 mitocôndrias, que correspondem a aproximadamente 20% do seu volume total. Por essa razão, muitos estudos da função mitocondrial são feitos com mitocôndrias purificadas do fígado.

Como consequência de o oxigênio ter grande afinidade por elétrons, expressiva quantidade de energia livre é liberada quando ele é reduzido para formar água. A respiração celular, reação pela qual o oxigênio é convertido em água, permitiu aos organismos vivos processar muito mais energia do que seria possível com a respiração anaeróbica, sendo essa a razão pela qual os organismos vivos superiores respiram. A reação do oxigênio com hidrogênio libera grande quantidade de energia de forma explosiva. Podemos tolerar o oxigênio do ar que respiramos porque sua reação para formar água é rigorosamente controlada por catálises enzimáticas. Uma vez que uma molécula de oxigênio tenha ganhado um elétron para formar um radical superóxido (O_2^-), ela se torna perigosamente reativa e irá

recolher outros três elétrons adicionais em qualquer lugar onde possa encontrá-los. A célula só pode usar o oxigênio porque ela desenvolveu mecanismos altamente eficientes para controlar a reação. A citocromo oxidase contém o oxigênio em um centro biometálico especial, onde ele permanece preso entre um átomo de ferro ligado a um grupamento heme e um átomo de cobre até que tenha captado o total de quatro elétrons. Somente então os dois átomos de oxigênio podem ser liberados na forma de duas moléculas de água¹⁷.

Ligados à membrana interna da mitocôndria existem os complexos enzimáticos transportadores de elétron na rota do hidrogênio para o oxigênio. Os elétrons provenientes da NADH entram na cadeia de transporte de elétrons pelo complexo I. Os elétrons são transferidos inicialmente para um mononucleotídeo de flavina e, então, por meio de um carregador de ferro-enxofre, para a coenzima Q, também chamada ubiquinona, uma pequena molécula lipossolúvel que carrega o elétron para o complexo III. No complexo III, os elétrons são transferidos do citocromo *b* para o citocromo *c* e este transporta o elétron para o complexo IV e, finalmente, o elétron encontra o oxigênio. O elétron da FADH entra na cadeia pelo complexo II que o transfere para a ubiquinona. Nessas etapas, a energia resultante da passagem do elétron é usada na síntese de ATP pelo complexo V (ATP-sintetase), que acopla o fluxo retrógrado de prótons à síntese de ATP.

As mitocôndrias realizam vários processos metabólicos importantes, como a síntese de proteínas, neoglicogênese, degradação e eliminação de drogas, e possui várias vias metabólicas e alto consumo de oxigênio. Fornece, ainda, energia para toda a célula na forma de ATP. Sob condições normais, como resultado do intenso metabolismo das células hepáticas, são produzidas ROS. Os hepatócitos toleram níveis basais de ROS, no entanto, durante a fase de

injúriareperfusão são produzidos em excesso, levando a estresse oxidativo e à lesão e morte celular^{26,27}.

O mecanismo de produção de ROS durante a isquemia reperfusão (IR) é variável e dividido em fase isquêmica e de reperfusão. Durante a fase de isquemia, a hipóxia celular estimula a produção de ROS pelo complexo III da cadeia de transporte mitocondrial de elétrons (complexo citocromo oxidase)²⁸.

Durante a fase de reperfusão, o oxigênio rapidamente chega às células que se desviaram para o metabolismo anaeróbico secundário à isquemia. A fosforilação oxidativa é interrompida e resulta no acúmulo de carreadores moleculares de elétron reduzido. Quando a concentração de oxigênio retorna ao normal com a reperfusão, as ROS elevam-se abruptamente, resultado da doação de elétron dos carreadores moleculares para o oxigênio^{14,23}.

A mitocôndria é a principal fonte de produção de ROS em condições normais e também na injúria e reperfusão¹⁷. A mitocôndria produz superóxido, que é rapidamente convertido em peróxido de hidrogênio pela enzima mitocondrial superóxido dismutase. Também produz excessiva quantidade de superóxido na relação alta entre NADH e NAD⁺, assim como na CoQH₂/CoQ associada a grande gradiente de próton²⁹⁻³¹. A geração de ROS na fase de isquemia é atualmente atribuída a três vias. Na primeira, as ROS geradas na membrana mitocondrial interna podem ser liberadas para o espaço intermembrana ou para a matriz. A razão da liberação é determinada pela concentração de oxigênio da membrana interna e é possível que a baixa concentração de oxigênio da membrana favoreça a liberação para o citoplasma. Na segunda via, a hipóxia causa alteração conformacional do complexo III, que torna mais lento o processo de remoção do elétron da ubisemiquinona (ubiquinona reduzida). E o aumento da meia-vida da ubisemiquinona aumenta a probabilidade de transferir elétron para o oxigênio.

Finalmente, a baixa de oxigênio na membrana interna causa alteração conformacional no complexo III, que o deixa mais acessível ao oxigênio²⁸. Além das ROS produzidas pelas mitocôndrias, existe também produção extramitocondrial. A xantina oxidase tem sido foco de atenção devido ao efeito protetor do alupurinol, seu inibidor. Devido à pequena quantidade de substrato da enzima, a quantidade de ROS produzidas por essa via não é significativa³²⁻³⁴.

A geração de ROS mediadas por receptor tipo-*toll* (TLR-4) é importante na estimulação de resposta imune pelos hepatócitos, mas o exato mecanismo pelo qual o TLR-4 causa aumento de ROS permanece obscuro.

Torna-se evidente que ROS são produzidas durante o período de isquemia e isquemia reperfusão e desempenha importante papel na lesão das células. A função mitocondrial não é limitada pela privação de oxigênio até nível próximo da anóxia.

1.4.3. ROS hepatocelular desencadeia a inflamação estéril

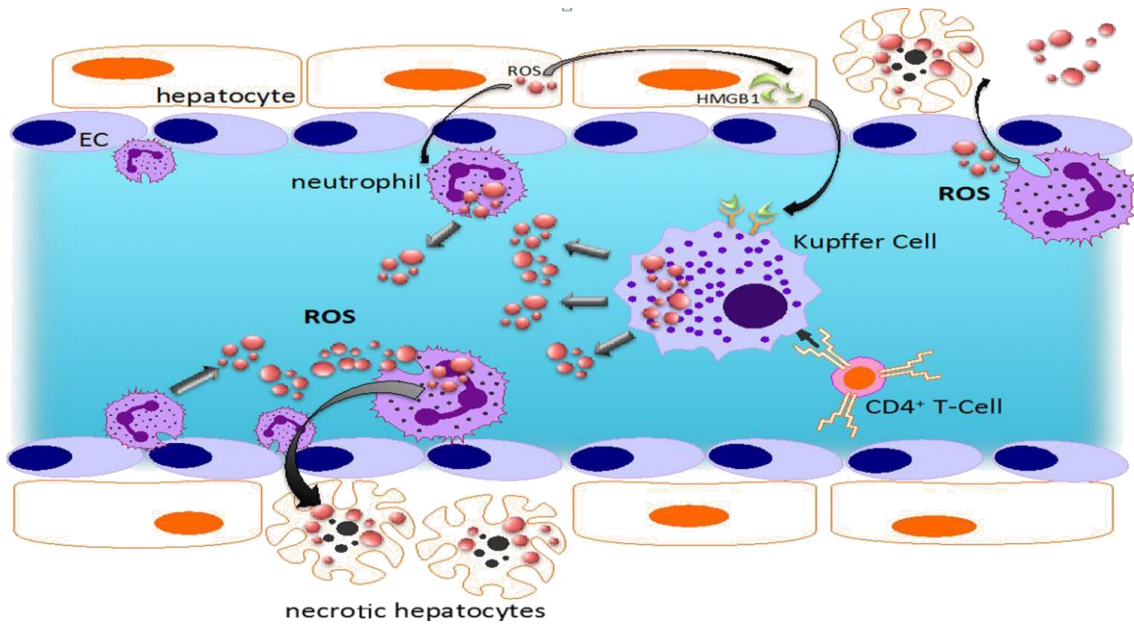
À parte seu papel na autofagia do fígado na IR, as ROS sinalizam para processos defensivos nas lesões de isquemia do fígado. Impede a enzima proil-hidroxilase de degradar o fator 1 hipóxia induzido (HIF-1), mantendo, assim, o papel protetor mediado pelo HIF-1^{35,36}. O HIF-1 regula a expressão de vários genes envolvidos na sobrevivência de hepatócitos, angiogênese e remodelamento á várias evidências da ativação do HIF-1 precocemente durante a celular³⁷⁻³⁹ isquemia, sugerindo que a estabilização da resposta pró-vida do HIF-1 é importante na resposta precoce à isquemia^{22,35}.

Com a reperfusão, no entanto, as ROS de origem hepatocelular desencadeiam a ativação de resposta celular imune estéril localizada, com graves consequências para o equilíbrio celular. O estresse oxidativo provocado por esses radicais livres provoca a liberação pelo hepatócito de *high-mobility group box* (HMGB1)⁴⁰. O HMGB1 atua como uma citocina pró-inflamatória e é detectável no plasma precocemente (uma hora após reperfusão)^{41,42}.

Além da sinalização de padrão molecular associado a dano (DAMPs), as ROS, a partir da ativação do fator nuclear $\kappa\beta$, estimulam o sistema imune local durante a reperfusão⁴³. O NF $\kappa\beta$ presente nos hepatócitos estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucinas - IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-8 -, fator de necrose tumoral (TNF)- α e TNF- β ⁴⁴. A resposta imune estéril é a maior causa de toxicidade e de morte das células hepáticas na isquemia reperfusão quando os estímulos de ROS são mantidos^{45,46}.

As células de Kupffer (CK) são ativadas por HMGB1 e são fonte celular inicial de ROS na fase precoce da LIR no fígado (FIG. 5)⁴⁷.

O papel central das células de Kupffer na produção de ROS é demonstrado pelo fato de a inativação das células de Kupffer atenuar o estresse Oxidativo^{34,48}. As LIRs tendem a ocorrer em regiões ricas em CK. O bloqueio de CK não abole a resposta, evidenciando a ação de outras células, como o CD4+ T. A ativação de CK no leito vascular leva à liberação adicional de citocinas pró-inflamatórias, como as CXCL10, CXCL2 e CXCL8. Todas ativam monócitos, linfócitos e outras células fagocitárias, principalmente os neutrófilos. Enquanto as CKs são as maiores fontes de ROS no leito vascular, durante os estágios iniciais da LIR os neutrófilos são a principal fonte nos sítios de lesão nos estágios tardios^{47,49}.



Precocemente na isquemia os hepatócitos iniciam produção de pequenas quantidades de ROS, que atraem neutrófilos para o sítio de isquemia. ROS de origem no hepatócito estimulam a liberação de HMGB1, que ativa células de Kupffer, e linfócito T CD4⁺. Células de Kupffer e neutrófilos ativados produzem níveis tóxicos de ROS, como peróxido de hidrogênio e ácido hiperclórico, que vão induzir a necrose do hepatócito (EC: endotélio sinusoidal; ROS: *reactive oxigem species*; HMGB1: *high mobile group box 1*).

Fonte: extraído de Quesnelle *et al*²²

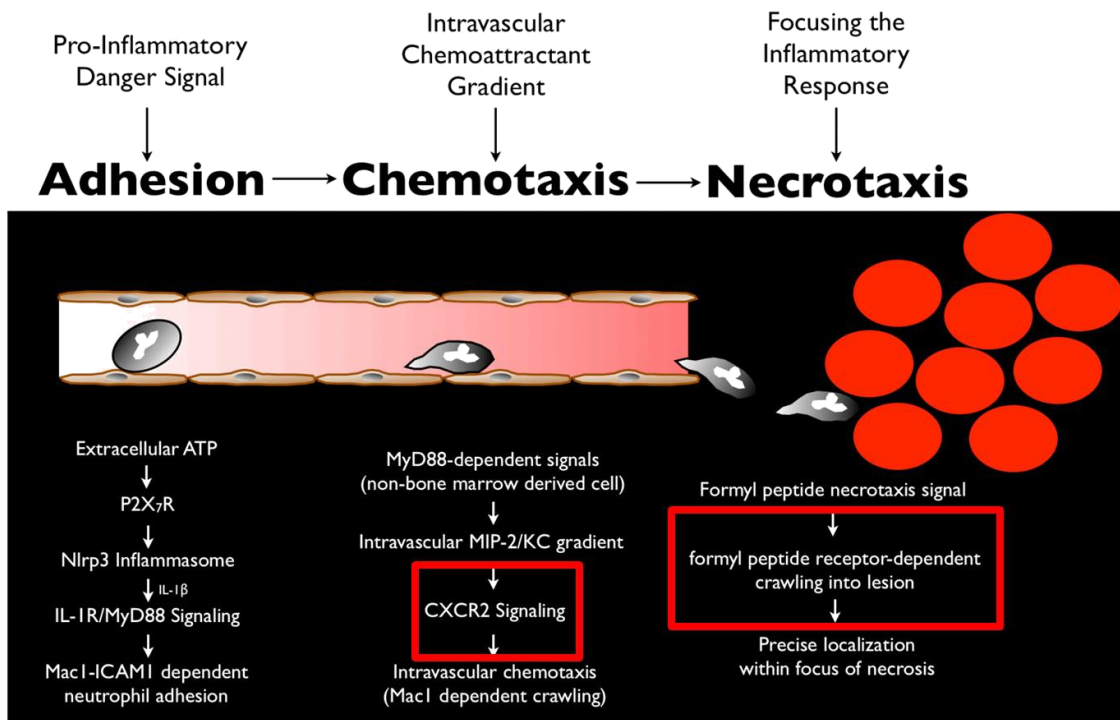
Figura 3 - A necrose de hepatócitos na LIR

1.4.4. Os neutrófilos: efetores da resposta inflamatória

Os neutrófilos migram para o fígado nas infecções, nas lesões inflamatórias, como na LIR, atraídos por um gradiente de quimiocinas. E são as primeiras células a chegar ao fígado e o fazem em grande número^{50,51}. Várias moléculas são capazes de atrair os neutrófilos, como as quimiocinas CXCL1 e CXCL2 (homólogas murinas da CXCL8 humana), o fator de complemento C5a e leucotrieno B4^{20,21}. Ao entrarem no fígado pelos sinusoides, os neutrófilos são atraídos pelo gradiente de quimiocinas CXCL1 e CXCL2, o qual é reconhecido pelo receptor de quimiocinas 2 (CXCR2) expresso constitucionalmente em neutrófilos. Mas ao atingirem a borda da necrose hepática, eles passam a usar o receptor FPR1, que, é ativado por peptídeos formilados, oriundos de mitocôndrias

dos hepatócitos, que promove a migração de neutrófilos para o interior da zona de necrose (FIG. 4)²². No sítio-alvo podem executar as suas funções, como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), desgranulação (liberação de peptídeos e enzimas granulares) ou formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NET).

