**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

BERNARDO DAVID SABAT

**Associação entre a colorimetria da superfície
do fígado e a intensidade da esteatose.**

**Estudo experimental em ratos submetidos
a dieta esteatogênica**

Ribeirão Preto

2017

BERNARDO DAVID SABAT

**Associação entre a colorimetria da superfície do fígado
e a intensidade da esteatose.**

**Estudo experimental em ratos submetidos
a dieta esteatogênica**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Clínica Cirúrgica da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.

Área de Concentração: Cirurgia

Orientador: Prof. Dr Orlando de Castro e Silva Jr.

**Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca
da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD).**

Ribeirão Preto

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Sabat, Bernardo David.

Associação entre a colorimetria da superfície do fígado e a intensidade da esteatose. Estudo experimental em ratos submetidos a dieta esteatogênica. Ribeirão Preto, 2017.

112 p x ilust: 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. – Departamento de Cirurgia e Anatomia. Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Castro e Silva Jr., Orlando.

1.Colorimetria. 2.Esteatose hepática. 3.Enxerto hepático. 4.Transplante de fígado.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome:, Bernardo David Sabat.

Título: Associação entre a colorimetria da superfície do fígado e a intensidade da esteatose. Estudo experimental em ratos submetidos a dieta esteatogênica

Orientador: Prof. Dr. Orlando de Castro e Silva Jr

Tese apresentada em 03 de Julho de 2017 ao
Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em Cirurgia.

Aprovada em

Prof. Dr. Orlando de Castro e Silva Junior

--	--

Julgamento

Assinatura

Prof. Dr. Ênio David Mente

--	--

Julgamento

Assinatura

Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Junior

--	--

Julgamento

Assinatura

Prof. Dr. Luiz Augusto Carneiro D'Albuquerque

--	--

Julgamento

Assinatura

Prof. Dra. Ilka de Fatima Santana Ferreira Boin

--	--

Julgamento

Assinatura

Dedico este trabalho...

A Edilene, pelo estímulo e cobrança constantes.

E aos filhos, Fellipe, Bernardo e Cecília.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof Dr Orlando de Castro e Silva Jr,
Pela amizade acolhedora, pela receptividade e orientação ao projeto de pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Edeones Tenório França, coordenador do Biotério José Paulino Ventura Ramos do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, pelo fornecimento dos animais para a experimentação.

À Equipe do Núcleo de Cirurgia Experimental do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE: Prof. Dr. Renato Dornelas Câmara Neto e Prof. Dr. Antônio Roberto de Barros Coelho, coordenadores; Dra. Adriana Ferreira Cruz, Médica Veterinária; Sr. Miguel Manoel da Silva, Sra. Nívea Maria de Vasconcelos, Sr. Manoel Joaquim de Santana, Sr. Severino Joaquim de Santana, Sr. Jose Marinho de Oliveira, Sra. Maria Izabel do Nascimento e Sr. Antônio de Lira, servidores técnicos administrativos, pela participação na manutenção dos animais e nos procedimentos cirúrgicos experimentais.

Ao Dr. Petrônio Correa Sodré responsável pela Delegacia Regional do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento pela autorização para a importação da dieta dos animais dos Estados Unidos da América.

À Equipe do Centro Integrado de Anatomia Patológica - CIAP do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco, Prof.^a Dra. Maria da Conceição de Aguiar Lyra e Profa. Dra. Luciana Gurgel Trindade Henrique, diretoras e Sra. Tereza Cristina da Silva, histotécnica, pelo processamento das amostras de tecido hepático e elaboração das lâminas histológicas.

À equipe do Laboratório Central do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco, Dra. Maria Ivonete Figueiredo Wanderlei, gerente e Sra. Sônia Arcanjo, Sra. Juliana Alexandrina, Sra. Ednalva Oliveira, Sr. José Holanda, Sra. Raimunda Félix, Sra. Kaliny Benício e Sr. Legivaldo Coutinho, bioquímicos, biólogos e técnicos, pela realização dos exames hematológicos e bioquímicos.

À Equipe do Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos LEAL da Universidade Federal de Pernambuco, Profa. Margarida Angélica da Silva Vasconcelos, Profa Ivonete Barbosa Guerra, Profa. Edileide Maria Freitas Pires e Profa. Alda Verônica Souza Livera, coordenadoras e os Sr. Sebastião Camilo de Melo Filho e Sr. Alexandre Ramos de Oliveira, técnicos, pela realização dos procedimentos de extração e quantificação do percentual de gordura nos fígados dos animais.

Ao Prof. Dr. Vital Maria da Costa Lira e à Profa. Dra. Norma Thomé Juca, do Estúdio de Patologia Cirúrgica do Recife, pela leitura das lâminas e diagnóstico histológico dos graus de esteatose hepática.

Ao Prof. Manoel Raimundo de Sena Junior do Departamento de Estatística da Universidade Federal de Pernambuco, pelo planejamento da análise estatística.

Ao Prof Ulisses Ramos Montarroyos da Disciplina de Bioestatística do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Pernambuco pela revisão da análise estatística.

Aos colegas da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo da Faculdade de Ciências Médicas e do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de

Pernambuco, Profa. Fernanda Maria Fernandez Pereira, Prof. Gustavo Lopes de Carvalho, Prof. Joao Evangelista Neto, Prof. Luiz Eduardo Correia Miranda, Prof. Pedro Cavalcanti De Albuquerque, Dr. Gilberto Fernandes Silva Abreu, Dr. Jacinto Ferreira Lima Filho e Dr. Walter Germano França pela amizade, solidariedade e compreensão.

Ao Prof. Luiz Eduardo pelo entusiasmo e competência no auxílio à revisão do texto.

Ao Adv Ítalo Cisneiros e à Eng Cecília Leite pela disponibilidade e colaboração imprescindíveis.

À Sra Sue Diseker pelo competente trabalho de correção e revisão da tradução do Resumo para a língua inglesa.

Ao Eng José Henrique pelo apoio e zelo no transporte da dieta hiperlipídica dos USA, onde foi produzida, até o Brasil.

A Sra. Juliana Pischiotin da Silva Moraes, Secretária do Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP-USP, pelo encaminhamento e resolução das nossas pendências.

RESUMO

SABAT, BD. Associação entre a colorimetria da superfície do fígado e a intensidade da esteatose. Estudo experimental em ratos submetidos a dieta esteatogênica. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Os enxertos hepáticos com esteatose apresentam risco aumentado para a disfunção e o não funcionamento primário. Entretanto, considerando o permanente desequilíbrio entre a oferta e a demanda de enxertos, justifica-se o uso de fígados esteatóticos com um risco aceitável. O padrão ouro para o diagnóstico do grau da esteatose hepática, na prática clínica, é o exame histológico. Entretanto, no cenário dos transplantes, a estimativa do grau de esteatose do enxerto hepático depende do exame macroscópico. Nesse procedimento a leitura da cor é realizada de forma subjetiva e a força da associação cor-esteatose não é conhecida. Considerando esses aspectos, a presente pesquisa teve como objetivo verificar a associação entre a cor do fígado e a intensidade da esteatose hepática, aferindo a cor do fígado, de forma precisa com um colorímetro e quantificando a esteatose com dois exames considerados de referência. **Método:** Ratos wistar, machos, foram divididos em quatro grupos de quinze animais. Os animais do grupo controle receberam dieta padrão. Os outros três grupos receberam dieta esteatogênica durante, respectivamente, dois, quatro e seis dias. Os ratos foram submetidos à laparotomia, biópsia hepática (pré e pós-perfusão do fígado) para realizar o exame histológico, colorimetria no

padrão RGB (pré e pós-perfusão do fígado), conversão da cor, do padrão RGB, para o padrão CINZA, coleta de sangue para realizar exames laboratoriais e hepatectomia (para determinar o peso relativo do fígado e a extração da gordura). A análise estatística foi realizada com o pacote de *software* estatístico IBM SPSS Statistics 18, e o valor $p < 0.05$ foi considerado com significado estatístico.

Resultados: Foi observada correlação positiva entre os percentuais de gordura e a intensidade das cores pré perfusão (coeficiente de correlação da cor vermelha 0,874, cor verde 0,747 e cor azul 0,763) e pós-perfusão (coeficiente de correlação da cor vermelha 0,900, cor verde 0,886 e cor azul 0,856). As médias dos valores da colorimetria, pré e pós perfusão, apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$). A acurácia da colorimetria pós perfusão, determinada pela curva ROC, foi de 100% na determinação da presença de esteatose, 96,2% para o grau moderado ou intenso e 80,4% para o grau intenso da esteatose. Foi verificada diferença significativa dos valores da colorimetria ($p < 0,001$) entre as médias dos diversos grupos com exceção entre os grupos concentração de gordura moderada X gordura intensa e entre os grupos graus histológicos da esteatose leve X moderada X intensa. **Conclusões:** a) A cor do fígado, pré e pós perfusão, apresentou correlação forte com a esteatose, de forma positiva e linear; b) A colorimetria, pré e pós perfusão, apresenta a mesma acurácia na identificação da esteatose c) A colorimetria apresentou acurácia perfeita na identificação da presença da esteatose e tendência para classificar, em um mesmo grupo, a esteatose moderada e intensa.

Descritores: 1.Colorimetria, 2.Esteatose hepática, 3.Enxerto hepático,
4. Transplante hepático.

ABSTRACT

SABAT, BD. Association between the colorimetry of the liver surface and the intensity of steatosis. Experimental study in rats subjected to steatogenic diet. 2017. Doctoral Thesis for Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 2017.

Hepatic grafts with steatosis are at increased risk for dysfunction and primary non-functioning. However, considering the permanent imbalance between supply and demand of grafts, the use of specially selected livers with steatosis is justified. The gold standard for the diagnosis of hepatic steatosis in clinical practice is histological examination. However, in the transplant scenario, the estimation of the grade of hepatic graft steatosis depends on macroscopic examination. In this procedure the color reading is carried out subjectively and the strength of the association of color-steatosis is not known. Considering these aspects, the present study aimed to verify the association between liver color and liver steatosis intensity, accurately assessing the color of the liver with a colorimeter and quantifying steatosis with two exams considered as reference.

Method: Male wistar rats were divided into four groups of fifteen animals. The animals in the control group received a standard diet. The other three groups received a steatogenic diet during, respectively, two, four and six days. Rats were submitted to laparotomy, liver biopsy (pre and post-perfusion of the liver) for conventional histological examination, colorimetry in the RGB pattern (pre and

post-perfusion of the liver), color conversion from the RGB standard to the GRAY standard, Blood collection for laboratory tests and hepatectomy (to determine relative liver weight and fat extraction). Statistical analysis was performed with the statistical software package SPSS Statistics 18, and p value <0.05 was considered statistically significant. **Results:** A positive correlation was observed between fat percentages and preperfusion color intensity (red color correlation coefficient 0.874, green color 0.747 and blue color 0.763) and postperfusion (correlation coefficient of red color 0.900, green color 0.866 and blue color 0.856). The mean values of the colorimetry, pre- and post-perfusion, presented a statistically significant difference (p <0.001). The accuracy of the post-perfusion colorimetry, determined by the ROC curve, was 100% in the determination of the presence of steatosis, 96.2% for the moderate or intense degree and 80.4% for the intense degree of steatosis. There was a significant difference (p <0.001) between the means of the different groups except for the groups of moderate fat X intense fat concentration and between the histological grades groups of mild X intense moderate X steatosis. **Conclusions:** a) The color of the liver, pre and post perfusion, showed a strong correlation with steatosis, in a positive and linear way; B) Colorimetry, pre- and post-perfusion, shows the same accuracy in the identification of steatosis. C) Colorimetry showed perfect accuracy in the presence of steatosis and a tendency to classify moderate and severe steatosis in the same group.