Os neutrófilos amplificam a lesão tecidual na lesão de isquemia e reperfusão e está também presente em várias outras doenças inflamatórias como gota, artrite, doença de Crohn e infarto agudo do miocárdio.



Neutr3filos adentram o f3gado e interagem com o endot3lio sinusoidal j3 estimulado pela libera3o local de mediadores pr3-inflamat3rios. A quimiotaxia de neutr3filos procede com o reconhecimento pelo receptor CXCR2 de um gradiente intravascular de quimiocinas. Na periferia da zona necr3tica, neutr3filos passam a priorizar a sinaliza3o pelo receptor FPR1, que 3 ativado por pept3deos formilados mitocondriais liberados pelos hepat3citos mortos. Estes, por sua vez, encaminham os neutr3filos para o interior da necrose.

Fonte: extra3do de McDonald *et al*⁴⁶

Figura 4 - Mediadores e receptores envolvidos no recrutamento de neutr3filos para a les3o hep3tica est3ril

1.4.5. Mecanismo da morte celular na LIR

3 necess3rio um destino para as c3lulas que est3o morrendo, a fim de evitar que elas liberem o seu conte3do, que poder3 ocasionar inflama3o e at3 mesmo a morte de outras c3lulas na vizinhan3a ou 3 dist3ncia. Processo ineficiente de limpeza das c3lulas que est3o morrendo pode suscitar forte resposta imunol3gica⁵².

O mecanismo de clareamento das c3lulas apopt3ticas pelos fag3citos 3 um processo bem preservado na evolu3o. C3lulas de mam3feros e nemat3ides

expressam na superfície um sinal (*eat-me*) por meio da fosfatidina serina, que desencadeia o reconhecimento pelos fagócitos das células que estão morrendo.

Esse processo dá origem à limpeza silenciosa das células apoptóticas que não é inflamatório^{53,54}.

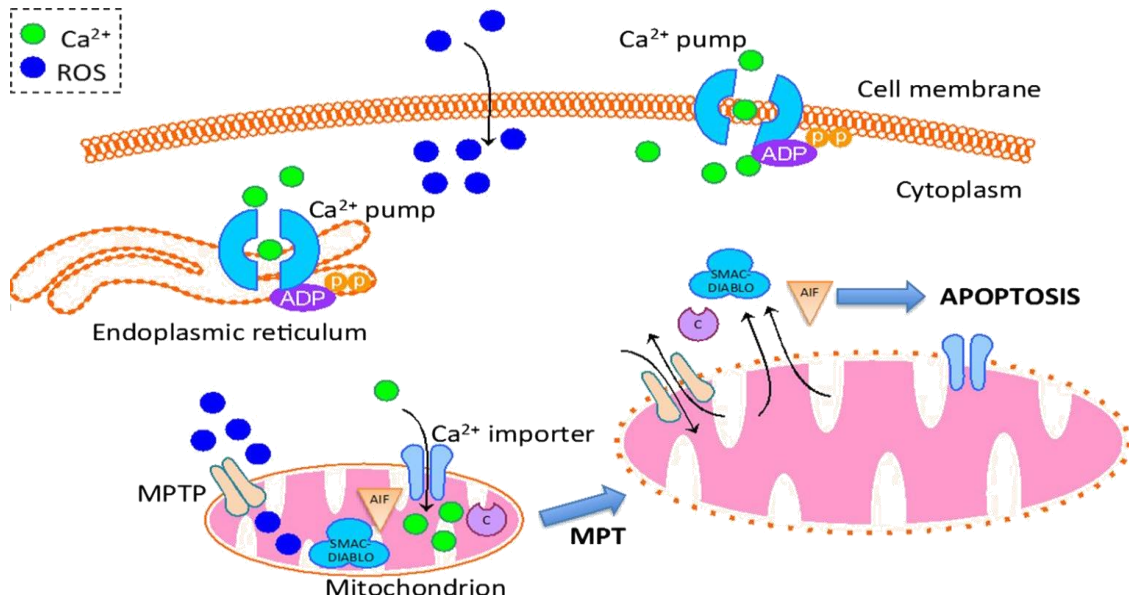
Recentemente, tem sido descrita outra forma de morte celular, a necrose⁵⁵. Necrose celular é tipicamente iniciada por receptores, tais como receptor da membrana plasmática (Fas) ou receptor do TNF, levando à ativação do *receptor-interacting-protein-kinase* 1 e 3 ou receptor que interage com a proteino-quinase 1 (Rip1 e Rip3)^{13,56,57}. Apesar de serem conhecidos os receptores e as vias para iniciar a necrose, o subsequente destino dos restos celulares ainda não está claramente definido. A necrose pode resultar em processo silencioso de homeostase ou pode provocar forte reação imunológica, que usualmente está acoplada à liberação de sinais de alarme da célula que está morrendo ou já morreu.

Análise morfológica da LIR sugere que a apoptose é responsável por pequena quantidade de morte celular, aproximadamente 2%⁵⁸. A necrose hepatocelular é caracterizada pela alteração da permeabilidade dos poros da membrana mitocondrial interna (*mitochondrial permeability transition pore* – poro mitocondrial de permeabilidade transicional - MPTP). A permeabilidade mitocondrial (MPT) é iniciada pela ROS peróxido de hidrogênio, o qual é rapidamente convertido ao radical hidroxyl via reação de Fenton. E este radical subsequentemente inicia MPT. Quando a MPT ocorre, os canais dos poros mitocondriais de membrana se abrem, permitindo refluxo iônico que leva a desacoplamento mitocondrial, perda de ATP e perda do potencial de membrana.

A MPT é um evento fatal para a célula e altamente sensível. A abertura de reduzido número de poros pode desestabilizar a mitocôndria, levando rapidamente à morte celular. A MPT pode ser iniciada pela captação de cálcio ou ferro lisossomal em adição à ROS^{40,59}.

Outro mecanismo de morte celular ocorre pelo aumento do nível do cálcio intracelular que pode levar a apoptose e necrose. Em condições normais, a bomba de fluxo transmembrana, *antiporter*, a bomba do retículo endoplasmático e a bomba mitocondrial mantêm rigorosamente os níveis de cálcio. Todas essas bombas, com exceção da Ca^{2+} - Na^{+} *antiporter*, são ATP dependentes e apresentam reduzida atividade em condições isquêmicas (FIG. 5)⁶⁰.

O aumento do nível de cálcio no interior da célula pode ativar a quinase C, atuando conjuntamente com a calcineurina e indiretamente ativando $\text{NF}\kappa\beta$, sinalizando geração sustentada de ROS.



A depleção de ATP durante a isquemia e a produção de ROS leva ao aumento hepatocelular de cálcio. Aumento de cálcio e ROS leva à abertura da MPTP. Uma vez aberto o MPTP, verifica-se a ruptura da mitocôndria e os seus constituintes são liberados para o citoplasma. MPTP: *mitochondrial permeability transition pore*; MPT: *mitochondrial permeability transition*, c: citocromo; AIF: fator indutor de apoptose.
 Fonte: extraído de Quesnelle *et al*²²

Figura 5 - - MPT induz morte de hepatócitos

1.5. A inflamação: história e fisiopatologia

A inflamação é uma resposta protetora para remover o estímulo nocivo e também para a reparação do tecido lesado. A inflamação é usualmente causada por vários fatores como a infecção microbiana e viral e por fatores não microbianos, como: trauma, lesão de isquemia e reperfusão como no infarto do miocárdio e o transplante e de doenças autoimunes. Classicamente, a infecção é caracterizada por cinco sinais e sintomas clássicos: vermelhidão, edema, calor, dor e perda de função. Essas manifestações clínicas refletem o aumento da permeabilidade do endotélio vascular, permitindo a saída de componentes do plasma e células do sistema imunológico do capilar para a área de inflamação de componentes. A resposta inflamatória é rapidamente terminada e o tecido lesado é reparado. No entanto, a

produção exagerada de citocinas (tempestade de citocinas) pode trazer desequilíbrio à homeostase. A tempestade de citocinas pode também ser causada por doenças não infecciosas como a LIR de órgãos transplantados e doenças autoimunes.

O sistema imune inato é o principal agente da inflamação induzida por infecção microbiana ou lesão tecidual. E, também, é importante para ativação da imunidade adquirida. Embora as células do sistema imunológico como os macrófagos e células dendríticas desempenhem importante papel, outras células também participam da inflamação, como os fibroblastos, células epiteliais e endoteliais. As células reconhecem os microrganismos a partir de receptores como os PRRs. Os receptores reconhecem as bactérias por meio de padrões estruturais. Elas são conservadas entre as espécies de microrganismos e são denominadas padrão molecular associado a patógeno (PAMPS) - sigla em inglês para *Pathogen-associated molecular patterns*.

Evidências recentes indicam que PRRs também reconhecem moléculas endógenas liberadas por células sob estresse ou lesadas. Essas moléculas são denominadas DAMPs. Atualmente, são conhecidas as seguintes classes de receptores PRRs: os do tipo *Toll* (TLR), do tipo NOD (NLR), do tipo RIG-I (RLR), receptores de lecitina tipo C (CLR) e receptores tipo ausente em melanoma 2 (AIM2)⁶¹. Esses receptores são encontrados em macrófagos ou células dendríticas, além de várias outras não diretamente relacionadas à imunidade.

Com exceção de alguns receptores NLRs, o estímulo causado pelo respectivo DAMPS ou PAMPS resulta em ativação de genes envolvidos na resposta inflamatória. Esses genes codificam citocinas pró-inflamatórias, interferon (IFN) quimiocinas, proteínas antimicrobianas, proteínas envolvidas na modulação da

sinalização pelos receptores (PRRs) e muitas outras proteínas. O padrão de indução dos genes varia entre os PRRs ativados.

A família TLR é a mais bem caracterizada e é responsável pela vigilância de microrganismos intracelulares e extracelulares

O conceito de síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) foi proposto em 1992 no Consenso do *American College of Chest Physicians* com o intuito de definir mais precisamente a síndrome de inflamação que surgia seguindo infecção, trauma ou estados de choque e que levava à falência de múltiplos órgãos (MOF)⁶². Em alguns pacientes pode evoluir para a síndrome de persistente inflamação, imunossupressão, e catabolismo (PICS) e, frequentemente, morte^{62,63}.

Por muito tempo aceitou-se que a MOF e morte no paciente com sepse seria consequência da resposta a produtos e moléculas dos microrganismos, tais como PAMPs. E foi somente no final dos anos 1980 que foi admitida a hipótese de que a SIRS e a MOF poderiam ocorrer na ausência de uma fonte óbvia de infecção. A translocação bacteriana do intestino foi implicada (na época) na origem da sepse sem um foco evidente de infecção.

Foi somente no início do milênio que, Polly Matzinger propôs a “*danger hypothesis*”, segundo a qual a resposta imune nativa não estaria focada em “*self* e não *self*” e sim em sinais de alarmes endógenos, as alarminas⁴⁴. Mais recentemente foi demonstrado que o tecido lesionado por trauma libera moléculas mitocondriais, inclusive DNA (DNA mitocondrial - mtDNA) e peptídeos formilados, que levam à ativação do sistema imune e a quadro semelhante à sepse⁴². Demonstraram também que o mtDNA estava significativamente mais elevado no paciente mais grave comparado ao controle.

Marques *et al.* evidenciaram que a ativação de neutrófilos por constituintes mitocondriais (peptídeos formilados e mtDNA) amplificam a lesão hepática em modelo de hepatite tóxica induzida por acetaminofeno, em camundongos⁵⁰.

Muitas complicações do transplante hepático são consequência da reação inflamatória sistêmica iniciada pelo estresse oxidativo da LIR e depois ampliada pela liberação de estruturas moleculares (DAMPS) pelos hepatócitos e células fagocitárias, ativação do sistema imune com liberação de citocinas, atração de neutrófilos e células fagocitárias para o sítio da lesão e ampliação da resposta inflamatória para todo o organismo. A manifestação principal da LIR é a não função primária do enxerto ou a disfunção precoce do enxerto acompanhada frequentemente de disfunção de outros órgãos como a insuficiência renal aguda (IRA), a síndrome do desconforto respiratório agudo, o choque circulatório, distúrbio de coagulação e hemorragia digestiva. Pacientes com disfunção precoce do enxerto apresentam mortalidade elevada em seis meses (18,8%)⁶⁴.

Vários ensaios clínicos usando biomarcadores falharam em identificar em pacientes com sepse aqueles com perfil inflamatório com pior prognóstico e que pudessem guiar a conduta clínica e a terapêutica¹¹. Dosagem de citocinas, principalmente a IL-6 e procalcitonina, tem sido usada para esse fim, com resultados variáveis⁶⁵. Vários marcadores além das citocinas, como os marcadores endógenos, são promissores, mas falta mais experiência. O HMGB1, um sinalizador de alarme de origem nuclear, ganhou interesse como biomarcador após ter sido demonstrado por Gibot *et al.* que seu nível no plasma aumenta precocemente após trauma, correlaciona-se com a gravidade da lesão e os sobreviventes têm significativamente

menor nível plasmático⁶⁶. Cohen demonstrou que o HMGB1 aumenta precocemente no trauma e correlaciona-se com a gravidade do trauma¹⁹.

Em nosso meio, Andrade relatou a correlação entre os níveis de HMGB1 e a evolução no transplante⁶⁷.

As mitocôndrias são importantes fontes potenciais de DAMPs, principalmente se se considerar que sua origem remonta a uma proteobactéria putativa e o seu DNA é 50 vezes mais sensível ao estresse oxidativo do que o DNA nuclear²².

Levando-se em consideração que o estresse oxidativo é o componente fisiopatológico chave do trauma e injúria e que o DNA da mitocôndria é muito mais sensível que o DNA nuclear, é relevante pensar que os derivados mitocondriais estejam elevados nessas condições e que possam ser de utilidade como marcadores de gravidade da inflamação^{68,69}.

Incluídos na lista de DAMPS de origem mitocondrial estão os peptídeos formilados, proteína ligante do mtDNA, fator A transcricional regulador da mitocôndria (TFAM) e mtDNA e, mais recentemente, a própria mitocôndria^{53,70-72}.

2. OBJETIVOS

Dosar constituintes mitocondriais circulantes (DNA-NADH, DNA citocromo C oxidase e DNA citocromo C oxidase) no perioperatório de pacientes submetidos a transplante hepático e correlacioná-los com as aminotransferases: alaninoaminotransferase (ALT) e aspartatoaminotransferase (AST) e com o tempo de isquemia.

3. MÉTODO

Trata-se de estudo prospectivo realizado no Instituto Alfa de Gastroenterologia (IAG) do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Foram estudados 47 pacientes com idade igual ou superior a 18 anos submetidos ao transplante hepático (TH) com doador cadáver, no período entre setembro de 2008 e dezembro de 2011.

A avaliação pré-operatória foi realizada no Ambulatório Bias Fortes, do HC- UFMG, de acordo com o protocolo específico da instituição (ANEXO A). Nesse momento era oferecido o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) aos pacientes elegíveis para a pesquisa. A técnica anestésica e cirúrgica foi padronizada para todos os pacientes e o TH realizado por única equipe, de acordo com o protocolo da instituição (ANEXOS B, C e G). O esquema de imunossupressão utilizado foi o mesmo para todos os pacientes (ANEXO D).

Esta pesquisa faz parte de projeto que avalia a resposta inflamatória em pacientes submetidos ao TH, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Parecer nº - 0244.0.203.000-08 – ANEXO E) e contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) – ANEXO F.

3.1. Critérios de inclusão

- a) Idade igual ou superior a 18 anos.
- b) Realização de TH com doador cadáver.
- c) Assinatura no TCLE.

3.2. Critérios de exclusão

- d) Retransplante ou hepatectomia prévia.
- e) Instabilidade hemodinâmica pré-operatória - necessidade de infusão de aminas vasopressoras para manutenção de pressão arterial média (PAM) > 60mmHg.
- f) Insuficiência hepática aguda.
- g) Necessidade de realização de hemodiálise na semana que antecedeu o TH.
- h) Outra operação realizada concomitantemente ao TH.
- i) Transplante intervivos.
- g) Trombose da veia porta sem possibilidade de recanalização.

3.3. Coleta dos dados clínicos/demográficos dos pacientes

Os dados clínicos dos pacientes foram colhidos e registrados em banco de dados informatizado. Os parâmetros coletados foram:

3.4. Coleta das amostras de sangue

As amostras de 4mL de sangue foram colhidas em dois momentos do perioperatório: período imediatamente antes da clampagem da veia porta (T1) e no pós-operatório, oito horas após a reperfusão do enxerto (T2). A amostra T1 foi colhida da veia porta, por meio de punção direta pelo cirurgião do transplante durante a cirurgia, imediatamente antes da clampagem da mesma e a amostra T2 foi colhida a partir de acesso periférico.

Todas as amostras foram identificadas, armazenadas em tubo estéril contendo heparina (Becton & Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) e centrifugadas a 3.000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos a 4°C.

A seguir, o plasma foi separado, aliquotado e armazenado a - 80°C para análises posteriores.

3.5. Análise das amostras de sangue

3.5.1. Quantificação de DNA mitocondrial circulante por *real-time* PCR

Todas as amostras foram analisadas na mesma data, em temperatura ambiente. Foi realizada no Laboratório de Interação Microrganismo-Hospedeiro do Departamento de Microbiologia localizado no Instituto de Ciências Biológicas (UFMG). O DNA mitocondrial presente no soro de pacientes foi quantificado conforme previamente descrito por Zhang *et al.*⁴².

Resumidamente, o mtDNA foi extraído do soro de pacientes utilizando o *kit* QIAamp DNA *Mini and Blood Mini kit* (Qiagen®). A extração de mtDNA foi realizada em condições estéreis e a quantificação foi estimada por reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real. Foram utilizados *primers* humanos para citocromo B (*forward*-59 - ATGACCCCAATACGCAAAT-39 e *reverse* 59 - CGAAGTTTCATCATGCGGAG - 39), citocromo C oxidase subunidade III (*forward* - 59 ATGACCCACCAATCACATGC - 39 e *reverse* 59 - ATCACATGGCTAGGCCGGAG - 39) e NADH desidrogenase (*forward* 59 - ATACCCATGGCCAACCTCCT - 39 e *reverse* 59 - GGGCCTTTGCGTAGTTGTAT - 39), que foram sintetizados pela Invitrogen®.

Foram elaboradas curvas-padrão de DNA em rtPCR para quantificar mtDNA, utilizando concentrações mtDNA purificadas e citocromo B como alvos. Os exames foram realizados pela doutoranda em Fisiologia e Farmacologia, Raquel Duque do Nascimento Arifa, no Laboratório de Interação Microrganismo - hospedeiro, Universidade Federal de Minas Gerais.

3.5.2. Dosagens de ALT e AST

As dosagens de ALT e AST foram feitas no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da UFMG (Laboratório Central). Foi empregada a técnica de química seca, cinética de múltiplos pontos do sistema Vitros[®] fornecido pelo laboratório *Orthoclinical Diagnosis*[®].

3.6. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad PRISM (versão 5.0). A normalidade dos dados foi testada pelo método de Kolmogorov-Smirnov. A comparação entre os dados foi feita utilizando-se o teste “t” de Student para as variáveis contínuas que apresentaram distribuição normal. Para verificar a correlação entre níveis de mtDNA e aumento de AST e ALT e tempo de isquemia, foi escolhido o coeficiente de correlação de Spearman. Para a interpretação da magnitude das correlações foi adotada a seguinte classificação dos coeficientes de correlação: coeficientes de correlação < 0,4 (correlação de fraca magnitude), ≥ 0,4 a < 0,5 (de moderada magnitude) e ≥ 0,5 (de forte magnitude)⁶³. Foram consideradas diferenças estatísticas valores de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

A idade dos pacientes transplantados variou de 22 a 71 anos, mediana de 53 anos e 11 meses, media de $53,09 \pm 11,17$ anos. Sessenta e seis por cento eram homens. As soluções de preservação utilizadas foram: Custidiol® (63,6%), Viaspan® (34,1%) e Celsior® (2,3%).

O tempo de isquemia variou de 254 a 791 minutos, mediana de 492 minutos e media $515,10 \pm 146,6$ minutos. O nível sérico de AST variou de 114 a 21.012U/L, mediana de 1042U/L media de 2018 ± 3729 U/L. O nível sérico de ALT variou de 82 a 6.864, mediana de 527,0 U/L média de $989,1 \pm 1.411$ U/L.

As indicações ao transplante foram: cirrose etanólica (31,1%), doenças parenquimatosas (31,1%), cirrose viral (24,4%), cirrose por doença autoimune (4,4%) e doença das vias biliares (8,9%).

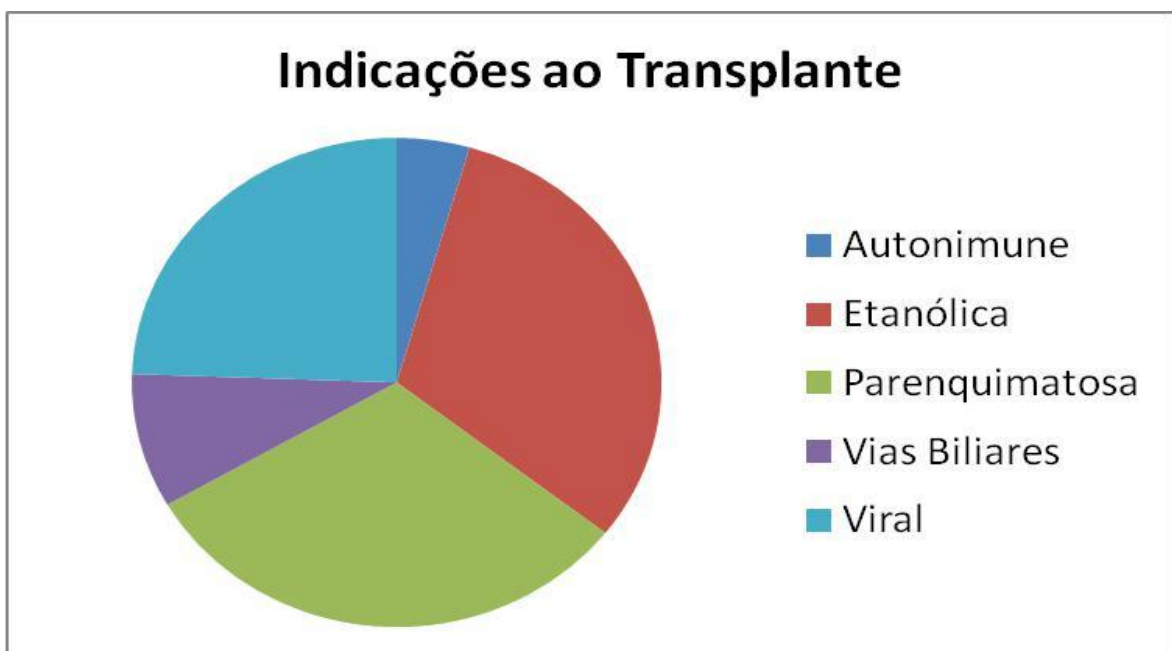


Gráfico 1 - Indicações de transplante hepático.

Verificou-se aumento significativo dos mtDNAs após oito horas de reperfusão, com os seguintes valores de p: NADH *dehydrogenase* 0,0251; citocromo B 0,0251; e citocromo C oxidase 0,0067 (Tabela 2).

Tabela 1 - Variação da concentração plasmática de DNA mitocondrial.

Varichond	T1	T2	p
NADH (n = 46)	83 ± 81	141 = 46)	0,0267
Citocromo B (n = 44)	469 = 44)	738 = 44)	0,0251
Citocromo C (n = 47)	116 = 47)	223 = 47)	0,0067

T1 (imediatamente antes da clampagem porta); T2 (8 horas após a reperfusão).

Teste T de student. Valor de significância $p < 0,05$.

Para os GRÁF. 2, 3 e 4 as amostras de sangue foram coletadas no tempo imediatamente antes da clampagem da veia porta e oito horas após a reperfusão e foram dosados os DNAs (em ng/μL) de origem mitocondrial: NADH *dehydrogenase*, citocromo B e citocromo C oxidase.

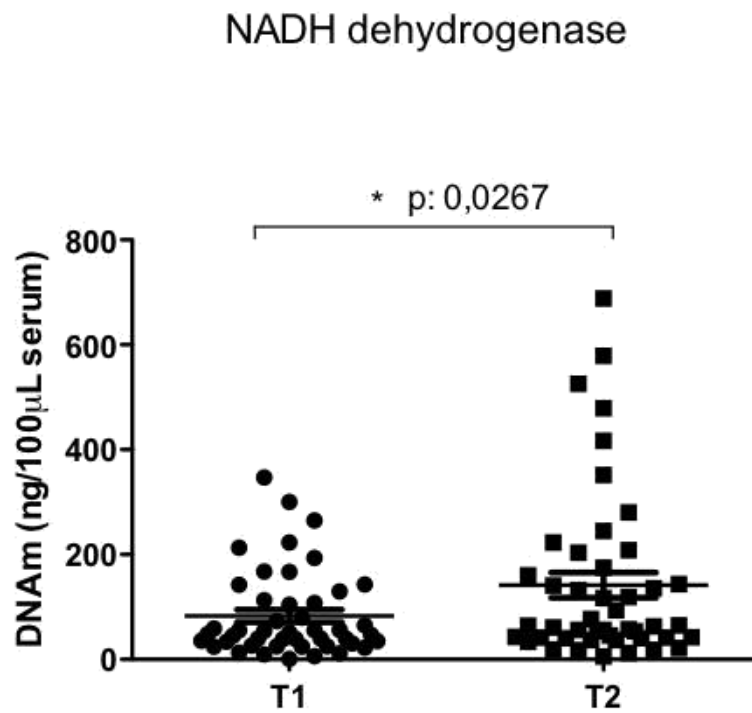


Gráfico 2 - Comparação do valor de NADH entre T1 e T2 (n=46).