Key words: colorimetry, fatty liver, liver graft, liver transplantation.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	OBJETIVO	28
3.	MÉTODO	30
3.1.	Caracterização da pesquisa	32
3.2.	Procedimentos éticos	32
3.3.	Locais de realização dos procedimentos e dos exames	32
3.4.	Crítérios de inclusão dos animais	33
3.5.	Crítérios de exclusão dos animais	33
3.6.	Manutenção dos animais no biotério	34
3.7.	Identificação dos animais	35
3.8.	Modelo experimental de indução da esteatose hepática	35
3.9.	Procedimento cirúrgico experimental	36
3.10.	Peso relativo dos fígados	38
3.11.	Exames sanguíneos bioquímicos e hematológicos	38
3.12.	Extração de gordura dos fígados	39
3.13.	Exame histológico das biópsias hepáticas	39
3.14.	Colorimetria da superfície dos fígados no padrão RGB	40
3.15.	Conversão da cor do padrão RGB para o padrão CINZA	42
3.16.	Eutanásia e disposição final dos resíduos biológicos	43
3.17.	Desenho da pesquisa	43
3.18.	Análise estatística	46
4.	RESULTADOS	48

4.1.	Do peso relativo dos fígados	49
4.2.	Dos exames laboratoriais	49
4.3.	Da indução da esteatose hepática	51
4.4.	Da eficiência da extração de gordura	52
4.5.	Da eficiência do exame histológico	53
4.6.	Da concordância entre extração de gordura e exame histológico.	54
4.7.	Da colorimetria no padrão de cor RGB	55
4.8.	Da colorimetria no padrão de cor CINZA	58
4.9.	Da correlação entre as variáveis de interesse	65
5.	DISCUSSÃO	66
5.1.	Dos exames laboratoriais	69
5.2.	Da indução da esteatose hepática	70
5.3.	Do peso relativo dos fígados	72
5.4.	Da eficiência da extração de gordura	72
5.5.	Da eficiência do exame histológico	74
5.6.	Da concordância entre extração de gordura e exame histológico.	75
5.7.	Da colorimetria no padrão de cor RGB	76
5.8.	Da colorimetria no padrão de cor CINZA	77
5.9.	Da correlação entre as variáveis de interesse	79
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
7.	CONCLUSÃO	84
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
9.	APÊNDICE	97
10.	ANEXO	110

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Desde os relatos das primeiras séries de transplantes hepáticos (Starzl et al., 1963) ficou evidente a relação entre a qualidade do enxerto e os resultados do procedimento, a curto e a longo prazo (Feng et al., 2006; Said, 2013). Essa realidade impulsionou a realização de estudos visando identificar variáveis mensuráveis, relacionadas com a qualidade dos enxertos, que permitissem prever os desfechos dos transplantes (Makowka et al., 1987). Dentro dessa linha de pesquisa, coube a Portman e Wight de Cambridge (citado por Selzner, Clavien, 2001) e a Todo et al. (1989) de Pittsburg, respectivamente em 1987 e 1989, fazerem as primeiras comunicações associando a esteatose à ocorrência do não funcionamento primário do enxerto hepático.

O acúmulo de lipídios no interior dos hepatócitos, como o colesterol, os fosfoglicerídeos e os triglicerídeos (esse o mais frequente), quando em proporção igual ou superior a 5% do peso do fígado, caracteriza a esteatose hepática (Brunt et al., 1999; Imber et al., 2002; Kleiner et al., 2005).

A esteatose é a doença hepática crônica mais comum no mundo ocidental (Vetelainen et al., 2007). Imber et al., em 2002, relacionaram quatro mecanismos envolvidos no acúmulo de lipídios no fígado: (1) entrada excessiva de ácidos graxos livres no fígado, (2) Síntese aumentada de ácidos graxos com redução na oxidação,

(3) Aumento da esterificação de ácidos graxos em triglicéridos provocada por aumento da alfa-glicerofosfato e (4) Diminuição da síntese de lipoproteínas de muito baixa densidade.

No início dos anos 1990, foram publicados quatro grandes estudos avaliando o risco do acúmulo de lipídeos no enxerto hepático (D'Alessandro et al., 1991; Adam et al., 1991; Markin et al., 1993; e Ploeg et al., 1993). Os resultados desses estudos estabeleceram parâmetros históricos para o uso dos enxertos com esteatose: a presença de esteatose moderada foi considerada como contraindicação relativa e a esteatose intensa foi rotulada como inadequada para os transplantes.

A esteatose é uma das causas mais importantes relacionadas com a disfunção do enxerto (Verran et al., 2003; Durand et al., 2008). É considerada como fator de risco independente para a ausência de função do enxerto, após o transplante (Li et al., 2011; Deroose et al., 2011). A intensidade do comprometimento do enxerto tem relação direta com o grau de esteatose (Trevisani et al., 1996; D'Alessandro et al., 2010). O acúmulo de lipídios em concentração inferior a 30% tem impacto mínimo sobre a função do enxerto, desde que outros fatores de risco não estejam presentes, como tempo de isquemia alargado e idade do doador acima de 50 anos (Trevisani et al., 1996; Selzner et al., 2000; Imber et al., 2002).

A prevalência de enxertos com esteatose alcança até 30% dos doadores de órgãos falecidos (D'Alessandro, et al., 1991; Markin et al., 1993; Marsman et al., 1996; Verran et al., 2003). O aumento da incidência, no mundo ocidental, de diabetes

mellitus, de obesidade e de alcoolismo sinaliza para aumento do número de doadores com esteatose (Rey et al., 2009; .Yerszis et al., 2013; Brunt et al., 2010).

De qualquer forma os doadores apresentam uma prevalência de esteatose superior à média da população. As causas desse fenômeno ainda são motivo de especulação, sendo certo, entretanto, que o doador em morte encefálica apresenta predisposição para o desenvolvimento de esteatose, independentemente da existência de patologia associada (Markin et al., 1993).

Koneru et al. (2002), relacionaram diversas anormalidades que poderiam justificar a susceptibilidade do enxerto esteatótico à preservação hipotérmica: (1) Aumento de volume dos vacúolos, durante o resfriamento e o congelamento, provocando rotura dos hepatócitos durante o reaquecimento; (2) Alteração na peroxidação lipídica; (3) Lesão dos sinusoides e aumento da adesão das células sanguíneas e (4) Aumento da ativação das células de Kupffer.

Essas alterações convergem para provocar aumento da resistência sinusoidal, depleção das fontes de energia e deterioração das funções mitocondriais, com repercussão mais evidente no fenômeno da isquemia-perfusão (Imber et al., 2002; Li et al., 2011; 2002; Deroose et al., 2011; Selzner et al., 2000; Fukumori et al., 1997).

As dimensões dos vacúolos permitem classificar a esteatose como macrovacuolar e microvacuolar. Na forma macrovacuolar, os vacúolos ocupam a maior parte do citoplasma e são grandes o suficiente para deslocar o núcleo do hepatócito. Na forma microvacuolar, mais de 90% dos vacúolos são pequenos e ocupam espaço no

citoplasma sem deslocar o núcleo. Quando estão presentes as duas situações, a esteatose é chamada de mista (Brunt et al., 1999; Kleiner et al., 2005).

A forma macrovacuolar é a mais comum em humanos e, geralmente, acompanha uma condição crônica como o alcoolismo, a diabetes, a obesidade e alguns tipos de dislipidemias (Ploeg et al., 1993; Angelico et al., 2005). Nesses casos, o acúmulo de lipídeos nos hepatócitos está associado ao aumento na entrada de ácidos graxos e na síntese de triglicerídeos (Imber et al., 2002).

Entre as duas formas de esteatose, a macrovacuolar é a que, frequentemente, está associada à disfunção do enxerto. Enxertos, apresentando mais de 60% dos hepatócitos com esteatose macrovacuolar, apresentam alta probabilidade de desenvolverem disfunções graves (Ploeg et al., 1993; Marsman et al., 1996).

A esteatose microvacuolar representa resposta à agressão aguda viral, tóxica ou nutricional e o acúmulo de lipídeos está relacionado à dificuldade nos mecanismos de excreção dos lipídios (Imber et al., 2002).

A esteatose microvacuolar é menos frequentemente relacionada à lesão de hipotermia e preservação (Fishbein et al., 1997; McCormack et al., 2007), apesar de relatos de resultados negativos associados a enxertos com esteatose microvacuolar (Yoong et al., 1999).

A expansão, dos programas de transplantes de fígado, como consequência, entre outros aspectos, da ampliação das indicações, da evolução da técnica cirúrgico-

anestésica, dos avanços terapêuticos e da qualidade da assistência pós operatória (Said, 2013) contribuiu para agravar o déficit de enxertos (Durand et al., 2008).

Dessa forma, a comunidade transplantadora foi confrontada com um desafio: como desenvolver estratégias para diminuir a diferença entre a demanda e a oferta de órgãos? (Trevisani et al., 1996; Chui et al., 2000; Nocito et al., 2006; McCormack et al., 2007; Deroose et al., 2011; Westerkamp et al., 2014). O uso dos enxertos esteatóticos, especialmente selecionados, foi uma das respostas para enfrentar esse desafio (Marsman et al., 1996; Bawa et al., 2000; Nocito et al., 2006).

Paradoxalmente, mesmo com a oferta insuficiente de enxertos, órgãos considerados subóticos são descartados (Avolio et al., 2009; Said 2013; Feng et al., 2014), sendo a esteatose uma das causas mais frequentes (Koneru et al., 2002) representando, em algumas publicações, até 25% do total de órgãos recusados para transplante (Fiorini et al., 2004).

Percebeu-se, entretanto, que recursos escassos, como órgãos humanos, deveriam ser melhor aproveitados (Imber et al., 2002) e que os resultados globais negativos com enxertos esteatóticos, não implicam em rejeitar, sumariamente, todos os fígados esteatóticos (Marsman et al., 1996; Trevisani et al., 1996).

Finalmente, com a ampliação do uso de doadores subóticos (McComarck et al., 2011) ficou evidente que esses enxertos poderiam ser aceitos e transplantados, com segurança e com resultados satisfatórios, desde que identificados e controlados os

fatores de risco (Trevisani et al., 1996; Chavin et al., 2013), entre os quais o grau de esteatose é um dos mais importantes (Vetelainen et al., 2007; Cucchetti et al., 2009).

Entretanto, o uso de enxertos com esteatose acima de 30% ainda permanece como desafio, não só devido ao risco aumentado de disfunção (Ploeg et al., 1993), mas, principalmente, considerando que, no cenário dos transplantes, o método para avaliar a esteatose permanece impreciso e com relatos inconsistentes (Said, 2013), o que contribui para o descarte de enxertos, de outra forma, aceitáveis e, o que pode ser mais nocivo, o uso de enxertos com esteatose acima do limite aceitável. Justificando o aforismo: saber quando transplantar um fígado esteatótico é quase tão importante quanto saber quando não fazê-lo (Hessheimer et al., 2009)

Dessa forma, a chave para o uso do enxerto esteatótico, além da exclusão de outros fatores de agravo, é definir precisamente a magnitude do risco representado pela esteatose, o que, na prática, significa determinar precisamente a intensidade da esteatose (Trevisani et al., 1996; McCormack et al., 2011).