Teste t Student. Valores de NADH-DNA: T1 = 83 ± 81 ; T2 = 141 ± 162 ($p = 0,0267$)

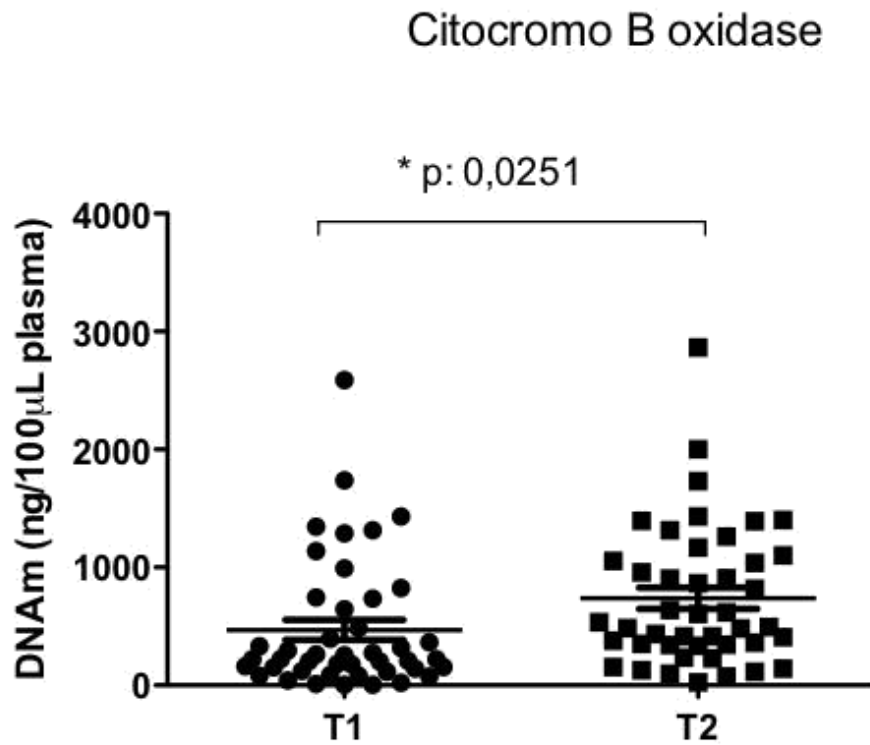


Gráfico 3 - Comparação do valor de citocromo B entre T1 e T2 (n=44).

Teste t Student. Valores de Citocromo B oxidase: T1 = 469 ± 555 ; T2 = 738 ± 591 ($p = 0,0251$).

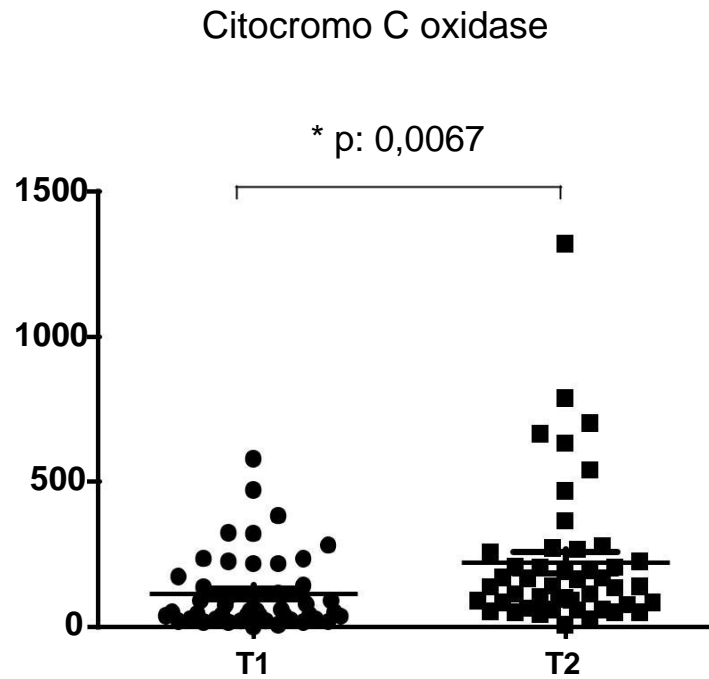


Gráfico 4 - Comparação do valor de citocromo C oxidase entre T1 e T2 (n=47).

Teste t Student. Valores de Citocromo C oxidase: T1 = 116 ± 130 ; T2 = 223 ± 248 ($p = 0,0067$).

Tabela 2- Avaliação da associação do aumento de DNAm com o aumento de aminotransferases no plasma.

Variáveis	n	IC (95%)	R (Spearman)	p
NADH X AST	39	0,2437 a 0,7266	0,5263	0,0006
NADH X ALT	38	0,07277 a 0,6383	0,3919	0,0150
Citocromo B X AST	37	0,3974 a 0,8051	0,6450	< 0,0001
Citocromo B X ALT	37	0,2988 a 0,7618	0,5746	0,0002
Citocromo C X AST	40	0,04438 a 0,5506	0,2798	0,0804
Citocromo C X ALT	39	0,08782 a 0,5261	0,2434	0,1355

T1 (imediatamente antes da clampagem porta); T2 (8 horas após a reperfusão). Para esta análise foi feita a comparação entre o aumento de DNAm (Valor em T2 – Valor em T1) com aumento das aminotransferases (Maior valor nas primeiras 24 horas do pós-operatório – Valor pré-operatório imediato). Valor de significância $p \leq 0,05$.

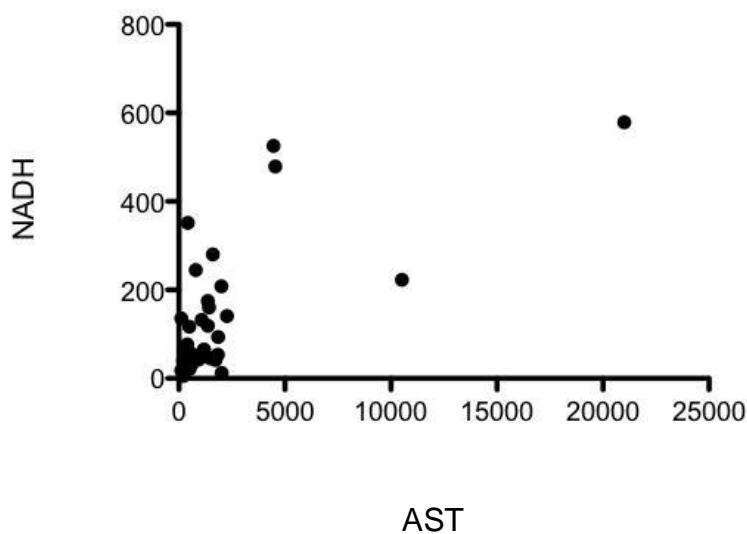


Gráfico 5 - Correlação entre os valores de NADH (ng/μL de DNA) e AST (U/L)

R de Spearman 0,5263, IC (95%) 0,2437 a 0,7266 ($p = 0,0006$).

AST: aspartatoaminotransferase.

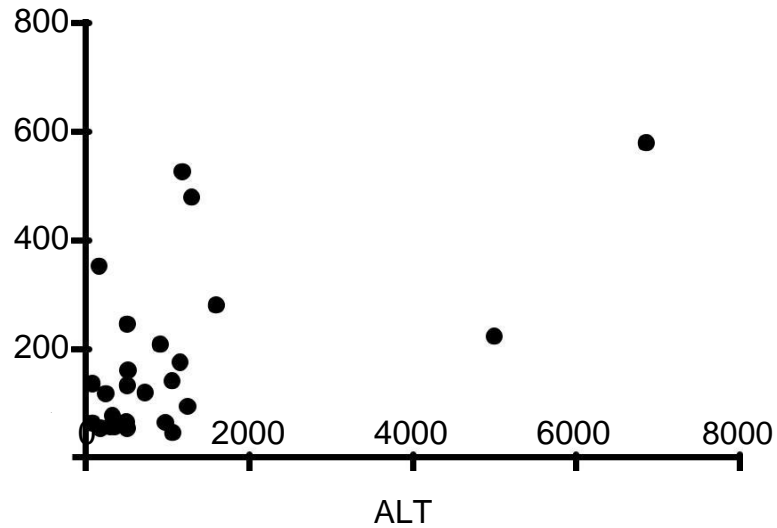


Gráfico 6 - Correlação entre os valores de NADH (ng/μL de DNA) e ALT (U/L)

R de Spearman 0,3919 IC (95%) 0,07279 a 0,6383 ($p = 0,0150$).

ALT: alaninoaminotransferase.

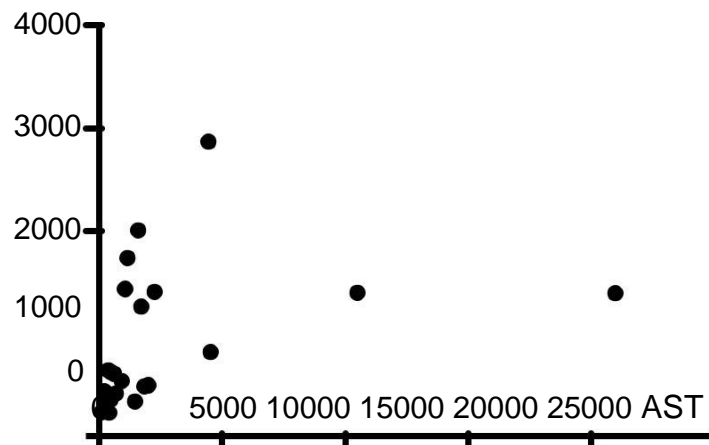


Gráfico 7 - Correlação entre os valores de Citocromo B (ng/μL de DNA) e AST (U/L)

R de Spearman 0,6450, IC (95%) 0,3974 a 0,8051. Valor de P 0,0001.

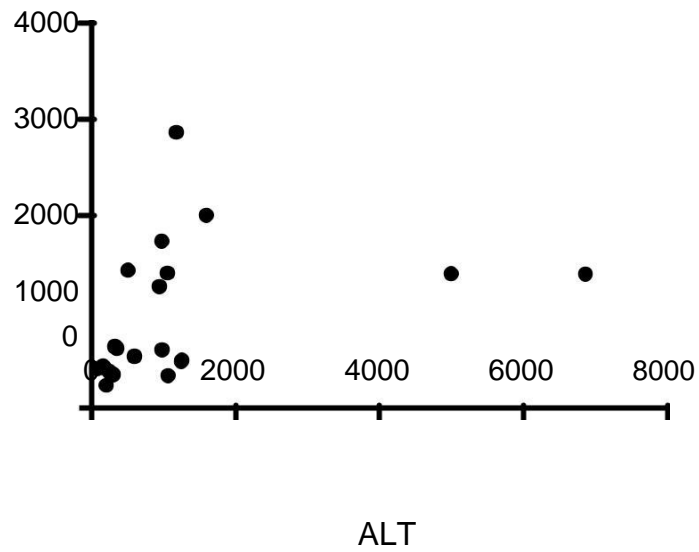


Gráfico 8 - Correlação entre os valores de Citocromo B (ng/μL de DNA) e ALT (U/L)

R de Spearman 0,5746, IC (95%) 0,2988a 0,7618 ($p = 0,0002$).

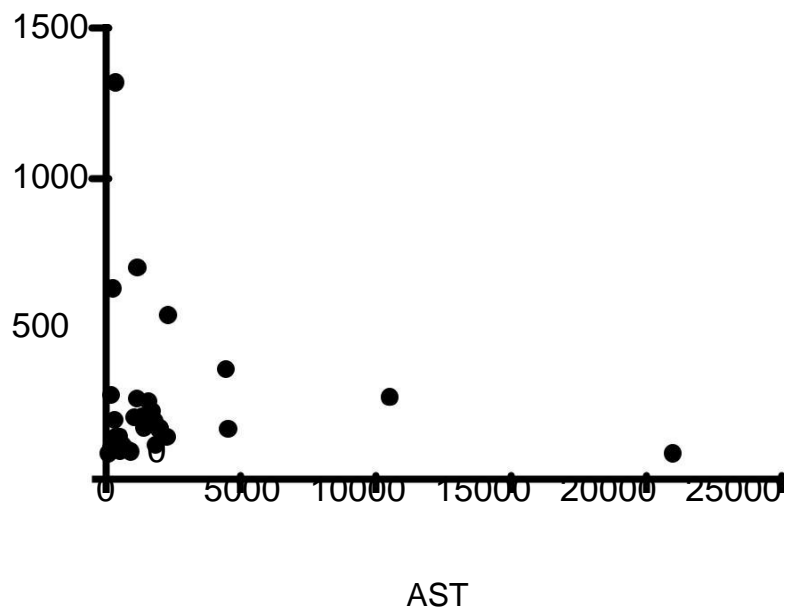
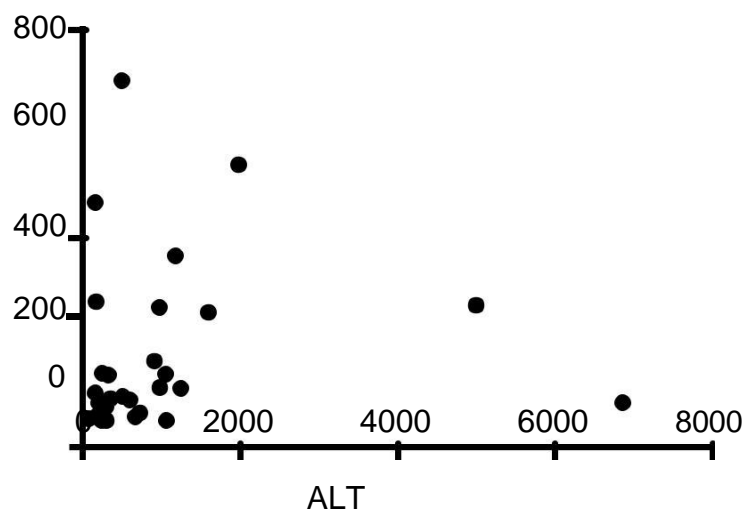


Gráfico 9 - Correlação entre os valores de Citocromo C (ng/μL de DNA) e AST (U/L)

R de Spearman 0,2798, IC (95%) 0,04438 a 0,5506 ($p = 0,0804$).