Exames laboratoriais disponíveis nos cenários de transplante, como as dosagens bioquímicas e as provas de função hepática, são imprecisos para classificar os graus de esteatose hepática, inclusive nos casos avançados (Imber et al., 2002).

Apesar da disponibilidade de outros métodos não invasivos, como a antropometria, os biomarcadores e os algoritmos diagnósticos, a sua aplicação na quantificação da esteatose, apresenta resultados não conclusivos.

Por outro lado, exames de imagens, como a ultrassonografia, a tomografia computadorizada e a ressonância magnética apresentam dificuldades logísticas, estruturais e econômicas que impedem a sua utilização na rotina de avaliação do enxerto hepático (Adani et al., 2006; Schwenzer et al., 2009; Hernaez et al., 2011; Raptis et al., 2012).

Na prática clínica, o método diagnóstico de referência, para a avaliação da esteatose, é o exame histológico convencional, com inclusão do tecido em parafina (Angulo et al., 2002; Hołowko et al., 2014). Entretanto, o tempo dispendido no processamento das lâminas histológicas contraindica a adoção desse método, na avaliação do enxerto hepático (Nocito et al., 2006; Cameron et al., 2006; Cucchetti et al., 2009). Nessas condições, o exame histológico com o preparo da lâmina por congelamento, é o método de escolha.

Entretanto, a técnica histológica por congelamento também é motivo de ressalvas, por ser um método indutor de artefatos nas amostras de tecido, ter caráter subjetivo, apresentar variações interobservador e intraobservador, e subestimar os valores da esteatose macrovesicular (Selzner et al, 2001; Lo et al., 2008).

Dessa forma, independente da região e dos recursos disponíveis, o exame macroscópico do fígado, realizado durante a cirurgia de remoção do órgão, permanece como imprescindível e decisivo na avaliação da qualidade do enxerto e na decisão de utiliza-lo para o transplante (Rey et al., 2009).

A inspeção visual do fígado, como método diagnóstico do grau de esteatose, está subordinada à interpretação da força da associação entre a cor do fígado e a intensidade da esteatose hepática (Marsman et al., 1996; Cunha et al., 2004; Cucchetti et al., 2009).

Por sua vez, essa percepção empírica, que associa a alteração da cor do fígado com o grau de esteatose, é apoiada na evidência de que as propriedades físicas, químicas e funcionais do fígado sofrem a interferência do acúmulo de gordura nos hepatócitos (Burt, 2001).

Na literatura, encontram-se inúmeros estudos analisando a interferência da esteatose nas propriedades funcionais (biológicas) dos enxertos hepáticos, como a resposta do enxerto à preservação hipotérmica e os agravos resultantes do fenômeno da isquemia-reperfusão (Farrel et al., 2008; Fukumori et al., 1999; Selzner et al., 2000). Uma revisão recente encontrou 1314 trabalhos, exclusivamente experimentais, estudando a relação da esteatose com a lesão de isquemia-reperfusão (Chu et al., 2015).

Por outro lado, são escassos os estudos avaliando a interferência do acúmulo de gordura nos hepatócitos sobre as características físicas do fígado, como a cor, o volume, a densidade, a textura da cápsula, a dureza, a elasticidade, a condutibilidade elétrica e a luminescência (Randeberg et al., 2003; Bottiroli, Croce, 2009; 2009; Yersiz et al., 2013).

Um dos primeiros estudos avaliando a cor do fígado como parâmetro para o diagnóstico da esteatose foi relatado por Bawa et al., (2000). Esses autores introduziram uma escala de doze cores, com tons crescentes de amarelo, representando graus diferentes de esteatose. O desenho do estudo não avaliou o grau da associação entre a cor e a intensidade da esteatose, todavia, conseguiu diminuir a subjetividade na percepção da cor e a dependência do resultado da avaliação à experiência do observador.

Em 2007, Dominguez-Fernandez et al. identificaram, em uma série de 402 cirurgias de remoção de órgãos para transplante, o descarte de 8 enxertos hepáticos devido a falha na avaliação do cirurgião. Esses autores concluíram que a avaliação intraoperatória é imprecisa e lamentaram a ausência de estudos avaliando a acurácia do diagnóstico intraoperatório das doenças hepáticas crônicas, como a esteatose.

Rey et al., (2009) estudaram, em 36 fígados descartados para transplante, dados clínicos, laboratoriais, macroscópicos e histológicos, com destaque para o diagnóstico da esteatose. Estes autores verificaram que 16,7% (6/36) dos fígados foram rejeitados erroneamente pelos cirurgiões.

Em 2013, Martins et al. realizaram um estudo retrospectivo com o objetivo de avaliar a precisão do cirurgião no diagnóstico intraoperatório do grau de esteatose em 117 enxertos hepáticos, pré e pós perfusão. Em nove enxertos (8%), o exame histológico apresentou resultado discordante da avaliação do cirurgião. Em quatro desses casos, a avaliação do cirurgião subestimou a esteatose e o uso dos fígados foi reconsiderado. Nos outros cinco casos, o cirurgião superestimou a esteatose e os

fígados não foram aproveitados. Apesar dos autores considerarem o percentual de desconformidades baixo, o preço pago por esses desacertos é significativo quando enxertos são descartados ou transplantados indevidamente, em uma conjuntura de desequilíbrio entre a oferta e demanda de órgãos para transplante.

Finalmente, Yersiz et al., em 2013, estudaram a capacidade do cirurgião em prever os graus da esteatose hepática e a qualidade do enxerto, em 201 fígados de doadores adultos. Cada órgão foi avaliado de acordo com o grau de amarelamento (normal, leve, moderado ou grave), a dureza do parênquima (muito macia, normal, leve, moderada e intensa), o aspecto das bordas (normal ou romba) e os riscos ou grafismos na cápsula (presentes ou ausentes). Concluíram que as características da textura do fígado (amarelamento, bordas redondas e ausência de marcas capsulares) foram mais úteis na identificação de órgãos com esteatose macrovacuolar do que a percepção do cirurgião. Tratando-se de um estudo prospectivo e duplo-cego, essa conclusão adquire um nível de evidência relevante.

O exame macroscópico do fígado, nesse contexto, inclui não somente a inspeção e a palpação do órgão, mas prioritariamente, como mencionado, a verificação da cor do órgão como parâmetro para estimar o grau de esteatose (Rey et al., 2009; Yersiz et al., 2013).

Apesar da cor representar o atributo chave para a estimativa da esteatose, a sua avaliação realizada de forma subjetiva incorpora um viés cognitivo que compromete a precisão do método.

Além desse aspecto, a falta de dados precisos sobre as características da relação entre a cor do fígado e a esteatose, representa uma barreira para a determinação, com precisão, do limite da intensidade da esteatose, compatível com o uso dos enxertos esteatóticos (McLaughlin et al., 2010)

Considerando esses aspectos, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar a associação entre a cor do fígado e a intensidade da esteatose hepática aferindo a cor do fígado com um colorímetro de forma a eliminar a subjetividade, presente na avaliação, quando é usada a inspeção visual do fígado.

2. OBJETIVO

2. - OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi avaliar as características da associação entre a cor da superfície do fígado e a intensidade da esteatose hepática, em ratos submetidos à dieta esteatogênica.

3 - MÉTODO

3. MÉTODO

- 3.1 - Caracterização da pesquisa
- 3.2 - Procedimentos éticos
- 3.3 - Locais de realização dos procedimentos e dos exames
- 3.4 - Critérios de inclusão dos animais
- 3.5 - Critérios de exclusão dos animais
- 3.6 - Manutenção dos animais no biotério
- 3.7 - Identificação dos animais
- 3.8 - Modelo experimental de indução da esteatose hepática
- 3.9 - Procedimento cirúrgico experimental
- 3.10 - Peso relativo dos fígados
- 3.11 - Exames sanguíneos bioquímicos e hematológicos
- 3.12 - Extração de gordura dos fígados
- 3.13- Exame histológico das biópsias hepáticas
- 3.14 - Colorimetria da superfície dos fígados no padrão RGB
- 3.15 - Conversão da cor no padrão RGB para o padrão CINZA
- 3.16 - Eutanásia e disposição final dos resíduos biológicos
- 3.17 - Desenho da pesquisa
- 3.18 - Análise Estatística

3. MÉTODO

3.01 - Caracterização da pesquisa

Trata-se de estudo experimental com o objetivo de avaliar a associação entre a cor da superfície do fígado e a quantidade de gordura acumulada nos hepatócitos.

3.02 - Procedimentos éticos

A pesquisa obteve o parecer favorável da Comissão Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Pernambuco (parecer 26/2006), cujos princípios estão de acordo com as normas éticas adotadas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

3.03 - Locais de realização dos procedimentos e dos exames

Os animais para a experimentação foram supridos pelo biotério José Paulino Ventura Ramos do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco.

A manutenção dos animais e os procedimentos cirúrgicos experimentais foram realizados na sala de microcirurgia (Apêndice F Figura 1) do Núcleo de Cirurgia Experimental do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco onde a pesquisa ficou registrada com o número 334 (Souza et al., 2008).

O processamento das amostras de tecido hepático e as lâminas histológicas foram realizadas no Centro Integrado de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco.

Os exames bioquímicos e hematológicos, no sangue dos animais, foram realizados no Laboratório Central do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco.

A extração e a determinação da concentração da gordura dos fígados, foram realizadas no Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (LEAL) do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco.

A leitura das lâminas histológicas, para o diagnóstico dos graus de esteatose hepática, ocorreram no Estúdio de Patologia Cirúrgica do Recife.

3.04 - Critérios de inclusão dos animais

Foram incluídos no experimento ratos machos (*Rattus norvegicus*), de pelagem albina, raça Wistar, com peso no dia do procedimento cirúrgico entre 333 e 630 gramas, com peso médio de 428 gramas e idade acima de 16 semanas.

3.05 - Critérios de exclusão dos animais

Foram definidos, como critérios para a exclusão dos animais, a presença de anormalidades no fígado, doenças intraperitoneais e distúrbios cardíacos e

respiratórios, que pudessem alterar as características físicas do fígado ou interferir na realização dos procedimentos experimentais. No desenvolvimento do trabalho, não foi identificada nenhuma dessas anormalidades que pudessem implicar em exclusão do animal

3.06 - Manutenção dos animais no biotério

Os animais foram mantidos, em acordo com as diretrizes da Comissão de Ética em Experimentação em Animais da UFPE, em biotério climatizado, em gaiolas coletivas, com o máximo de quatro animais, à temperatura entre 22 e 24°C, por períodos de 12 horas, seguidos de exaustão forçada por 12 horas, com ciclo claro-escuro de 12 horas controlados por temporizador e alimentados com água e ração fornecidas *ad libitum*.

Foi fornecido, aos animais, dieta industrializada, de aspecto extrusado com forma cilíndrica (diâmetro entre 13 mm e 15 mm) da marca Labina, produzida pela Agribands Purina do Brasil Ltda., com sede na Av. Professor Benedito Montenegro S/Nº, Paulínia-SP Bairro Betel - CEP 13140-000, com a seguinte composição: 69% de carboidrato, 18% de proteína, 4% de fibras, 3% de lipídio, 4% de sais minerais, 1% de colina e 1% de vitaminas.

Os ratos foram divididos em grupos de 15 animais. O grupo controle foi identificado com Grupo dieta 0 (zero) ou D0 e recebeu, exclusivamente, dieta padrão, não esteatogênica.

3.07 - Identificação dos animais

A identificação dos animais considerou o tipo de dieta e a ordem de realização do procedimento cirurgico experimental. Dessa forma o primeiro rato (R) do grupo Dieta (D) Zero (o grupo controle) foi identificado como D0 R01(Dieta zero Rato um) e o ultimo como D0 R15 (Dieta zero rato quinze). Nos grupos experimento os animais foram identificados como: grupo dieta 2 dias, D2 R01 a D2R15; grupo dieta 4 dias, D4R01 a D4R15 e grupo dieta 6 dias D6 R01 a D6 R15.

3.08 - Modelo experimental de indução da esteatose hepática

A dieta esteatogênica, identificada como Dieta # 18074, foi derivada da Dieta AIN 93 (Reeves et al., 1993) com acréscimo de lipídios, colesterol e colato de sódio e deficiência de colina, metionina e carboidratos, com a seguinte composição: 50,0% de dextrose, 18,0% de caseína, 25,0% de lipídio (óleo de milho), 4,0% de sais minerais, 1,0% de colesterol, 0,5% de colato de sódio, 0,2% de colina e 1% de vitaminas (Arnault et al., 2003). Foi preparada na empresa Dyets, Inc. 2508 localizada na Easton Avenue. Bethlehem/Pennsylvania - 18017, USA (Anexo A). A composição e a concentração da dieta foram certificadas pelo United States Department of Agriculture Health (Anexo B)

Os três grupos experimento foram identificados como **dieta 2** (D2), **dieta 4** (D4) e **dieta 6** (D6) conforme o número de dias que permaneceram com a dieta esteatogênica hiperlipídica.

3.09 - Procedimento cirúrgico experimental

Após completar o período da dieta e dentro de intervalo de até 6 horas, os animais foram submetidos à cirurgia sob anestesia com xylasina/ketamina (80/16 mg/kg) associadas à atropina, administradas por via intramuscular, com acompanhamento de médica veterinária (AFC) durante todo o procedimento. O animal foi mantido em respiração espontânea com oxigênio fornecido por máscara facial. Uma vez atingido o plano anestésico foi colocado em decúbito dorsal, sob suporte de acrílico. As patas foram colocadas em extensão e fixadas por meio de fitas ou cordões (Apêndice F, Figura 2).

As paredes abdominal e torácica foram lavadas para remoção de resíduos. Cuidado especial foi dispensado na realização da laparotomia para não lesar órgãos abdominais e, em especial, o diafragma. Após abertura da cavidade peritoneal foi realizada a inspeção visual dos órgãos abdominais, do peritônio e do retroperitônio (Apêndice F, Figura 3).

Em seguida foi identificado o lobo lateral esquerdo do fígado, para a realização da colorimetria pré perfusão. Esse local foi escolhido devido ao tamanho e à facilidade para posicionar o colorímetro (Apêndice F, Figura 4). Em continuidade foi identificado o lobo lateral direito para a realização da biópsia hepática pré-perfusão. Esse lobo foi escolhido devido à localização topográfica permitir realizar, a incisão e a ligadura hemostática, de forma segura (Apêndice F, Figura 5 e 6).

Um fragmento do parênquima foi retirado em forma de cunha e acondicionado em frasco contendo solução de formaldeído a 10%. No local da biopsia foi realizado

hemostasia, por ligadura ancorada, seguida de cauterização. Após a biópsia, foram administradas 500 unidades internacionais de heparina sódica, mediante punção da veia cava, na região abdominal.

Em seguida foi realizada dissecação, reparo e canulação da aorta abdominal (Apendice F, Figura 7). Após a fixação da cânula na aorta, a sua extremidade livre foi aberta dentro de tubo de ensaio, posicionado em plano inferior ao da mesa cirúrgica, para que a gravidade auxiliasse a exsanguinação (Apêndice F, Figura 8). O sangue arterial, assim colhido foi destinado para a realização dos exames bioquímicos e hematológicos.

Concluída a exsanguinação, a sonda intra-aórtica, foi usada, como via única, para a perfusão dos órgãos abdominais com solução fisiológica a 0,9%, resfriada a 4º C. Simultaneamente, solução fisiológica a 0,9% congelada e triturada foi colocada sobre o fígado e as demais vísceras abdominais como parte dos procedimentos destinados à hipotermia dos órgãos abdominais.

A perfusão foi interrompida ao se alcançar o clareamento homogêneo de toda a superfície do fígado. Com o fígado ainda *in situ* foi realizada a colorimetria pós-perfusão, no mesmo local e com a mesma técnica da colorimetria pré-perfusão.

Finalmente, foi realizada a hepatectomia total. O fígado *ex situ*, foi seccionado com diversas incisões paralelas. As superfícies de cortes, assim resultantes, foram examinadas para confirmar a distribuição homogênea da esteatose no parênquima

hepático. Um fragmento do fígado foi selecionado para a realização da biópsia pós perfusão e acondicionado em solução de formol tamponado a 10%.

3.10 - Peso relativo dos fígados

O peso relativo do fígado (g do fígado/100g de peso corporal) foi verificado ao final do experimento, inclusive computando-se o peso dos fragmentos retirados para o exame histológico.

3.11 - Exames sanguíneos bioquímicos e hematológicos

Amostras de sangue arterial foram coletadas em tubo de 6 mL (BD Vacutainer™ SST™ Gel & Clot Activator) e centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos. O soro, assim separado, foi utilizado para a dosagem de alanina aminotransferase – ALT (U/L), aspartato aminotransferase - AST (U/L), bilirrubina total – BT (mg/dL) e gama glutamil transferase – GGT (U/L) no analisador automatizado COBAS INTEGRA 400 (Roche Diagnóstica Ltda.).

Para a realização da contagem de células sanguíneas/mm³ (hemácias e leucócitos), dosagem de hemoglobina - HB (g%) e determinação do valor do hematócrito – HT (%) foi usado o analisador hematológico automático Sysmex XE-2100 (Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Germany).

3.12 - Extração de gordura dos fígados

A extração de gordura do fígado foi realizada no Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, na cidade do Recife, conforme o método descrito, em 1879, por Franz Von Soxhlet (Brum et al., 2009; Instituto Adolfo Lux, 1985).

O fígado, após a remoção cirúrgica, foi acondicionado, a seco, em saco plástico, em condições de hipotermia, com temperatura entre 4 a 8º Celsius, durante 16 a 20 horas, até a manhã seguinte, quando tinha início o procedimento de extração de gordura com a exposição da amostra do tecido hepático à ação de solvente orgânico (éter de petróleo), de forma contínua, durante período mínimo de 4(quatro) e máximo de 6(seis) horas (Apêndice F, Figura 9). Posteriormente, o solvente foi eliminado, por evaporação, e o resíduo pesado em balança analítica de precisão com escala de 0,001. O resultado, correspondeu à concentração de gordura e foi expresso em gramas de gordura por 100 gramas de tecido hepático.

3.13 - Exame histológico das biópsias hepáticas

As amostras de tecido hepático foram fixadas em formaldeído a 10%, submetidas à inclusão em parafina e coradas pela hematoxilina-eosina. As secções foram cortadas em 4 micrômetros. A intensidade da esteatose foi classificada em quatro graus conforme o percentual de hepatócitos com vacúolos de gordura presentes em área de tecido hepático: esteatose ausente (<5%), esteatose leve (5% a 33%), esteatose moderada (>33% a 66%) e esteatose Intensa (>66%) obedecendo à classificação

quantitativa da esteatose usada na prática clínica (Kleiner et al., 2005; Brunt et al., 1999).

A classificação qualitativa considerou a esteatose macrovacuolar quando os vacúolos de gordura deslocavam o núcleo do hepatócito, esteatose microvacuolar quando ocupavam o citoplasma sem deslocar o núcleo e a esteatose mista quando estavam presentes as duas situações (Brunt et al., 1999; Kleiner et al., 2005)

As leituras das lâminas foram realizadas e revisadas por dois patologistas (VMCL e NTJ) com experiência no diagnóstico de patologias hepato-biliares e no estudo de enxertos hepáticos, de forma independente e sem conhecimento da identidade do animal, do tipo de dieta, do resultado da extração de gordura e da colorimetria.

As lâminas com resultados discordantes foram revisadas e receberam diagnóstico final resultante do consenso entre os dois patologistas.

3.14 - Colorimetria da superfície dos fígados no padrão RGB

A colorimetria da superfície dos fígados foi realizada com o colorímetro ColorQA, modelo POCKSPEC COLORQA SERIES 3, fabricado pela POCKETSPEC TECHNOLOGIES INC. 3.225 East 2nd Avenue, Denver, Colorado, 80206-5203, USA.

O aparelho é portátil, operado com bateria recarregável e tem fonte de luz brilhante, tipo led, que ilumina área alvo de 6 mm com as cores primárias vermelha, verde e azul. A superfície da área alvo absorve parte da luz e reflete o restante. A luz refletida

é captada por sensor tricolor com o auxílio de lentes de ampliação. Um microprocessador calcula o nível de vermelho, verde e azul separadamente e o resultado aparece em visor digital

Para cada um dos 3 canais de cor existe escala de leitura com números inteiros de 0 a 255, o que corresponde a 256 números para cada canal. Esse total de números designa o Sistema de Cor RGB (acrônimo das palavras da língua inglesa *red-green-blue*) 256, usado pelo aparelho. Dessa forma cada uma das 3 cores é representada individualmente pela letra maiúscula, R, G ou B. Esse modelo de representação da cor é baseado na síntese aditiva, onde é possível representar uma cor mediante a mescla por adição das três cores de luz primárias (Apendice F, Figura 10).

O colorímetro ColorQA™ foi planejado para medir cores sem a interferência de luz externa. Para impedir a incidência da luz externa, na área alvo da leitura, foi necessário o contato de toda a borda, da extremidade de leitura do instrumento, à superfície do órgão.

Foram realizadas 5 medidas consecutivas, no mesmo ponto, mantendo a pressão de contato apenas o suficiente para impedir a entrada de luz ambiente, cuidando-se, para não pressionar a superfície do órgão, além do necessário, para evitar possíveis traumas ou depressão sobre a superfície do fígado.

Foi considerado como valor da cor do fígado a mediana das 5 leituras. Dessa forma foi preservada a característica do sistema RGB de representar os valores das cores por números inteiros.

Como mencionado anteriormente, a leitura ocorreu em dois momentos. Foi designada como “pre-perfusão” quando realizada imediatamente após a exposição das vísceras abdominais, com os sistemas cárdio vascular e respiratórios intactos, e “pós perfusão” quando realizada ao término da exsanguinação, perfusão dos órgãos abdominais com solução fisiológica a 0,9% e hipotermia de contato com solução fisiológica congelada e triturada reproduzindo as condições da cirurgia de remoção de órgãos, no doador cadáver (Cameron et al., 2005).

3.15 – Conversão da cor no padrão RGB para o padrão CINZA

A forma de representação numérica da cor no sistema RGB, por um conjunto de três números inteiros, acrescenta complexidade aos cálculos matemáticos e à análise estatística. Os sistemas modernos de reconhecimento de imagem contornam esse problema operando em escala de tons cinza, na qual as cores são representadas por um único número (Kanan et al., 2012). Os métodos mais comuns, usados na conversão do Sistema RGB para a escala de tons cinza, são baseados em somas ponderadas dos canais de cor vermelho, verde e azul. No sistema de cor cinza, cada cor é representada por um único número decimal.

Para essa conversão adotou-se o método da Luminância, representado pela letra Y, que usa o algoritmo: $Y = \text{Vermelho} * 0,299 + \text{Verde} * 0,587 + \text{Azul} * 0,114$. (Kanan et al., 2012).