57

Gráfico 10 - Correlação entre os valores de Citocromo C (ng/μL de DNA) e ALT (U/L)

R de Spearman 0, 2434, IC (95%) 0, 08782 a 0, 5261 ($p = 0, 1355$).

A análise dos dados mostra correlação de forte magnitude entre os valores de NADH e AST, Citocromo B e AST e entre Citocromo B e ALT. Nas demais avaliações evidencia-se correlação de fraca magnitude (GRÁF. 6, 7, 10, 11, 12). Também foi observada correlação de fraca magnitude entre tempo de isquemia os valores de NADH, Citocromo B e Citocromo C.

5. DISCUSSÃO

O sistema imunológico natural, constituído pelas barreiras naturais como a pele, as mucosas, células fagocitárias e o sistema de complemento é essencial para a defesa do organismo contra vírus, bactérias e protozoários. Está presente na cadeia evolutiva desde os anelídeos, enquanto o sistema imunológico adquirido está presente nos animais superiores. Macrófagos e neutrófilos e também outras células não diretamente relacionadas ao sistema imunológico apresentam mais de uma centena de receptores na sua membrana plasmática e no citoplasma que reconhecem estruturas moleculares presentes nas bactérias e nos vírus, dentre outros⁶².

Os receptores são chamados PPRs, e as estruturas que eles reconhecem nas bactérias são chamadas PAMPs. Quando uma célula morre, como no caso da necrose celular, ela libera para o meio extracelular estruturas moleculares que podem ser reconhecidas pelos receptores. Estas estruturas são chamadas DAMPs. A ativação dos receptores do sistema imunológico natural é fundamental para a defesa e limpeza dos tecidos, etapa essencial para a posterior cicatrização. Porém a ativação excessiva pode levar a desregulação do sistema imune e quadros inflamatórios graves, conhecidos pelas abreviaturas: SIRS, CARS, MOF e PCIS^{63,64}.

Somente em 2002 é que se reconheceu que constituintes próprios estão na origem da ativação e desregulação do sistema imune natural⁴⁴. No TH, no período de IR, elétrons escapam dos carreadores da fosforilação oxidativa e formam com o oxigênio espécies reativas, como o superóxido e radicais oxidrila. Estes causam lesão e necrose celular. Os constituintes dos hepatócitos ao extravasar para fora da célula, ganham o espaço extracelular e a seguir a circulação. Os neutrófilos são atraídos para o fígado por um gradiente de quimiocinas CXCL8 que é detectado

pelo receptor CXCR dos neutrófilos. No fígado, eles são atraídos para a zona de necrose pelos peptídeos formilados detectados pelo receptor FPR1^{45,51}. Neste local, eles desencadeiam processo inflamatório. Felizmente, no transplante hepático, este processo é autolimitado com pouca repercussão, mas em caso de estímulo excessivo pode haver necrose autofágica do fígado e inflamação sistêmica, com consequências graves como o não funcionamento primário, disfunção precoce do enxerto e SIRS com MOF. Entre os constituintes extravasados, destacam-se os mitocondriais: ATP, peptídeos formilados, DNA de origem mitocondrial, proteína ligante do mtDNA, fator A transcricional regulador da mitocôndria (TFAM) e a própria mitocôndria^{52,68,70,73-75}. A resposta inflamatória poderá ser de maior ou menor intensidade, dependendo da magnitude do estímulo. Zhang et al. em 2010 relacionaram a liberação de constituintes mitocondriais no trauma com a resposta inflamatória e verificaram a correlação entre gravidade da resposta com níveis plasmáticos dos constituintes mitocondriais⁴². Os peptídeos formilados alteram a permeabilidade capilar de maneira dependente e, também, independente de neutrófilos⁷⁵. A injeção endovenosa de mtDAMPS resulta em grave lesão inflamatória pulmonar em animais de laboratório. Também, a lesão pulmonar aguda resultante de hemotransfusão tem sido relacionada a mtDAMPs, contidos em hemoderivados⁷⁶. Essas observações levantam importantes questões sobre a natureza da resposta inflamatória estéril para constituintes *self* e corroboram a hipótese da correlação entre bactéria e mitocôndria (endossimbiose)⁴⁴.

É aceito que DAMPs, de modo geral, são liberados por células necróticas e não apoptóticas. Particularmente no transplante de fígado ocorre um ambiente favorável a inflamação e a resposta imunológica estéril: tem-se um órgão muito vascularizado, hepatócitos com muitas mitocôndrias e muitas células do sistema imune e LIR desencadeando lesão e morte celular, expondo constituintes internos

da célula ao sistema imune. Para avaliar a participação dos constituintes mitocondriais na resposta inflamatória no TH neste estudo, foram dosados os mtDNAs circulantes (NADH desidrogenase, citocromo C oxidase e citocromo B oxidase) no período perioperatório: imediatamente antes da clampagem da veia porta (T1) e oito horas após a reperfusão (T2). Eles foram correlacionados com o pico de AST e ALT das primeiras 24 horas (reconhecidamente usados como marcadores de lesão e necrose hepatocelular), e também com o tempo de isquemia.

Os principais DNAs de origem mitocondrial são usados como marcadores dos constituintes mitocondriais porque não existem métodos para dosar os peptídeos formilados e os outros mtDAMPs^{42,51}. Observou-se aumento de todos os mtDNAs no pós-operatório de TH, como se pode verificar nos gráficos. 2, 3 e 4. Constatou-se correlação de forte magnitude (r Spearman $\geq 0,5$) entre os valores de NADH e AST, Citocromo B e AST e entre Citocromo B e ALT (gráficos 5, 7 e 8). Constatou-se correlação de fraca magnitude entre NADH e ALT, Citocromo C e AST e entre Citocromo C e ALT (gráficos 6, 9, e 10).

As mitocôndrias são abundantes nos hepatócitos e correspondem a cerca de 20% do seu peso e o seu DNA é muito sensível à isquemia. Quando fora da célula, é reconhecido por receptores localizados nas células fagocitárias, principalmente neutrófilos, ativa o sistema imune inato e direciona a inflamação. Entretanto, constatou-se correlação de fraca magnitude em todas as avaliações correlacionadas com o tempo de isquemia. Este fato deve-se, provavelmente, ao breve período de isquemia nesse grupo de pacientes (media $515,10 \pm 146,6$ minutos). Tempo de isquemia abaixo de 12 horas é considerado ideal para o TH. Os resultados dos transplantes realizados com tempo de isquemia abaixo deste tempo

são uniformemente bons, e associados a baixa incidência de complicações relacionadas ao enxerto.

Foram realizadas análises comparativas entre a variação dos valores de mtDNAs com dados dos doadores (idade, gênero, grupo sanguíneo, tempo de ventilação mecânica, uso de aminas, local da doação) e com as soluções de conservação utilizadas, não sendo encontradas correlações de significância estatística e, por isso, não foram descritas nesse trabalho.

As mitocôndrias, por terem origem em uma célula procarionte incorporada na célula eucarionte (admite-se que esse processo ocorreu há $1,5 \times 10^9$ anos), têm muitas estruturas em comum com as bactérias, daí a forte reação imunológica. O extravasamento dos constituintes mitocondriais para dentro do fígado e sua ação local, leva a atração das células fagocitárias, ampliação da inflamação com lesão e morte autofágica dos hepatócitos. Não se sabe como ocorre o extravasamento dos constituintes mitocondriais, nem que fração destes chega à circulação sistêmica. Este processo pode estar relacionado à toxicidade sistêmica, manifestada clinicamente pela reação inflamatória, como aumento da permeabilidade capilar, choque, insuficiência renal aguda, insuficiência respiratória e disfunção de múltiplos órgãos.

Esse trabalho chama atenção para a importância dos mtDAMPs no TH. O tempo relativamente recente do conhecimento, talvez justifique a falta de abordagem terapêutica específica para aqueles casos que evoluem no pós-operatório mediato com níveis elevados de constituintes mitocondriais e, especialmente, com a não função primária, cuja única terapêutica atual é o retransplante de emergência. Embora alguns trabalhos relatem aumento de DNA mitocondrial na lesão de IR hepática nenhum estudo descreveu o seu comportamento após o TH^{22,24}. O número

de pacientes e o delineamento desse estudo (critérios de inclusão e exclusão) ainda não nos permitem tirar conclusões sobre os efeitos que este aumento pode causar ao enxerto. Será que esta elevação dos níveis de DNA aumenta o risco de não função primária ou função retardada do enxerto? Nos estudos experimentais pode-se determinar a correlação entre o aumento destes produtos e a infiltração inflamatória, lesões histológicas do enxerto e se o uso de drogas que inibem a ação inflamatória destas moléculas pode reduzir/abolir essas lesões.

Alvos terapêuticos existem com os seus respectivos bloqueadores que poderiam controlar a sequência de ativação do sistema imune. Maior conhecimento sobre os fatores relacionados ao funcionamento do enxerto e também sobre as complicações decorrentes da toxicidade sistêmica provocada pela estimulação do sistema imune inato, poderia, de maneira segura, aumentar o número de enxertos a serem utilizados, tornando disponíveis enxertos, antes, considerados inadequados. Já existem opções potenciais, como bloqueadores dos receptores tipo *Toll*, a enzima desoxirribonuclease (DNASE) e bloqueadores do receptor CXCR2, como DF2156^{50,51}.

Os peptídeos formilados atuam nos receptores FPR1 e o mtDNA nos receptores *Toll-like*. A classe de receptores *Toll-like* é objeto de muitos estudos da indústria farmacêutica em várias doenças inflamatórias, entre elas lúpus eritematoso sistêmico e doença de Crohn⁷⁷. Na UFMG o grupo do Professor Gustavo Batista Menezes tem estudado a lesão hepática causada pelo acetaminofeno^{50,51}. Destaca-se nas suas publicações o papel da deposição do DNA nos sinusoides e a ativação do receptor TLR9 previamente sensibilizado pelos peptídeos formilados e deslocado para a membrana celular e a marcante atividade inflamatória resultante de sua ativação. Se esses dados se confirmarem para a LIR, haverá um campo muito promissor para o desenvolvimento de novas abordagens das complicações

inflamatórias causadas pelo TH. Estes achados sinalizam para um novo campo de pesquisa e de possibilidades para futuros alvos terapêuticos no transplante de fígado.

6. CONCLUSÃO

Este estudo evidenciou que constituintes mitocondriais elevam-se na circulação no período pós-operatório de transplante hepático. Essa elevação correlaciona-se com a elevação de aminotransferases nas seguintes situações: entre os valores de NADH e AST, Citocromo B e AST e Citocromo B e ALT.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fortner J, Blumgart L. A historic perspective of liver surgery for tumor at the end of millennium. *J Am Coll Surg.* 2001; 193: 210-222.
2. Marcos A, Ham JM, Fisher RA, Olzinski AT, Posner MP. Single-center analysis of the first 40 adult to adult living donor liver transplant using the right lobe. *Liver Transpl.* 2000; 6:296-301.
3. Couinaud C. Les enveloppes vasculobiliaires de foie ou capsule de Glisson. Leur interet dans la chirurgie vesiculaire, les resections hepatiques et l'abord du hile du foie. *Lyon Chir.* 1954; 49:589-615.
4. Bismuth H. Surgical anatomy and anatomical surgery of the liver. *World J Surg.* 1982; 6:5-9.
5. Bismuth H. Surgical anatomy and anatomical surgery of the liver. *World J Surg.* 1982; 6:3-9.
6. Castaing G, Borie D, Bismuth H. Anatomia del hígado y de las vias biliares in *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*, Paris, p. 40-70, 2002.
7. Cantlie J. On a new arrangement of the of the right and left lobes of the liver. *Proc Anat Soc Great Britain Ireland.* 1897; 32:4-9.
8. Rex H. Beitrage sur morphologie der Saugerleber. *Morphol Jah,* 1888; 14:517-615.
9. Oberholzer A, Souza SM, Tschoeke SK, Oberholzer C, Abouhamze A, Pribble JP, *et al.* Plasma cytokine measurements augment prognostic scores as indicators of outcome in patients with severe sepsis. *Shock.* 2005; 23(6):488-493.
10. Tung TT. *Chirurgie d'exerese du foie.* Masson; 1962.