3.16 - Eutanásia e disposição final dos resíduos biológicos

A eutanásia ocorreu como consequência da exsanguinação, realizada durante o procedimento cirúrgico experimental.

Após a conclusão do experimento, a carcaça do animal e outros resíduos biológicos foram acondicionados em saco plástico, hermeticamente fechado e conservado à temperatura de -4°C até a entrega ao Serviço de Coleta de Resíduos Biológicos da Universidade Federal de Pernambuco, que os encaminhava para tratamento térmico sob incineração.

A disposição final dos resíduos biológicos seguiu as diretrizes da Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004, Publicada no DOU de 10/12/2004.

3.17 - Desenho da pesquisa:

Os ratos, preliminarmente, foram divididos em 4 grupos de 15 animais designados de GRUPOS DIETA. O grupo dieta zero (D0) recebeu exclusivamente dieta padrão. Os grupos dieta 2 (D2), dieta 4 (D4) e dieta 6 (D6) receberam dieta esteatogênica durante ,respectivamente 2, 4 e 6 dias (Figura 01).

Os animais foram submetidos à laparotomia com realização de biópsia hepática (pré e pós-perfusão do fígado) para a realização do exame histológico convencional, colorimetria no padrao de cor RGB (pré e pós-perfusão do fígado), coleta de sangue para exames bioquímicos e hematológicos e hepatectomia (para determinação do peso relativo do fígado e a extração e determinação da concentração de gordura).

Posteriormente os valores da leitura da cor no padrao RGB foram transformados para o padrao CINZA.

Com base na concentração da gordura do fígado, os animais foram divididos em quatro grupos (Quadro 1), à semelhança da classificação adotada na patologia e na pratica clínica (Brunt et al., 1999; Kleiner et al., 2005). Os grupos foram designados GRUPOS GORDURA, sendo a primeira classe, constituída de 15 animais, chamada de Grupo Gordura Ausente (concentração de gordura $\leq 5g$). As demais classes passaram a constituir o Grupo Gordura Leve (concentração de gordura >5 a $10g\%$; 10 animais), o Grupo Gordura Moderada (concentração de gordura >10 a $15g\%$; 26 animais) e o Grupo Gordura Intensa (concentração de gordura $> 15g\%$; 9 animais).

A classificação histologica dos graus de esteatose dividiu os animais em 4 grupos, designados GRUPOS ESTEATOSE, com as seguintes características: Grupo Esteatose Ausente ($<5\%$ de hepatócitos com gordura; 27 animais), Grupo Esteatose Leve (5% a 33% de hepatócitos com gordura; 15 animais), Grupo Esteatose Moderada ($>33\%$ a 66% de hepatócitos com gordura; 9 animais) e Grupo Esteatose Intensa ($> 66\%$ de hepatócitos com gordura; 8 animais).

A hipótese testada considerou que a cor da superfície do fígado, aferida objetivamente por um colorímetro triestímulos, apresenta correlação com a gordura acumulada nos hepatócitos, quantificada por exame histológico convencional e por extração de gordura com solvente orgânico.

Figura 1 – Desenho da pesquisa: os animais foram estratificados em quatro GRUPOS DIETA, dieta zero, dieta 2, dieta 4 e dieta 6 (1A). Durante a laparotomia foi realizada colorimetria pré e pós perfusão para determinação da cor no padrão RGB (1B) com posterior conversão para o padrão CINZA (1C), biópsia hepática para determinação dos graus histológicos de esteatose (1D) e extração de gordura do fígado para determinação da concentração de gordura (1E). Conforme os resultados do exame histológico os animais foram estratificados em quatro GRUPOS ESTEATOSE, ausente, leve, moderada e intensa (1F). Conforme a concentração de gordura os animais foram estratificados em quatro GRUPOS GORDURA, ausente, leve, moderada e intensa (1G)

3.18 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram consideradas as seguintes variáveis de interesse: os tipos de dietas, os graus da concentração de gordura no fígado, os graus histológicos da esteatose e a cor da superfície do fígado, pré e pós perfusão, no padrão RGB e no padrão CINZA. O peso relativo do fígado e os exames bioquímicos e hematológicos foram registrados e verificado a variação intergrupos dieta e gordura.

A estatística descritiva compreendeu a coleta dos dados em formulários, a elaboração de tabelas e gráficos e a determinação das médias, do desvio padrão, do valor máximo e do valor mínimo das variáveis.

A estatística analítica verificou a relação entre as variáveis de interesse, medindo a intensidade desta relação. Foi usado o Coeficiente de Correlação Paramétrica de Pearson para verificar a correlação entre a cor dos fígados, pré e pós perfusão, e os tipos de dieta, os graus da concentração de gordura no fígado e os graus histológicos da esteatose hepática.

Para verificar a diferença entre as médias e se os fatores exercem influência em alguma variável dependente foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni.

Com o objetivo de estimar a acurácia da cor do fígado pela colorimetria, em escala de cinza, na classificação dos graus de esteatose do fígado dos animais, foi aplicado uma curva ROC, onde foram estimadas a área sob a curva, as medidas de

sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, com seus respectivos intervalos de confiança ao nível de 95%.

Toda a análise estatística foi realizada com o pacote de *software* estatístico IBM SPSS Statistics 18 e o valor $p < 0.05$ foi considerado com significado estatístico, correspondendo a um nível de confiança de 95% e a um erro de precisão de 5%.

4. RESULTADOS:

- 4.1 Do peso relativos dos fígados
- 4.2 Dos exames laboratoriais
- 4.3 Da indução da esteatose hepática
- 4.4 Da eficiência da extração de gordura
- 4.5 Da eficiência do exame histológico
- 4.6 Da concordância entre extração de gordura e exame histológico.
- 4.7 Da colorimetria no padrão de cor RGB
- 4.8 Da colorimetria no padrão de cor CINZA
- 4.9 Da correlação entre todas as variáveis de interesse

4.1- Do peso relativo dos fígados

As medias dos valores dos pesos relativos dos fígados dos animais (g do fígado/100g de peso corporal), estão representados na Tabela 1 (relacionados com os tipos de dietas) e na Tabela 2 (relacionados com os graus de concentração de gordura).

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a média dos pesos relativos dos grupos: a) dieta padrão e dieta esteatogênica de 6 dias, com valor $p < 0,05$ (Tabela 1), b) gordura ausente x gordura moderada, com valor $p < 0,031$ e c) gordura ausente x gordura intensa com valor $p < 0,020$ (Tabela 2).

4.2 - Dos exames laboratoriais

As medias dos valores dos hematócritos, no momento da cirurgia, apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos dieta padrão e dieta esteatogênica de 4 dias (Tabela 1). Não ocorreu diferença entre os grupos gordura.

As medias dos valores de AST apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos: a) dieta padrão e dieta esteatogênica de 2 dias, b) dieta padrão e dieta esteatogênica de 4 dias (Tabela 1), c) gordura ausente e gordura leve, d) gordura ausente e moderada e e) gordura ausente e intensa (Tabela 2).

Os exames de Hemoglobina, Hemácias, Leucócitos, ALT, BT e GGT não apresentaram diferenças entre os grupos dieta (Tabela 1) e entre os grupos gordura (Tabela 2).

Tabela 1. Medidas do peso relativo do fígado dos animais (g/ 100g de peso corporal) e dos exames laboratoriais, no momento da cirurgia, segundo os tipos de dietas

Medidas	Grupos tipos de dieta (✓ = Comparação entre pares)				p-valor
	Padrão	Esteatogênica 2 dias	Esteatogênica 4 dias	Esteatogênica 6 dias	
Peso relativo do fígado (%) ^a	3,23 ± 0,21 ✓	3,56 ± 0,39	3,60 ± 0,30	3,82 ± 0,61 ✓	0,005 ^e p<0,05 ^e
Hematócrito ^a	47,6 ± 3,4 ✓	44,6 ± 4,3	40,8 ± 10,1 ✓	46,7 ± 2,6	0,022 ^d p<0,05 ^d
Hemoglobina ^a	15,0 ± 1,0	14,8 ± 1,0	13,4 ± 2,7	14,9 ± 0,8	0,054
Hemácias ^a	8,4 ± 0,6	8,3 ± 0,6	7,6 ± 1,7	8,4 ± 0,6	0,079
Leucócitos ^a	6,1 ± 3,7	6,8 ± 3,3	4,6 ± 2,2	6,6 ± 3,9	0,269
AST ^b	114 (88; 138)	173 (158; 212)	179 (150; 246)	135 (114; 168)	0,001 ^{cd}
	✓	✓			p<0,05 ^c
	✓		✓		p<0,05 ^d
ALT ^b	76 (49; 116)	92 (67; 120)	82 (63; 92)	63 (49; 77)	0,113
BT ^a	0,09±0,04	0,10±0,05	0,07±0,05	0,07±0,04	0,368
GGT ^b	0,8 (0; 3,9)	3,1 (0,6; 6,1)	1,5 (0; 5,1)	0,5 (0; 1,85)	0,383

^a Média± desvio padrão – ANOVA com pós-teste de Bonferroni^b Mediana (P₂₅; P₇₅) – teste de Kruskal-Wallis^c Diferença estatisticamente significativa entre os grupos dieta padrão e dieta esteatogênica 2 dias (p <0,05)^d Diferença estatisticamente significativa entre os grupos dieta padrão e dieta esteatogênica 4 dias (p <0,05)^e Diferença estatisticamente significativa entre os grupos dieta padrão e dieta esteatogênica 6 dias (p <0,05)**Tabela 2.** Medidas do peso relativo do fígado dos animais (g/ 100g de peso corporal) e medidas laboratoriais no momento da cirurgia, segundo os graus da concentração de gordura

Medidas	Grupos Concentração de Gordura (✓ = Comparação entre pares)				p-valor
	Gordura Ausente ≤ 5g%	Gordura Leve >5 a 10 g%	Gordura Moderada > 0 a 15 g%	Gordura Intensa >15 g%	
Peso relativo do fígado (%) ^a	3,23 ± 0,21 ✓ ✓	3,58 ± 0,39	3,65 ± 0,37 ✓	3,80 ± 0,73 ✓	0,013 ^{d,e} 0,031 ^d 0,020 ^e
Hematócrito ^a	47,6 ± 3,4	42,9 ± 7,1	43,8 ± 7,6	46,0 ± 3,5	0,281
Hemoglobina ^a	15,0 ± 1,0	14,3 ± 1,9	14,2 ± 2,1	14,8 ± 0,8	0,587
Hemácias ^a	8,4 ± 0,6	7,9 ± 1,0	8,0 ± 1,3	8,4 ± 0,4	0,580
Leucócitos ^a	6,1 ± 3,7	6,6 ± 3,7	5,9 ± 3,5	5,7 ± 2,6	0,940
AST ^b	114 (88; 138)	178 (119; 248)	163 (140; 205)	165 (126; 178)	0,017 ^{c,d,e}
	✓	✓			0,021 ^c
	✓		✓		0,003 ^d
	✓			✓	0,044 ^e
ALT ^b	76 (49; 116)	84 (72; 99)	71 (62; 92)	68 (49; 81)	0,682
Bilirrubina total ^a	0,09 ± 0,04	0,09 ± 0,02	0,08 ± 0,04	0,07 ± 0,07	0,713
GGT ^b	0,8 (0; 3,9)	2,6 (0,6; 6,7)	1,1 (0; 3,1)	1,9 (0; 7,8)	0,685

^a Média± desvio padrão – ANOVA com pós-teste de Bonferroni^b Mediana (P₂₅; P₇₅) – teste de Kruskal-Wallis^c Diferença estatisticamente significativa entre os grupos dieta padrão e dieta esteatogênica 2 dias (p <0,05)^d Diferença estatisticamente significativa entre os grupos dieta padrão e dieta esteatogênica 4 dias (p <0,05)^e Diferença estatisticamente significativa entre os grupos dieta padrão e dieta esteatogênica 6 dias (p <0,05)

4.3 - Da indução da esteatose hepática

Para verificar a correlação entre o tipo de dieta e a concentração de gordura no fígado, foram comparadas as médias da concentração de gordura em cada um dos grupos dieta (Figura 2). Foram observadas diferenças estatisticamente significativas, entre os seguintes grupos: a) dieta 0 dias (3,62 g% de gordura) e os grupos com dietas esteatogênicas (2 dias, 4 dias e 6 dias), b) dieta esteatogênica 2 dias (10,37 g% de gordura) e dieta esteatogênica 6 dias (14,55 g% de gordura) e c) dieta esteatogênica 4 dias (12,08 g% de gordura) e dieta esteatogênica 6 dias (14,55 g% de gordura).

Não foi observado diferença estatisticamente significativa entre o grupo dieta esteatogênica 2 dias e o grupo dieta esteatogênica 4 dias.

Figura 2 - Representação gráfica das médias e do desvio padrão das concentrações de gordura nos fígados em cada grupo de animais estratificados conforme o tipo de dieta.

^a Diferença estatisticamente significativa entre os grupo dieta 0 e grupos dietas 2, 4 e 6 dias ($p < 0,05$)

^b Diferença estatisticamente significativa entre os grupo dieta 2 dias e grupo dieta 6 dias ($p < 0,05$)

^c Diferença estatisticamente significativa entre os grupo dieta 4 dias e grupo dieta 6 dias ($p < 0,05$)

4.4 - Da eficiência da Extração de Gordura

A eficiência do método de extração de gordura, no diagnóstico da esteatose hepática, foi verificada mediante a análise da concordância entre os graus de concentração da gordura no fígado, determinados pelo referido método, e os resultados esperados, para cada um dos grupos de animais estratificados, conforme o tipo de dieta. Feito isso, observou-se coeficiente de concordância Kappa estimado igual a 0,622 e concordância geral de 71,7% (Figura 3).

No gráfico da Figura 3, foram exibidos os valores das proporções dos graus de concentração de gordura, segundo os grupos dieta, da seguinte forma: a) 100,0% (15/15) dos animais, do grupo dieta padrão, foram classificados, pelo método de extração de gordura, como gordura ausente, b) 60,0% (9/15) do grupo submetido a 2 dias de dieta esteatogênica, foram classificados com grau leve de gordura, c) 86,7% (13/15) dos animais submetidos a 4 dias de dieta esteatogênica, foram classificados com grau moderado de gordura, e d) 40,0% (6/15) entre os animais que tiveram 6 dias de dieta esteatogênica, foram classificados com grau intenso de esteatose.

Figura 3. Gráfico representando a distribuição dos graus da concentração de gordura dos animais segundo os tipos de dietas.

* Kappa = 0,622 (Intervalo de Confiança 95%: 0,481 – 0,763)** Concordância geral = 71,7%

4.5 – Da eficiência do Exame Histológico

A eficiência do exame histológico, no diagnóstico da esteatose hepática, foi verificada mediante a análise da concordância entre os **graus histológicos da esteatose**, e os resultados esperados, para cada um dos grupos de animais, conforme o tipo de dieta. Feito isso, observou-se coeficiente de concordância Kappa estimado igual a 0,207 e concordância geral de 40,7% (Figura 4).

No gráfico da Figura 4 também foram exibidos a distribuição dos graus histológicos de gordura, em valores percentuais, segundo os tipos de dieta, da seguinte forma:

a) 100,0% (15/15) dos animais, do grupo **dieta padrão**, foram classificados, pelo exame histológico, como esteatose ausente, b) 26,7% (4/15) dos animais, do grupo submetido a 2 dias de dieta esteatogênica, foram classificados como esteatose leve, c) 20,0% (3/15) dos animais, submetidos a 4 dias de dieta esteatogênica, foram classificados como esteatose moderada e d) 14,3% (2/14) dos animais, que tiveram 6 dias de dieta esteatogênica, foram classificados como esteatose intensa. Nesse grupo um animal não teve avaliação histológica.

Figura 4 Gráfico representando a distribuição dos graus histológicos de esteatose dos animais segundo os tipos de dietas.

* Kappa = 0,207 (IC 95%: 0,066 – 0,348)** Concordância geral = 40,7%

4.6 - Da concordância entre a extração de gordura e o exame histológico

Na análise da concordância entre os resultados da classificação dos **graus da concentração de gordura**, e dos **graus histológicos da esteatose** (Tabela 3), observou-se coeficiente de concordância Kappa estimado igual de 0,192 e concordância geral de 39% (23/59 animais).

Tabela 3. Concordância entre o método de extração de gordura e o exame histológico na classificação dos graus de esteatose e graus de concentração de gordura

Extração de gordura Graus da concentração de gordura	Geral ^c	Graus Histológicos da Esteatose			
		Ausente (<5%)	Leve (5 a 33%)	Moderada (34 a 66%)	Intensa (>66%)
Ausente (≤ 5 g%)	15	15	0	0	0
Leve (>5 e ≤ 10 g%)	10	5	3	1	1
Moderada (>10 e ≤ 15 g%)	25	7	10	3	5
Intensa (>15 g%)	9	0	2	5	2
Total	59	27	15	9	8

^aKappa = 0,192 (IC 95%: 0,057 – 0,327)

^bConcordância geral = 39%

^cUm animal não teve avaliação histológica

4.7 – Da colorimetria no padrão de cor RGB

Os resultados das médias dos valores da leitura da **cor do fígado, no padrão RGB**, pré perfusão e pós perfusão, nos grupos estratificados conforme **os graus da concentração de gordura** estão representados nos gráficos das Figuras 5 e 6. A cor vermelha, apresentou leituras com valores nominais superiores aos observados nas cores verde e azul, correspondendo a um gradiente aproximado de 75% na avaliação pré perfusão e a 50% na avaliação pós perfusão.

Figura 5- Representação gráfica das médias dos valores da cor do fígado no padrão RGB, pré perfusão, nos grupos estratificados conforme a concentração de gordura

Figura 6- Representação gráfica das médias dos valores da cor do fígado no padrão RGB, pós perfusão, nos grupos estratificados conforme a concentração de gordura

Os resultados das médias dos valores da leitura da **cor do fígado, no padrão RGB**, pré perfusão e pós perfusão, nos grupos estratificados conforme os **graus histológicos da esteatose**, estão representados nos gráficos das Figuras 7 e 8.

A cor vermelha apresentou leituras com valores nominais superiores aos observados nas cores verde e azul, correspondendo a um gradiente aproximado de 75% na avaliação pré perfusão e a 50% na avaliação pós perfusão.

Figura 7 - Representação gráfica das médias dos valores da cor do fígado no padrão RGB, pré perfusão, nos grupos estratificados conforme os graus histológicos da esteatose.

Figura 8- Representação gráfica das médias dos valores da cor do fígado no padrão RGB, pós perfusão, nos grupos estratificados conforme os graus histológicos da esteatose.

A correlação entre a colorimetria no padrão **RGB**, pré e pós perfusão, e a **concentração de gordura**, foi estudada em **gráficos de dispersão**, representados na Figura 7. Foi observada, na avaliação pré perfusão (Figura 7.A) coeficiente de correlação com a cor vermelha igual a 0,874, com a cor verde 0,747 e com a cor azul 0,763 e na avaliação pós-perfusão (Figura 7.B) coeficiente de correlação com a cor vermelha igual a 0,900, com a cor verde 0,886 e com a cor azul 0,856).

Figura - 9. Representação da distribuição dos valores R, G e B, pré e pós Perfusão de acordo com a concentração de gordura. A) Pré perfusão ($p = 0,0001$) e B) Pós perfusão ($p = 0,0001$)

4.8– Da colorimetria no padrão de cor CINZA

As médias dos valores da cor da superfície do fígado no **padrão CINZA**, com leitura **pré e pós perfusão**, dos grupos estratificados conforme **os graus de concentração de gordura** estão representadas no gráfico da Figura 10 e, dos grupos estratificados conforme **os graus histológicos da esteatose**, no gráfico da Figura 11.

Foi verificado que a cor, apresentou diferença estatisticamente significativa, intragrupo, nas leituras pré perfusão e pós perfusão, com valor $p < 0,001$.

Figura 10 - Representação gráfica das médias da cor do fígado no padrão CINZA, pré e pós perfusão, nos grupos estratificados conforme os graus de concentração de gordura. Valor p, para a diferença intragrupo, das médias das leituras pré e pós perfusão

Figura 11 – Representação gráfica das médias da cor do fígado no padrão CINZA, pré e pós perfusão, nos grupos estratificados conforme os graus histológicos da esteatose. Valor p, para a diferença intragrupo, das médias das leituras pré e pós perfusão

Para comparar as médias das leituras da cor no **padrão CINZA**, nos tempos **pré e pós perfusão**, em cada um dos grupos estratificados conforme **os graus da concentração da gordura** (Tabela 4) foi aplicada a análise de variância (ANOVA) com pós teste de Bonferroni.

Foi observado, na aferição pré e pós perfusão, que houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos seguintes grupos: a) gordura ausente e gordura leve (p pré perfusão $<0,001$ / p pós perfusão $<0,001$), b) gordura ausente e gordura moderada ($p <0,001$ / $p <0,001$), c) gordura ausente e gordura intensa ($p <0,001$ / $p <0,001$), d) gordura leve e gordura moderada ($p = 0,002$ / $p <0,001$) e e) gordura leve e gordura intensa ($p <0,001$ / $p <0,001$). Não foi observado diferença significativa, na aferição pré e pós perfusão, entre os grupos gordura moderada e gordura intensa (Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação das medias da colorimetria do fígado, no padrão cinza, pré e pós perfusão, segundo os graus da concentração de gordura obtida pelo método de extração.

Colorimetria	Graus de Concentração de Gordura (✓ = Comparação entre pares)				Valor p
	Ausente	Leve	Moderada	Intensa	
Pré perfusão	5,45 ± 0,59	8,24 ± 1,26	9,99 ± 1,22	10,7 ± 1,97	<0,001 ^a
	✓	✓			<0,001 ^b
	✓		✓		<0,001 ^b
	✓			✓	<0,001 ^b
		✓	✓		0,002 ^b
		✓		✓	< 0,001 ^b
			✓	✓	NS^b
Pós perfusão	10,24 ± 1,86	19,07 ± 1,95	23,47 ± 2,92	24,49 ± 3,64	<0,001 ^a
	✓	✓			<0,001 ^b
	✓		✓		<0,001 ^b
	✓			✓	<0,001 ^b
		✓	✓		<0,001 ^b
		✓		✓	<0,001 ^b
			✓	✓	NS^b

Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

NS - Diferença não significativa

ANOVA com pós teste de Bonferroni

a valor p ANOVA

b valor p Pós Teste de Bonferroni

Para comparar as médias das leituras da cor **no padrão CINZA**, nos tempos **pré e pós perfusão**, em cada um dos grupos estratificados conforme **os graus histológicos da esteatose** (Tabela 5) foi aplicada a análise de variância (ANOVA) com pós teste de Bonferroni.