11. Raia S, Nery J, Mies S. Liver transplantation from live donors. *Lancet*. 1989; 2:497.
12. Hiatt J, Gabbay J, Busuttil RW. Surgical anatomy of the hepatic artery in 1000 cases. *Ann Surg*. 1994; 2050-2052.
13. Iyer S, Pulskens W, Sadler J, Butter L, Teske G, Ulland T, et al. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106: 20388-20393.
14. Klinman JP. How do enzymes activate oxygen without inactivating themselves? *Acc Chem Res*. 2007; 40:325-333.
15. Balmer ML, Slack E, De Gottardi A, Lawson MA, Hapfelmeier S, Miele A, et al. The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota. *Sci Transl Med*. 2014; 6(237):237-266.
16. Crispe, IN. The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27:147- 163.
17. Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science*. 1999; 283: 1488-93.
18. Green DR. The end and after how dying cells impact the living organism *Immunity*. 2011; 35(4):441-444.
19. Cohen MJ, Brohi K, Calfee CS, Rahn P, Chesebro BB, Christiaans SC, et al. Early release of high mobility group box nuclear protein 1 after severe trauma in humans: role of injury severity and tissue hypoperfusion. *Crit Care*. 2009; 13(6):R174.
20. Zlotnik A, Yoshie O, Nomiya H. The chemokine and the chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol*. 7(12):243, 2006.
21. Borregard N. Neutrophils from marrow to microbes. *Immunity*. 33(5):657-670.

22. Quesnelle KM, Bystrom PV, Toledo-Pereira, LH. Molecular response to ischemia and reperfusion in the liver. *Arch Toxicol.* 2015; 89(5):651-657.
23. Datta G, Fuller BJ, Davidson BR. Molecular mechanisms of liver ischemia reperfusion injury: insights from transgenic knockout models. *World J Gastroenterol.* 2013; 19:1683-1698.
24. Zhai Y, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski. Liver ischemia and reperfusion injury: News insights into mechanisms of innate-adaptative immune-mediated tissue inflammation. *Am J Transplant.* 2011; 11(8):1563-1569.
25. Riess ML, Camara AKS, Kevin LG, An J, Stowe DF. Reduced reactive O₂ species formation and preserved mitochondrial NADH and [Ca²⁺] levels during short-term 17°C ischemia in intact hearts. *Cardiovasc Res.* 2004; 61:580-590.
26. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in post ischemic tissue injury.
27. Patel RP, Lang JD, Smith AB, Crawford JH. Redox therapeutics in hepatic ischemia reperfusion injury. *World J Hepatol.* 2014; 6:1-8.
28. Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol.* 2006; 91:807-819.
29. Kussmaul L, Hirst J The mechanism of superoxide production by NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103:7607-7612.
30. Lambert AJ, Brand MD. Superoxide production by NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochem J.* 2004; 382:511-517.
31. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem*

32. Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol.* 1986; 251:G567-G574.
33. Franchello A, Gilbo N, David E, Ricchiuti A, Romagnoli R, Cerutti E Salizzoni M. Ischemic preconditioning (IP) of the liver as a safe and protective technique against ischemia/reperfusion injury (IRI). *Am J Transplant.* 2009; 9:1629-1639.
34. Jaeschke H, Woolbright BL. Current strategies to minimize hepatic ischemia-reperfusion injury by targeting reactive oxygen species. *Transplant Rev (Orlando).* 2012; 26:103-114.
35. Callapina M, Zhou J, Schmid T, Köhl R, Brune B. NO restores HIF-1 α hydroxylation during hypoxia: role of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2005; 39:925-936.
36. Sanjuán-Pla A, Cervera AM, Apostolova N, Garcia-Borer R, Vitor VM, Murphy MP, Mc Creath KL. A targeted antioxidant reveals the importance of mitochondrial reactive oxygen species in the hypoxic signaling of HIF-1 α . *FEBS Lett.* 2005; 579:2669-2674.
37. Görlach A, Berchner-Pfannschmidt U, Wotzlaw C, Cool RH, Frandey J, Acker H, Jungermann K, Kietzmann T. Reactive oxygen species modulate HIF-1 mediated PAI-1 expression: involvement of the GTPase Rac1. *Thromb Haemost.* 2003; 89:926-935.
38. Hu C-J, Wang L-Y, Chodosh LA, Brian K, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in hypoxic gene regulation. 2003; 23:9361-9374.
39. Semenza GL. O₂-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1. *JAppl Physiol.* 2004; 96:1173-1177.

40. Lemasters JJ, DiGiuseppi J, Nieminen AL, Herman B. Blebbing, free Ca²⁺ and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature*. 1987; 325:78-81.
41. Evankovich J, Cho SW, Cardinal J, Zhang R, Dhupar R, Zhang L. High mobility group box 1 release from hepatocytes during ischemia and reperfusion injury is mediated by decreased histone deacetylase activity. *J Biol Chem*. 2010; 285:39888–39897.
42. Zhang Q, Raouf M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, *et al*. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*, 2010; 464: 104–107.
43. Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT. Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol*. 2000; 165:1013-1021.
44. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002; 296(5566):301-305.
45. Hanschen M, Zahler S, Krombach F, Khandoga A. Reciprocal activation between CD4+ T cells and Kupffer cells during hepatic ischemia-reperfusion.
46. McDonald B, Pittmam K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CC, Beck PL. Intravascular danger signals guide neutrophils to site of sterile inflammation. *Science*. 2010; 15: 330(6002): 362-366.
47. Nace GW, Huang H, Klune JR, Eid RE, Rosborough BR, Korffs S *et al*. Cellular-specific role of toll-like receptor 4 in hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Hepatology*. 2013; 58:374-387.
48. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol*. 1991; 260:G355-G362.

49. Jaeschke H, Smith CV, Mitchell JR. Hypoxic damage generates reactive oxygen species in isolated perfused rat liver. 1988; 150:568-574.
50. Imamura H, Sutto F, Brault A, Huet PM. Role of Kupffer cells in cold ischemia/reperfusion injury of rat liver. *Gastroenterology*. 1995; 109:189-197.
51. Marques PE, Amaral SS, Pires DA, Nogueira LL, Soriani FM, Lima BHF *et al.* Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. *Hepatology*; 2012; 56(5):1971-1982.
52. Marques PE, Oliveira AG, Pereira RV, David BA, Gomides LF *et al.* Hepatic DNA deposition drives drug-induced liver injury. *Hepatology*. 2015; 6(1):348-360.
53. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2:965-975.
54. Fadeel B, Xue D. The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2009; 44:264-277.
55. Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko D. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity*. 2013; 38:209-223.
56. Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, *et al.* Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol*. 2005; 1:112-119.
57. Degterev A, Hitomi J, Germscheid M, Ch'en I, Korkina O, Teng X, *et al.* Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol*. 2008; 4:313-321.

58. Sun L, Wang H, Wang Z, He S, Chen S, Liao D, *et al.* Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*. 2012; 148:213-227.
59. Jenne CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol*. 2013; 14(10):996-1006.
60. Kim JS, He L, Qian T, Lemasters JJ. Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes. *Curr Mol Med*. 2003; 3:527-535.
61. Chang WJ, Toledo-Pereyra LH. The role of HMGB1 and HSP72 in ischemia and reperfusion injury. *J Surg Res*. 2011; 166:219-221.
62. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. 2010; 10(12):826-37.
63. Moore FA, Moore EE. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *Surg Clin North Am*. 1995; 75(2):257-277.
64. Gentile LF, Cuenca AG, Efron PA, Ang D, Bihorac A, McKinley BA, *et al.* Persistent inflammation and immunosuppression: a common syndrome and new horizon for surgical intensive care. *J Trauma Acute Care Surg*. 2012; 72(6):1491-501.
65. Olthoff KM, Kulic KL, Samstein B, Kaminski M, Abecassis M. Validation of a current definition of early allograft dysfunction in liver transplantation recipients and analysis of risk factor. *Liver Transplant*. 2010; 16: 943-9.
66. Gibot S, Massin F, Cravoisy A, Barraud D, Nace L, Levy B, *et al.* High-mobility group box1 protein plasma concentrations during septic shock. *Intensive Care Med*. 2007; 33(8):1347-1353.

67. Andrade AMF. HMGB1 e nucleossomos como marcadores de evolução clínica em pacientes submetidos a transplante hepático. Tese de doutorado em Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto. Belo Horizonte: UFMG, 2014.
68. Grishko V, Solomon M, Wilson GL, Le Doux SP, Gillespie MN. Oxygen radical-induced mitochondrial DNA damage and repair in pulmonary vascular endothelial cell phenotypes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001; 280:L1300-L1308.
69. Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:514-519.
70. Koczor CA, Snyder JW, Shokolenko IN, Dobson A W, Wilson GL, Ledanx SP. Targeting repair proteins to the mitochondria of mammalian cells through stable transfection, transient transfection, viral transduction, and TAT mediated protein transduction. *Methods Mol Biol.* 2009; 554:233-249.
71. Krysko DV, Agostinis P, Krysko O, Garq AD, Bachert C, Lambrecht BN *et al.* Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol.* 2011; 32:157-164.
72. Maeda A, Fadeel B. Mitochondria released by cells undergoing TNF- α -induced necroptosis act as danger signals. *Cell Death and Disease.* 2014; (5),e1312.
73. Collins LV, Hajizadeh S, Holme E, Jonsson IM, Tarkowski A. Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses. *J Leukoc Biol.* 2004; 75: 995-1000.

74. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000; 102:33-42.
75. Latanich CA, Toledo-Pereyra LH. Searching for NF-kappaB based treatments of ischemia reperfusion injury. *J Invest Surg*. 2009; 22:301-315.
76. Yann-Leei L, King MB, Gonzalez RP, Brevard SB, Frotan MA, Gillolespie MN *et al*. Blood products contain mitochondrial DNA damage-associated molecular patterns: a potential effector of transfusion-related acute liver lung injury. *J Surg Res*. 2014; 191(2) 286-289.
77. Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, Chan JH, Uematsu S, Akira S *et al*. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligand for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *JEM*. 2005; (17):1131-39.

8. ANEXOS

Anexo A – Protocolo de avaliação pré-operatória para o transplante hepático

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Grupo Sang: _____ Data do Nascimento: ____/____/____ Idade: _____

Cor: () leuco () faio () melano

Profissão _____

Naturalidade _____ Endereço: _____

Telefones de contato: _____

INDICAÇÃO AO TRANSPLANTE: _____ (doença)

REFERÊNCIAS MÉDICAS

CLÍNICO/HEPATOLOGISTA:

Dr. _____ Serviço: _____

Data do Encaminhamento: _____

Endereço para correspondência: _____

Telefones para contato: _____

RESPONSÁVEL PELO TRANSPLANTE:

Dr. _____ (CIRURGIA)

Dr.: _____ (CLÍNICA)

ANAMNESE

Evolução da doença:

COMPLICAÇÕES:

Ascite:

Peritonite:

Hemorragia Digestiva:

Encefalopatia:

Outras:

Data: ____/____/____

ANTECEDENTES CLÍNICOS:

Hipertensão Arterial Doença Ulcerosa Pneumopatia Tabagismo

tratamento: _____

tratamento: _____

_____ anos _____ cigarros / dia Etilismo Pancreatite crônica Epilepsia
 Diabetes Doenças infecciosas Outros

ANTECEDENTES CIRÚRGICOS:

Hepatectomia _____ Cirurgia Vias Biliares _____

Outras cirurgias abdominais _____

EXAME FÍSICO

PESO: _____ kg ALTURA: _____ cm

Encefalopatia: leve moderada grave *flapping*: sim não asterixis sim não Icterícia: leve

moderada acentuada Mucosas: coradas descoradas _____ ACV: P.A.