Foi observado, na aferição pré/pós perfusão, que houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos seguintes grupos: a) esteatose ausente e esteatose leve (valor p pré perfusão = 0,004/ valor p pós perfusão <0,001), b) esteatose ausente e esteatose moderada (p = 0,011/p = 0,001) e c) esteatose ausente e esteatose intensa (p = 0,025/ p<0,001). Não foi observado diferença significativa, na aferição pré e pós perfusão, entre os grupos esteatose leve, moderada e intensa (Tabela 5).

Tabela 5. Comparação das medias da colorimetria do fígado, em escala de cinza, pré e pós perfusão, segundo a classificação dos graus de esteatose pelo exame histológico

Colorimetria	Graus Histológicos da Esteatose				Valor p
	Ausente	Leve	Moderada	Intensa	
pré perfusão	7,32 ± 2,32	9,73 ± 1,84	9,93 ± 2,20	9,82 ± 1,24	<0,001 ^a
	✓	✓			0,004 ^b
	✓		✓		0,011 ^b
	✓			✓	0,025 ^b
		✓	✓		
		✓		✓	NS
pós perfusão	14,95 ± 5,79	23,97 ± 3,76	22,35 ± 4,05	23,39 ± 2,67	<0,001 ^a
	✓	✓			<0,001 ^b
	✓		✓		0,001 ^b
	✓			✓	<0,001 ^b
		✓	✓		
		✓		✓	NS

Diferença estatisticamente significativa (p < 0,05)

NS - Diferença não significativa

ANOVA com pós teste de Bonferroni

a valor p ANOVA

b valor p Pós Teste de Bonferroni

A **acurácia** da colorimetria, no padrão cinza, na classificação dos graus de esteatose do fígado dos animais, tendo como referência a classificação dos graus de **concentração da gordura**, obtidos pelo método de extração, foi verificada, mediante a **curva ROC** (Figuras 12 e 13 e Tabela 6).

Foi observada, na leitura da cor efetuada no tempo **pré perfusão**, acurácia de 98,6% na determinação da presença de esteatose, 94,6% na determinação do grau moderado ou intenso e 78,4% para a esteatose intensa.

Na leitura da cor, no momento **pós perfusão**, a acurácia foi de 100% na determinação da presença de esteatose, 96,2% para determinar o grau moderado ou intenso e 80,4% para determinar o grau intenso da esteatose.

Tabela 6 - Acurácia da colorimetria, em escala de **CINZA**, **pré e pós perfusão**, na determinação da presença de esteatose, considerando o método de **extração de gordura** como referência na classificação dos graus da concentração de gordura.

		EXTRAÇÃO DE GORDURA	Área sob a curva (IC 95%) [Acurácia]	Cut-off^a	Sensibilidade (%) (IC 95%)	Especificidade (%) (IC 95%)	VPP (%) (IC 95%)	VPN (%) (IC 95%)
COLORIMETRIA	PRÉ PERFUSÃO	Presença de gordura^b	0,986 (0,911 - 1,000)	≥ 7,15	95,6 (89,5 - 100)	100 (100 - 100)	100 (100 - 100)	88,2 (72,9 - 100)
		Gordura moderada ou intensa	0,943 (0,861 - 0,990)	≥ 8,44	88,6 (78,0 - 99,1)	80,0 (64,3 - 95,7)	86,1 (74,8 - 97,4)	83,3 (68,4 - 98,2)
		Gordura intensa	0,784 (0,658 - 0,879)	≥ 10,0	88,9 (68,4 - 100)	72,5 (60,3 - 84,8)	36,4 (16,3 - 56,5)	97,4 (92,3 - 100)
	PÓS PERFUSÃO	Presença de gordura^b	1,000 (0,940 - 1,000)	≥ 15,5	100 (100 - 100)	100 (100 - 100)	100 (100 - 100)	100 (100 - 100)
		Gordura moderada ou intensa	0,962 (0,885 - 0,996)	≥ 20,0	91,4 (82,2 - 100)	92,0 (81,4 - 100)	94,1 (86,2 - 100)	88,5 (76,2 - 100)
		Gordura intensa	0,804 (0,676 - 0,892)	≥ 23,19	88,9 (68,4 - 100)	72,5 (60,3 - 84,8)	36,4 (16,3 - 56,5)	97,4 (92,3 - 100)

^aCut-off da colorimetria que maximiza a sensibilidade e especificidade na determinação do grau de gordura

^b Identificação de grau de esteatose leve, moderada ou intensa

Figura 12 - Curva ROC da determinação da acurácia da colorimetria em escala de **CINZA, pré perfusão**, na determinação da presença de esteatose, considerando o método da **extração de gordura** como referência para determinar os graus da concentração de gordura.

Pré perfusão: Cut-off do valor da colorimetria que maximiza a sensibilidade e especificidade $\geq 7,15$

Figura 13 - Curva ROC da determinação da acurácia da colorimetria em escala de **CINZA, pós perfusão**, na determinação da presença de esteatose considerando o método da **extração de gordura** como referência para determinar os graus da concentração de gordura.

* Pós perfusão: Cut-off da colorimetria que maximiza a sensibilidade e especificidade $\geq 15,5$

A **acurácia** da colorimetria, no padrão cinza, na classificação dos graus de esteatose do fígado dos animais, tendo como referência a classificação dos graus **histológicos da esteatose**, foi verificada, mediante análise da **curva ROC** (Figuras 14 e 15 e Tabela 7).

Com a leitura da cor realizada no tempo pré perfusão, foi encontrada acurácia de 78,6% para determinar a presença de esteatose, 68,2% para a esteatose moderada ou intensa e 65,2% para a esteatose intensa.

Com a leitura da cor pós perfusão, o valor da acurácia foi de 86,7% para identificar a esteatose, 67,9% para a esteatose moderada ou intensa e 69,4% para a esteatose intensa.

Tabela 7 - .Acurácia da colorimetria em escala de **CINZA**, **pré e pós perfusão**, na determinação da presença de esteatose, considerando o **exame histológico** como referência na classificação dos graus de esteatose.

		EXAME HISTO LÓGICO	Área sob a curva (IC 95%) [Acurácia]	Cut-off ^a	Sensibilidade (%) (IC 95%)	Especificidade (%) (IC 95%)	VPP (%) (IC 95%)	VPN (%) (IC 95%)
COLORIMETRIA	PRÉ PERFUSÃO	Presença de esteatose ^b	0,786 (0,652 - 0,877)	≥ 8,87	71,9 (56,3 - 87,5)	66,7 (48,9 - 84,4)	71,9 (56,3 - 87,5)	66,7 (48,9 - 84,4)
		Esteatose moderada ou intensa	0,682 (0,544 - 0,794)	≥ 9,02	58,8 (35,4 - 82,2)	57,1 (42,2 - 72,1)	35,7 (18,0 - 53,5)	77,4 (62,7 - 92,1)
		Esteatose intensa	0,657 (0,526 - 0,779)	≥ 9,81	50,0 (15,4 - 84,6)	68,6 (55,9 - 81,4)	20,0 (2,5 - 37,5)	89,7 (80,2 - 99,3)
	PÓS PERFUSÃO	Presença de esteatose ^b	0,867 (0,750 - 0,939)	≥ 21,32	75,0 (60,0 - 90,0)	77,8 (62,1 - 93,5)	80,0 (65,7 - 94,3)	72,4 (56,1 - 88,7)
		Esteatose moderada ou intensa	0,679 (0,543 - 0,793)	≥ 21,46	70,6 (48,9 - 92,2)	59,5 (44,7 - 74,4)	41,4 (23,5 - 59,3)	83,3 (70,0 - 96,7)
		Esteatose intensa	0,694 (0,561 - 0,808)	≥ 22,54	75,0 (45,0 - 100)	64,7 (51,6 - 77,8)	25,0 (7,7 - 42,3)	94,3 (86,6 - 100)

^aCut-off da colorimetria que maximiza a sensibilidade e especificidade na determinação do grau de esteatose

^b Identificação de grau de esteatose leve, moderada ou intensa

Figura 14 - Curva ROC da determinação da acurácia da colorimetria em escala de **CINZA, pré perfusão**, na determinação da presença de esteatose, considerando como referência o **exame histológico** para determinar os graus da esteatose.

* Pré perfusão: Cut-off da colorimetria que maximiza a sensibilidade e especificidade $\geq 8,87$

Figura 15 - Curva ROC da determinação da acurácia da colorimetria em escala de **CINZA, pós perfusão**, na determinação da presença de esteatose, considerando o **exame histológico** para determinar os graus de esteatose.

* Pós perfusão: Cut-off da colorimetria que maximiza a sensibilidade e especificidade $\geq 21,32$

4.9 - Da correlação entre as variáveis de interesse

Para avaliar a correlação entre a dieta, os graus da concentração de gordura no fígado, os graus histológicos da esteatose e a cor da superfície do fígado, pré e pós perfusão, no padrão CINZA, foi aplicada a Correlação de Pearson (Tabela 8).

Tabela 8 – Coeficientes de correlação paramétrica de Pearson entre os tipos de dietas, os graus histológicos da esteatose, os graus da concentração de gordura, a cor pré perfusão e a cor pós perfusão

Variáveis	Graus Histológicos da Esteatose*	Graus da Concentração de Gordura	Cor Cinza Pré-perfusão	Cor Cinza Pós-perfusão
Dieta	,504**	,837**	,856**	,895**
Graus Histológicos da Esteatose*		,609**	,432**	,535**
Graus da Concentração de Gordura			,830**	,861**
Cor Cinza Pré-perfusão				,881**

*Excluído da análise o animal D6R

**Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed),

5 DISCUSSÃO

- 5.1. Dos exames laboratoriais
- 5.2. Da indução da esteatose hepática
- 5.3. Do peso relativo dos fígados
- 5.4. Da eficiência da extração de gordura
- 5.5. Da eficiência do exame histológico
- 5.6. Da concordância entre extração de gordura e exame histológico.
- 5.7. Da colorimetria no padrão de cor RGB
- 5.8. Da colorimetria no padrão de cor CINZA
- 5.9. Da correlação entre as variáveis de interesse

5 DISCUSSÃO

A presença de um patologista, no cenário da cirurgia de remoção de órgãos, é incerta. Dessa forma, independente dos recursos, os centros transplantadores dependem, efetivamente, da participação do cirurgião, para avaliar a intensidade da esteatose e a qualidade dos órgãos (Markin et al, 1993; Bawa et al., 2000; McLaughlin et al., 2010; D'Alessandro et al, 2010; Yersiz et al., 2013; Martins et al., 2013)

A inspeção visual do fígado, realizada como procedimento investigatório do grau de esteatose e da qualidade dos enxertos hepáticos, apresenta características de um método diagnóstico ideal, ou seja, não é destrutivo, não requer insumos, independe de terceiros, não acrescenta custos, não é tempo dependente, dispensa instrumentos e fornece o resultado em tempo real.

Essa prática, na qual o cirurgião, a partir de uma observação, faz o julgamento das informações para, finalmente, encontrar uma resposta adequada a um problema complexo corresponde a uma “heurística de julgamento” que, no caso, está agregada à percepção empírica de que o acúmulo de gordura amarela o fígado.

Especificamente na avaliação do enxerto hepático, a heurística de julgamento envolve comparar a cor atual, objeto da avaliação, com uma cor similar, armazenada na memória do observador e que se encontra associada a um determinado grau de

esteatose, caracterizando um padrão de reconhecimento consolidado em um processo cognitivo anterior (Flotte, 1998).