_____/_____/_____ mmHg FC _____ bpm ausculta: _____ AR:

F.R. _____ ipm ausculta: _____

Abdome: Cicatriz(es) cirúrgica(s) _____

Fígadopalpação: doloroso endurecido amolecido Outro _____

Hepatomegalia _____ cm RCD; _____ cm apêndice xifóide Baço

71 Esplenomegalia _____ cm; tipo ____ Boyde

Ascite discreta moderada volumosa; perímetro abdominal _____ cm

Circulação colateral tipo cava superior tipo cava inferior cabeça de medusa

Orofaringe _____

Linfadenomegalias cervical axilar inguinal Edema de membros inferiores discreto

moderado acentuado Alterações cutâneas teleangiectasias perda de fâneros

outras alterações _____

Outros:

Data: ____/____/____

EXAMES LABORATORIAIS

(____ / ____ / ____)

Hem: _____ Hb: _____ Ht: _____ Plaquetas:

_____ Leuc. Glob: _____ NBast _____

NeutSegm _____ B _____ E _____ M _____ Linfócitos _____ Atividade

de Protr _____ RNI _____ PTTa _____ P/ _____ C AST _____

ALT _____ GGT _____ LDH _____ Fosf Alc _____ Bilirrubina

T _____ /D _____ Glicemia _____ Albumina _____ Globulina _____

Uréia _____ Creatinina _____ Urina

Rotina _____ Na+ _____ K+ _____ Cl-

_____ Mg++ _____ Ca++ _____

Medicação em Uso*Classe A = 5 ou 6 pontos Classe B = 7 a 9 pontos Classe C = 10 a 15 pontos Na***cirrose biliar:** bilirrubina = 1 pt se < 4mg/dl, 2 pt se entre 4 e 10, 3 pt se > 10 mg/dl**Classificação CHILD-PUGH****encefalopatia** ausente confusão mental coma

--

ascite bilirrubina albumina protrombina

ausente < 2mg/dl > 3,5 g/dl > 50%

moderada 2 a 3 mg/dl 2,8 - 3,5 g/dl 40 -

50% importante > 3mg/dl < 2,8 g/dl < 40%

Diurético(s):

Lactulose:

Outros:

Child-Pugh

Cobre sérico (____/____/____): _____

Cobre urinário (____/____/____): _____

Ceruloplasmina (____/____/____): _____

á1-antitripsina (____/____/____): _____

Fenotipagem á1 (____/____/____): _____

Ac anti-mitocôndria (____/____/____): _____

Ac. anti-músculo liso (____/____/____): _____

Ac. anti-microsomal (fígado-rim) (____/____/____): _____

Ac. anti-núcleo (____/____/____): _____

Ferro sérico (____/____/____): _____

Ferritina (____/____/____): _____

Capac ligação Fe (____/____/____): _____

HBsAg (____/____/____): _____

DNA virus B (____/____/____): _____ A

nti-HBs (____/____/____): _____

HBeAg (____/____/____): _____

Anti-HBe (____/____/____): _____

Anti HBc IgM (____/____/____): _____

Anti-HBc T (____/____/____) _____

Anti-HAV (____/____/____): _____

Anti-HCV (____/____/____): _____

RNA virus C (____/____/____): _____

Anti-HDV (____/____/____): _____

EXAMES COMPLEMENTARES Avaliação da Hepatopatia

BIOPSIA HEPÁTICA (____/____/____) _____

á feto proteína (____/____/____): _____ (____/____/____):

_____ (____/____/____): _____

(____/____/____): Antig. Carc Embr (CEA) Outros marcadores

(____/____/____): _____ (____/____/____): _____

(____/____/____): _____ (____/____/____): _____

Avaliação Imunológica

Classificação HLA (____/____/____): A _____ A _____ B _____ B

_____ Dr _____ Dr _____ Dq _____ Dq _____ Dosagem de

Complemento: (____/____/____) Total: _____ C3

_____ C4 _____ Reatividade contra painel de

leucócitos (____/____/____):

Pesquisa de aglutininas irregulares: (fenotipagem de hemácias) Mielograma

(____/____/____): _____

Avaliação Hematológica

(____/____/____) _____

Avaliação Infectológica

HIV (____/____/____): _____ HTLV I e II

(____/____/____): _____ CMV (____/____/____):

IgM _____ IgG _____ Herpes simples I e II (____/____/____):

IgM _____ IgG _____ Epstein-Barr (____/____/____): IgM _____ IgG

_____ D. Chagas IFI (____/____/____):

_____ Reação de Machado Guerreiro

(____/____/____): _____ Toxoplasmose (____/____/____):

IgM _____ IgG _____ Outros

(____/____/____): _____

(____/____/____): _____

EPF (____/____/____): Concentração _____

Baerman-Moraes _____

(____/____/____): Concentração _____

Urocultura (____/____/____):

Cultura de Swab de garganta - Bactérias Fungos (____/____/____):

(____/____/____): (____/____/____):

Cultura de Fezes:

Bactérias(____/____/____): _____ Fungos

(____/____/____): _____ **Radiografia do**

tórax Ultra-som abdominal

EXAMES COMPLEMENTARES

(____/____/____): _____

dimensões do fígado _____ dimensões do

baço _____ *parênquima*: homogêneo heterogêneo não

assinalado *vesícula biliar* ausente presente sem cálculos presente com cálculos

nódulos hepáticos ausentes ao US presente

_____ *ascite*: pequena moderada

volumosa - *aspecto* límpido debris

rins _____

pâncreas _____ o

utros _____

Ultra-som abdominal

(____/____/____): dimensões do fígado _____ dimensões do

baço _____ *parênquima*: homogêneo heterogêneo não assinalado

vesícula biliar ausente presente sem cálculos presente com cálculos *nódulos*

hepáticos ausentes ao US presente

_____ *ascite*: pequena moderada

volumosa - *aspecto* límpido debris

rins _____

pâncreas _____

_____ *outros* _____

Ultra-som abdominal (_____/_____/____): dimensões do fígado

_____ dimensões do baço _____ *parênquima*:

homogêneo heterogêneo não assinalado

vesícula biliar ausente presente sem cálculos presente com cálculos *nódulos*

hepáticos ausentes ao US presente

_____ *ascite*: pequena moderada

volumosa - *aspecto* límpido debris

rins _____ *pân*

creas _____

Doppler hepático (_____/_____/____): artéria hepática pérvea: fluxo

_____ obstruída veia porta pérvea: fluxo

_____ obstruída. Diâmetro: _____

circulação colateral porta: gástrica E - fluxo _____ diâmetro _____

umbilical - fluxo _____ diâmetro _____ retroperitônio - fluxo

_____ diâmetro _____

Doppler hepático

(_____/_____/____): artéria hepática pérvea: fluxo _____ obstruída

veia porta pérvea: fluxo _____ obstruída. Diâmetro: _____

circulação colateral porta: gástrica E - fluxo _____ diâmetro _____

umbilical - fluxo _____ diâmetro _____ retroperitônio - fluxo

_____ diâmetro _____

vasos colaterais visíveis: não sim

outras alterações

(_____/_____/____): convencional helicoidal fígado: aumentado normal reduzido

nódulos não sim _____

baço: aumentado normal rins normais alterados

linfonodos não visibilizados sim

ascite não sim (discreta, moderada, volumosa)

vasos colaterais visíveis: não sim

outras alterações

(_____/_____/____): convencional helicoidal fígado: aumentado normal reduzido

nódulos não sim _____

baço: aumentado normal rins normais alterados _____

linfonodos não visibilizados sim

_____ ascite não sim

(discreta, moderada, volumosa) _____

vasos colaterais visíveis: não sim

outras alterações

Tomografia Abdominal:

Arteriografia célio-mesent. (____/____/____): artéria hepática

tronco celíaco

veia porta

lipiodol: não sim

R adiogr seios da face (____/____/____):

_____ M

angiografia (> 30 anos) (____/____/____):

_____ Ci

angiografia óssea (neoplasia) (____/____/____):

Tomografia cerebral

Ecocardiograma

Prova de esforço

(____/____/____):

(____/____/____): valvas _____

Fração de ejeção _____% contratilidade _____ derrame

pericárdico: sim não Acinesias: sim não

Outros _____

(____/____/____): valvas _____

Fração de ejeção _____% contratilidade _____ derrame

pericárdico: sim não Acinesias: sim não

Outros _____ (____/____/____):

Ecografia de stress(____/____/____):

Cineangiocoronariografia (____/____/____):

Cintilografia de perfusão (____/____/____):

miocárdica

Doppler carotidiano (____/____/____):

Endoscopia digestiva alta (____/____/____): varizes de esôfago não sim -

número _____ calibre _____

varizes do fundo gástrico não sim



teste da urease _____

Colonoscopia

varizes do fundo gástrico não sim

teste da rease

_____ (____/____/____):

Gasometria arterial (____/____/____): pH _____; p O₂ _____;

p CO₂ _____; HCO₃ _____

CONSULTAS ESPECIALIZADAS

Odontologia Otorrinolaringologia Oftalmologia

Ginecologia Ginecologia Ginecologia Psicologia Fisioterapia Hematologia
Neurologia

Anestesiologia Cardiologia Pneumologia

Anexo B – Protocolo anestésico para o transplante hepático

P REPARAÇÃO DA ANESTESIA

Pessoalmente ou por telefone:

1.1.1 Fazer a visita pré-anestésica e conversar com o cirurgião a respeito do paciente, da antibioticoterapia e da imunossupressão;

1.1.2 Banco de Sangue - confirmar reservas:

- 20 Ud de Concentrado de Hemácias (CH)
- 20 Ud de Plasma Fresco Congelado (PFC)
- 20 Ud de Plaquetas (PI)
- 20 Ud de Crioprecipitado (Crio);

1.1.3 Laboratório - relacionar os exames a serem realizados e reforçar a necessidade de rapidez na sua realização:

- Hematimetria
- Gasometria
- Lactato
- Testes da coagulação:
 - AP (RNI)
 - TTP
 - PI
 - Fibrinogênio

- PDF (Produtos de degradação da fibrina), Dímero D
- Ionograma: Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺ iônico, Cl⁻, Mg⁺⁺
- Glicose, Ureia, Creatinina;

1.1.4 Farmácia - drogas necessárias e preparo de 1 litro de albumina a 5% (conservar em geladeira até a utilização, durante as anastomoses).

Checar ou preparar:

- . 1.2.1 Colchão térmico e manta térmica
- . 1.2.2 Protetores para os membros e plástico para cobrir a cabeça do paciente
- . 1.2.3 Bombas de infusão (3 a 4) e de aquecimento de soluções, com os devidos equipos
- . 1.2.4 Bombas de infusão de seringa
- . 1.2.5 Aquecimento de soro (estufa)
- . 1.2.6 Vidros e seringas de coleta, identificados com o nome do paciente
- . 1.2.7 Ficha de anestesia, ficha de exames per-operatórios e pedidos de exames
- . 1.2.8 Aspirador de secreções (PACIENTE DE ESTÔMAGO CHEIO!!!)
- . 1.2.9 Aparelho de anestesia com fluxômetros de ar e O₂ • Funcionamento • Gases • Vazamento
 - Cal sodada (Trocar e drenar água)
 - Funcionamento do ventilador

- Anestésico no vaporizador 1.2.10 Ligar monitor com três canais de pressão invasiva, canal de débito, ECG, Oxímetro, PNI (enquanto não houver PIA), analisador de gases e espirometria. Ajustar os ganhos e rotular os transdutores.
- . 1.2.11 Ligar tromboelastógrafo – **110 V** – e o computador – **110 V**
- . 1.2.12 Tubos traqueais com balonete de baixa pressão esterilizados
- . 1.2.13 Sonda gástrica calibrosa
- . 1.2.14 Vasoconstrictor nasal
- . 1.2.15 Laringoscópio
- . 1.2.16 Estetoscópio
- . 1.2.17 Eletrodos
- . 1.2.18 Cateteres venosos curtos #14 (2 unid), #16 (2 unid), #20 (2 unid)
- . 1.2.19 Sistema de infusão rápida de sangue (CEC)
- . 1.2.20 Desfibrilador

Montar

1.3.1 3 frascos de solução de Ringer-lactato com equipo comum e extensão de dupla via para veias periféricas

1.3.2 1 frasco de solução de Ringer-lactato com equipo comum e torneira de três vias para bainha do cateter de termodiluição

DE LUVAS:

1.3.3 Mesa auxiliar com campos estéreis, com:

- pacotes de compressas e gazinhas
- bandeja de Punção Venosa com 2 conjuntos para monitorização invasiva (verificar compatibilidade com o monitor)
- catéter venoso curto #20, para punção da artéria radial
- introdutor do catéter de Swan-Ganz (só abrir o catéter de Swan-Ganz depois que o guia estiver colocado)

1.3.4 Conjunto para PIA (lavagem contínua sem heparina) –

Conectar no canal P1 do monitor

1.3.5 Conjunto para PAP – **Conectar no canal P2 do monitor**

1.3.6 Encher os conjuntos com soro fisiológico, conectar e zerar os transdutores (com o auxílio de outro anestesista, sem luvas)

1.3.7 Montar o terceiro conjunto, para PVC, só depois que o catéter de Swan Ganz estiver posicionado - **Conectar ao canal P4 do monitor**

PREPARAÇÃO DA MEDICAÇÃO Em Seringas:

- Propofol- 1,5 a 2,0mg/kg ou Ketamina - 2 mg/kg ou Etomidato
1 amp
- Rocurônio – 0,9 mg/kg ou Succinilcolina - 1 mg/kg
- Fentanil - 3-5 µg/kg
- Lidocaína - 1 mg/kg
- Cloreto de Cálcio - 2 seringas de 20 ml com uma ampola

diluída para 20 (50 mg/ml)

- H₂CO₃ - 2 ampolas em seringa de 20 ml (**só para crianças**)
- Adrenalina 1:1.000: diluir em 20 ml (50 mcg/ml), duas seringas. • Rediluir 2ml para 20 ml (5 mcg/ml), duas seringas. Se houver bomba de seringa, não é necessário rediluir, administrar bolus pela bomba
- Cefotaxima 2 g (no início da cirurgia) e 1 g de 8/8 horas (60 mg/kg)
- Ampicilina 2 g (no início da cirurgia) e 1 g de 6/6 horas (60 mg/kg)
- Metilprednisolona 500 mg (crianças: 15-30 mg/kg) no início das anastomoses e ao final da cirurgia

Em Bombas de Infusão:

- Noradrenalina: diluir 1 ampola em seringa de 20 ml - 200 mcg/ml (iniciar 1 mcg/min, 0,05 – 0,1 mcg/kg/min)

Adaptar as seringas em extensores de 120 cm e duas torneiras de três vias, e adaptar um soro para empurrá -las. De preferência, elas correm em via acessória do cateter de termodiluição; senão, na bainha

- Adrenalina: 1 ampola em seringa de 20 ml – 50 mcg/ml (iniciar 1 ml/h – 0,83 mcg/min), em vez da noradrenalina, se o paciente usar beta-bloqueador ou, por outro motivo, precisar de beta+alfa-agonista
- Fenilefrina 1 ampola em 20 ml
- Metaraminol 1 ampola em 20 ml
- Dobutamina 1 ampola em 20 ml

- Aprotinina 1 frasco de 50 ml em bomba de infusão
- Heparina 5000 UI em 20 ml – 250 UI/ml ou 10.000 UI em 250 ml – 40 UI/ml
- Bicarbonato de Sódio 5 % - não diluir, para adultos; infundir em veia central
- Fluconazol 200 mg/dia (6 mg/kg/dia), se: abertura do trato gastrointestinal; transfusão > 40 bolsas; infecção fúngica; insuficiência hepática aguda.
- **3 PUNÇÃO VENOSA E MONITORIZAÇÃO DO PACIENTE • Só chamar o paciente quando todo o material acima estiver preparado.** • Colocação dos eletrodos: regiões supraescapulares direita e esquerda; linhas axilares posteriores direita (perna direita) e esquerda (perna esquerda) e na posição de V5, após desengordurar com éter e passar tintura de benjoim. (Os eletrodos nas costas machucam o paciente e dão um traçado péssimo)
- Se não houver veia puncionada, puncionar uma, de preferência no dorso da mão direita, com catéter curto # 22, #20 ou #18. Reservar as veias calibrosas para as punções seguintes. • De acordo com os exames de coagulação e contagem de plaquetas, administrar PFC e plaquetas, prevenindo hemorragia nas punções arterial, venosa central e de veias calibrosas. • Colocar o oxímetro de pulso e a braçadeira para medida de pressão não- invasiva.

INDUÇÃO, PUNÇÕES E MONITORIZAÇÃO

Geralmente, é feita indução de seqüência rápida.

Verificar funcionamento do aspirador e determinar quem fará compressão de cricóide e, se necessário, céfalo-declive.

Após opióide (fentanil 0,25 mg), o agente hipnótico costuma ser tiopental ou etomidato.

O relaxamento pode ser feito com succinilcolina ou rocurônio em doses suficientes para intubação em 90 s.

Introduzir cuidadosamente sonda oro-gástrica calibrosa Proteger os olhos.

As punções devem ser feitas por pessoal bem treinado, em vista da gravidade dos pacientes.

Além da veia utilizada para indução, puncionar duas veias com cânulas #14 ou #16, de preferência no m.s.d.

A artéria radial (geralmente a esquerda) deve ser puncionada com cânula #20.

O cateter de termodiluição é introduzido, de preferência, pela veia jugular interna direita. Se não houver anestesistas experientes em quantidade suficiente, solicitar que algum cirurgião faça esta punção, para evitar perda de tempo.

Sugestão para infusões: veia menos calibrosa: infusão de aprotinina e heparina;

veias calibrosas: manter com solução salina, lentamente; em uma, instalar a bomba de infusão rápida e reservar a outra para infusões de componentes de sangue;

bainha do cateter de termodiluição: hidratação, de preferência com Ringer - lactato.
via acessória do catéter de termodiluição: (nor)adrenalina e dopamina + soro para empurrar.

Iniciar infusão de dopamina e (nor)adrenalina.

Organizar e identificar os equipos, numerar os frascos de soro.

Verificar posição da bolsa de urina, após sondagem vesical pelo cirurgião.

Verificar posicionamento do paciente, evitando pontos de pressão excessiva e hiperextensão de membros e pescoço.

MANUTENÇÃO

Administrar nova dose de Fentanil, para evitar taquicardia pelo isoflurano.

Fazer exames laboratoriais de hora em hora ou quando necessário.

Medir diurese horária, procurando manter 1 ml/kg.h. Se a diurese for menor que 0,5 ml/kg.h, iniciar infusão de dopamina. Se a oligúria persistir, administrar furosemida ou/e manitol.

Manter as fichas de anestesia e de exames o mais atualizadas possível. O uso de cristalóides é guiado pela natremia.

- Se estiver acima de 140 mEq/l, pode ser usado NaCl 0,9 %.
- Se estiver abaixo de 140 mEq/l e a kalemia estiver normal, usar solução de Ringer com lactato.
- Se houver hiperkalemia e a natremia estiver abaixo de 140 mEq/l, preparar solução de NaCl com a mesma concentração do plasma. 1 ml de NaCl a 20% tem 3,42 mEq. Sugestão: ABD 500 ml; retirar 25 ml Adicionar: 10 ml NaHCO₃ 8,4% 15 ml NaCl 20% Conteúdo final: Na⁺: 122 mEq/L, Cl⁻: 102,6 mEq/L, HCO₃⁻: 20 mEq/L Manter os padrões hemodinâmicos e metabólicos dentro de faixa presumivelmente não prejudicial, com o mínimo de volemia possível. Se necessário, usar colóides (hidroxietilamido até 20 ml/kg) moderadamente. Ventilar com oxigênio ou mistura oxigênio/ar, mantendo a FiO₂ em torno de 0,5 e a ETCO₂ em torno de 30 mmHg ou mais baixa, de acordo com a gasometria, geralmente hiperventilando para compensar acidose metabólica.

Manter isoflurano em torno de 1,2 CAM, se possível. Em grandes reposições sangüíneas, acompanhar o cálcio iônico e o intervalo QT. Repor fatores de coagulação só quando clinicamente indicados, i.e., com sangramento difuso, de acordo com o TEG.

A reposição de Cloreto de Cálcio é, em média, 1g/6 unidades de plasma ou concentrado de hemácias.

Fase pré-anepática

Antes da fase anepática, se for interrompido o fluxo sangüíneo das veias cava inferior e porta, geralmente é necessário aumentar a volemia. A administração de vasoconstrictor (aumentar noradrenalina) pode diminuir a exigência volêmica.

Fase anepática

Administrar metilprednisolona 500 mg (crianças: 20 mg/kg) Se o fluxo sangüíneo pela cava inferior e pela porta estiver interrompido, a diurese cai muito ou zera. O débito cardíaco passa a suprir somente a parte superior do corpo. Procurar manter os mesmos padrões da primeira fase. Tentar não repor fatores de coagulação, se

for usado desvio veno-venoso. Se houver hiperpotassemia, o melhor tratamento parece ser glicose+insulina (20 U ev, 500 ml a 5%). **5.3**

Reperusão Geralmente, pouco antes da reperusão, administrar 250 ml de bicarbonato de sódio a 5 % em veia central. Aumentar a FiO₂. Devem estar preparadas bolsas de sangue ou a bomba de infusão rápida. Não hiper-hidratar o paciente antes, pois pode ocorrer hipertensão pulmonar. À reperusão, um fica responsável pela injeção de CaCl₂ (bainha do SG), de acordo com a onda T, e outro pela de Adrenalina (via proximal do SG), de acordo com PAM.

Ao final, administrar metilprednisolona 500 mg.

ANEXO C – Protocolo cirúrgico do transplante hepático

Universidade Federal de Minas Gerais Hospital das Clínicas
 Instituto Alfa de Gastroenterologia

TRANSPLANTE DE FÍGADO

RECEPTOR - ROTINAS DE ADMISSÃO PARA O TRANSPLANTE

1. Dieta suspensa
 2. Pesar e medir
 3. FC, FR, PA, temperatura axilar
 4. Swab nasal, axilar, orofaringe, perianal
 5. Banho com PVPI degermante
 6. Tonsura axilar, torácica, abdominal, pubiana
 7. Proteger proeminências ósseas com filmes transparentes
-
1. Reserva de sangue 10 unidades de concentrado de hemácias 10 unidades de plasma fresco congelado 10 unidades de plaquetas
 2. Exames radiográficos Radiografia de tórax PA e perfil ortostatismo
 Radiografia de seios da face AP e mento-naso
 3. Exames laboratoriais Hemograma, AP/RNI, plaquetas, PTT, fibrinogênio Glicose, uréia, creatinina, Na, K, Cl, Ca, Mg, P, CO₂, lactato Amilase, lipase, albumina, bilirrubinas, AST, ALT, FA, GGT, LDH
 4. Contactar nefrologia (BIP), urologia (BIP) – CENTRAL 138
 5. Contactar CTI, farmácia, anestesia, bloco cirúrgico

Anexo D - Protocolo de imunossupressão no transplante hepático

GRUPO DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS

Instituto Alfa de Gastroenterologia
HC - UFMG

PROTOCOLO DE IMUNOSSUPRESSÃO

Transplante Hepático

Nome: _____ Registro: _____
 Nascimento: _____ idade _____ Peso: _____ kilos
 Indicação ao transplante: _____

Data	DPO	Prednisona / Metilprednisolona	TACROLIMUS
	dia 0	7 mg/kg X 2 (até max. 500mg X 2) > 1 hora antes da reperusão > ao término da cirurgia	
01/01/00 A 02/01/00	1 A 2 DPO	1,5 mg/kg/dia em 2 doses 2 vezes 0	0,15 mg/kg/dia em 2 doses 0 mg/dia
03/01/00 A 08/01/00	3 A 8 DPO	1,0 mg/kg/dia em 2 doses 2 vezes 0	SEMPRE ÀS 8h E 20h 0 mg/dose
09/01/00 A 14/01/00	9 A 14 DPO	0,5 mg/kg/dia em 2 doses 2 vezes 0	
15/01/00 A 30/01/00	15 A 30 DPO	0,3 mg/kg/dia em 2 doses 2 vezes 0	
31/01/00 A 29/02/00	31 A 60 DPO	0,2 mg/kg/dia em 1 dose 1 vez 0	Tx residual em torno de 15 ng/ml
01/03/00 A 30/03/00	61 A 90 DPO	0,1 mg/kg/dia em 1 dose 1 vez 0	Tx residual em torno de 10 a 15 ng/ml
A PARTIR DE	31/03/00	91 DPO >>>>	SUSPENDER PREDNISONA.

Anexo E - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 244/08

Interessado(a): Prof. Marcelo Dias Sanches
Departamento de Cirurgia
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 04 de agosto de 2008, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Correlação entre os níveis de marcadores de resposta inflamatória e evolução pós operatória de transplante hepática"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

Anexo F - Apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG)



Relatório Final do Projeto

Processo Nº: **APQ-02106-09**

Identificação do Coordenador

Nome Completo

MARCELO DIAS SANCHES

Data de Nascimento

13/07/1964

Telefone de Contato

(31)3282-1531

Telefone Celular

(31)9976-4138

Endereço Residencial

Rua Caraça 211/1301

Bairro

Serra

Maior Titulação

Doutor

Instituição

UFMG

Banco

001 - BANCO DO BRASIL S A

Agência

18791

Endereço eletrônico do Currículo Lattes

<http://lattes.cnpq.br/9039210559942842>

Dados do Coordenador

Instituição de Trabalho Atual

Universidade Federal de Minas Gerais

Data de Admissão

01/03/2002

Área de Conhecimento

MEDICINA

Dados do Projeto

Título do Projeto

Correlação entre os níveis séricos de marcadores de resposta inflamatória e evolução pós operatória de transplante hepático

Área do Conhecimento

MEDICINA

Sub-Área do Conhecimento

CIRURGIA

Data de Início Prevista

01/05/2009

Data de Início Realizada

13/11/2009

Valor Outorgado

R\$ 28.889,70

Valor destinado a custeio

R\$ 18.255,77

Entidade Proponente

Universidade Federal de Minas Gerais

Unidade / Departamento / Setor

Faculdade de Medicina / Departamento de Cirurgia

Coordenador

MARCELO DIAS SANCHES

CPF

500.767.106-10

Município (Nasc.)

BELO HORIZONTE

Telefone Comercial

(31)3273-2251

E-mail

msanches@ufmg.br

CEP

30220260

Município

BELO HORIZONTE

Nome do Curso

Pós-graduação em Cirurgia

Ano

2001

Número da Conta

9075054

PIS/PASEP

Regime de Trabalho

Dedicação Exclusiva

Data de Término Prevista

30/04/2011

Data de Término Realizada

12/11/2011

Valor Executado

R\$ 30.453,08

Valor destinado a capital

R\$ 12.197,31

Anexo G – Protocolo transfusional no intraoperatório do transplante hepático

Concentrado de Hemácias:

Manter hemoglobina entre 8,5 e 10 g/dL, o que corresponde a um hematócrito de 25 a 30%.

Pacientes com menos de 30 kg – 10 mL do conc de Hm/kg

Concentrado de Plaquetas:

Dar preferência ao uso de plaquetas colhidas por aférese

Transfundir 1 unidade para cada 7 a 10 kg de peso do paciente ou uma plaqueta por aférese.

Parâmetros:

Plaquetometria < 50.000

Amplitude máxima < 30 mm (na ausência de fibrinólise ou heparina)

Se amplitude máxima entre 30 e 40 mm usar DDAVP na dose de 0,3 mcg/kg EV diluído em soro fisiológico (50 mL) correr em 30 minutos.

Plasma Fresco Congelado: Transfundir 20 mL de PFC para cada kg de peso do paciente

Parâmetros: Tempo de Reação (R) > 35 mm (na ausência de fibrinólise ou heparina)

Pode-se testar a necessidade do PFC correndo em um dos canais do TEG o sangue total 0,33 mL com 0,03 mL de PFC.

Crioprecipitado:

Transfundir 1 unidade para cada 4 a 7 kg de peso do paciente Parâmetros:

Ângulo (α) < 25o com amplitude máxima >30 mm (na ausência de fibrinólise ou heparina)