Heurísticas são regras mentais usadas para formar juízo e tomar decisões. Apesar de frequentemente conduzirem a um resultado satisfatório são suscetíveis de resultados imprecisos, por incorporarem um viés cognitivo (Tversky, 1974). Naturalmente essa possibilidade deve ser considerada quando da interpretação dos resultados da inspeção visual, na avaliação dos enxertos hepáticos.

A precisão do exame macroscópico do fígado, particularmente no diagnóstico da esteatose, está relacionada com a acurácia do cirurgião em quantificar e classificar as alterações morfológicas do fígado (Rey et al., 2009; Yersiz et al., 2013). A inspeção visual intraoperatória, representa uma importante habilidade do cirurgião e contribui, significativamente, para o processo de seleção do enxerto, entretanto, mesmo quando realizada por profissionais, comprovadamente experientes, ressentindo-se, pelo seu aspecto subjetivo e operador-dependente, de precisão suficiente para diagnosticar e classificar corretamente os graus de esteatose, principalmente, quando em concentração acima de 35% (Imber et al, 2002; Nocito et al., 2006; Domínguez Fernández et al., 2007; Durand et al., 2008; McCormack et al., 2011).

Mesmo as pesquisas envolvidas na avaliação da inspeção visual do fígado, como método diagnóstico da esteatose, pouco têm acrescentado de meios, para favorecer o cirurgião, na tarefa de selecionar o enxerto hepático. Há uma clara necessidade de inovação e de incorporação de ferramentas efetivas, relacionadas com o diagnóstico

dos graus da esteatose, reforçadas com a sistematização dos processos e dos procedimentos relacionados com o diagnóstico da qualidade do enxerto hepático (Imber et al., 2002; Rey et al., 2009; McCormack et al., 2011).

Considerando esses aspectos, o presente estudo avaliou a associação entre a cor da superfície do fígado e os graus de intensidade da esteatose, em fígados de ratos submetidos a dieta esteatogênica. A cor do fígado foi aferida com um colorímetro tri estímulos (POCKSPEC COLORQA SERIES 3), os resultados apresentados no sistema de cor RGB e, posteriormente, convertidos para o sistema de cor CINZA (Kanan et al., 2012). Os graus da esteatose hepática foram determinados por dois métodos: o exame histológico, considerado padrão ouro na prática clínica (Koneru; Dikdan, 2002) e a extração de gordura por solvente orgânico, referência na área experimental (Vuppalandhi et al., 2007; Hijona et al., 2010; Li et al., 2011)

5.1 - Dos Exames Laboratoriais.

Os exames laboratoriais, hematológicos e bioquímicos, foram realizados com o objetivo de caracterizar o estado fisiológico do animal e a ocorrência de uma possível morbidade hepática relacionada ao tipo de dieta (Tabela 1) ou à quantidade de gordura no fígado (Tabela 2). Os animais do grupo “dieta esteatogênica 4 dias” apresentaram queda do valor do hematócrito (40,8% com desvio padrão de 10,1) em relação aos animais do grupo dieta padrão (47,6% com desvio padrão de 3,4) permanecendo, contudo, dentro dos limites da normalidade. A enzima AST apresentou elevação relacionada com a dieta esteatogênica e a concentração de gordura, com média máxima 179ui/l e valor individual máximo de 246 ui/l. Esses

valores não representaram agravo para o órgão, considerando que, no rato, o limite da normalidade, para a AST, corresponde a 180 ui/l. Não foram identificados fatores que pudessem justificar essas diferenças. Na literatura encontra-se, mais frequentemente, valores elevados da enzima ALT (Koteish, Diehl, 2001; Marcolin et al., 2011)

5.2 - Da Indução da esteatose hepática

Nessa pesquisa, o modelo de indução da esteatose consistiu de ratos wistar submetidos a dieta hiperlipídica (graças ao aumento da proporção de lipídios, fornecidos por óleo de milho) com diminuição de carboidratos e deficiência de colina e metionina. Esse arranjo teve como vantagens o custo reduzido, a facilidade no manuseio dos animais e a rápida indução da esteatose, sendo considerado um bom modelo para o estudo da esteatose hepática (Teramoto et al., 1993).

Os modelos animais que induzem o acúmulo de gordura no fígado permitem estudar diferentes aspectos da esteatose hepática, como os métodos de diagnóstico, a patogenia e a resposta terapêutica, apesar de não reproduzirem, integralmente, as alterações que ocorrem na esteatose hepática e na esteato-hepatite não alcoólica nos humanos (Teramoto et al., 1993; Takahashi et al., 2012). Os modelos experimentais trabalham com animais geneticamente modificados, com animais submetidos a dietas esteatogênicas ou com a associação de ambos (Koteish, Diehl, 2001; Takahashi et al., 2012; Kristiansen et al., 2016).

As dietas com deficiências de metionina e colina, interferem na produção de lipoproteínas de baixa densidade (responsáveis pelo transporte de triglicerídeos para fora do hepatócito) e diminuem a capacidade oxidativa (beta oxidação) do fígado provocando, nos animais, em poucos dias, esteatose hepática e, a médio prazo, esteato hepatite, fibrose hepática e perda de peso (Kristiansen et al 2016).

As alterações metabólicas, relacionadas às dietas com deficiência de nutrientes, não estão associadas à obesidade, mas ao acúmulo de gordura no fígado, por interferir nos mecanismos de excreção e na resistência hepática à insulina (Takahashi et al 2012)

Nesse estudo, a administração da dieta esteatogênica, em períodos de tempo progressivamente maiores, permitiu induzir esteatose de diferentes graus (Figura 1). Assim, foi registrada esteatose leve em 10 animais (gordura > 5 a 10g%), esteatose moderada em 26 animais (gordura >10 a 15 g%) e esteatose intensa em 9 animais (gordura acima de 15 g%).

Os resultados mostraram uma boa concordância entre o tipo de dieta e o grau de esteatose, conforme demonstrado na representação gráfica da Figura 3 (coeficiente de concordância Kappa estimado igual a 0,622 e concordância geral de 71,7%) e na Tabela 8 (Coeficiente de Correlação de Pearson igual a 0,837). As médias das concentrações de gordura, entre os quatro grupos de dietas, apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre todos os grupos (Figura 2), com exceção das médias dos grupos dieta esteatogênica 2 dias (10,37g%) e dieta esteatogênica 4 dias (2,08g%) provavelmente devido a amplitude do desvio padrão nesses grupos (2,6g%).

e 2,5g%), mostrando que o objetivo do modelo experimental de indução da esteatose foi alcançado.

5.3 - Do peso relativo dos fígados

A verificação do peso relativo do fígado (g do fígado/100g de peso corporal) evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos dieta padrão e dieta esteatogênica de 6 dias (Tabela 1) e entre os grupos de gordura padrão e gordura moderada e intensa (Tabela 2). O aumento do peso do fígado, verificado nesses casos, não correspondeu ao padrão descrito na literatura, quando o usual é ocorrer perda de peso corporal e diminuição, ou manutenção, do valor do peso relativo do fígado (Koteish; Diehl, 2001; Anstee; Goldin, 2006; Marcolin et al., 2011).

5.4 - Da eficiência da extração de gordura

A extração de gordura do fígado, por meio de solvente orgânico (Brum et al., 2009; Instituto Adolfo Lux, 1985), é um método que fornece medição precisa da concentração de gordura presente nos tecidos animais (Vuppalandhi et al., 2007; Hijona et al., 2010; Li et al., 2011). Apesar da precisão e da reprodutibilidade, a extração de gordura é um método invasivo, destrutivo, tempo dependente e não fornece dados anatomopatológicos, o que pode explicar não fazer parte dos métodos diagnósticos da esteatose, na prática clínica.

Foi observada uma boa concordância entre os tipos de dieta e a concentração de gordura, com um coeficiente Kappa estimado igual a 0,622 e concordância geral de

71,7% (Figura 3) o que fala a favor da eficiência do método no diagnóstico da intensidade da esteatose.

O gráfico da Figura 3 permite confirmar que os resultados da extração de gordura identificaram 100% dos animais livres de esteatose (15/15), resultando uma correlação perfeita com o grupo dieta padrão. Em situação oposta, o grupo “dieta estatogênica 6 dias”, apresentou a correlação mais fraca, correspondendo a um percentual de acerto de apenas 40,0% dos animais (6/15).

Os valores da concentração de gordura, dos fígados dos animais, expressos em grama de gordura por 100 gramas de tecido hepático, posicionaram-se entre 2,45g% a 19,25g% (Apêndice C). O grupo dieta padrão apresentou uma concentração média de gordura de 3,62g% com valor máximo de 4,17g%, portanto dentro do limite aceito pela literatura para caracterizar a ausência de esteatose (Brunt et al., 1999; Imber et al., 2002; Kleiner et al., 2005). Esses 15 animais, com valores de concentração de gordura menor que 5g%, passaram a constituir o grupo “gordura ausente”. Os outros animais, todos com a concentração de gordura acima de 5g%, foram divididos em classes, com intervalos iguais de 5 unidades, resultando em três grupos: grupo gordura leve (> 5 a 10g%), grupo gordura moderada (>10 a 15 g%) e grupo gordura intensa (> 15 g%).

Esse modelo de classificação da concentração de gordura do fígado em classes, chamadas aqui, também, de graus, teve como fundamento: a) a classificação histológica da esteatose, para definir o número e a nomenclatura das classes, e b) a característica do grupo gordura ausente, para definir a grandeza do intervalo das

classes. Esse modelo contempla a necessidade de novos e confiáveis padrões de referência para validar os métodos diagnósticos da esteatose hepática destinados à avaliação do enxerto hepático.

A falta de padronização, nos diversos modelos experimentais de estudo da esteatose (Vetelainen et al., 2007), impediu uma análise crítica dessa proposta. Arnault et al. (2003) usaram o modelo de indução de esteatose em fígados de ratos, adotado nesse trabalho, entretanto, realizaram a extração de gordura por técnica diferente, inviabilizando a comparação dos resultados. Oliveira et al., (2009), de forma similar, usaram o mesmo modelo animal para produção de esteatose, todavia, uma possível comparação foi prejudicada, desde que não foi informado o tempo de exposição, das amostras de fígado, ao solvente orgânico.

5.5 - Da eficiência dos exames histológicos

No presente trabalho, foram realizados, em cada animal, dois exames histológicos, em lobos hepáticos diferentes, sendo o primeiro realizado antes da perfusão do fígado e o segundo, depois da perfusão, com o fígado “ex situ”, como descrito anteriormente. Entretanto, como os resultados dos exames, das duas amostras, foram equivalentes, optou-se por considerar, para cada animal, um único diagnóstico histológico. Resultado similar foi reportado por Frankel et al (2002) que, apesar de sugerirem a realização de duas biópsias hepáticas, concluíram que não há diferença significativa entre as informações obtidas com as duas biópsias.

O exame histológico classificou a intensidade da esteatose em quatro graus: ausente, leve, moderado e intenso, conforme a percentagem de hepatócitos com

vacúolos de gordura na área de tecido hepático examinada: esteatose ausente < 5%, leve 5 a 33%, moderada > 33 a 66 % e intensa > 66% (Kleiner et al., 2005; Brunt et al., 1999).

Conforme mostrado desenho da pesquisa, apresentado na Figura 1, o resultado do exame histológico diagnosticou os graus de esteatose e distribuiu os animais da seguinte forma: 27 animais foram classificados como portadores de esteatose ausente, 15 animais como leve, 9 como moderada e 8 como intensa.

O exame histológico conseguiu discriminar os 15 animais sem esteatose (Figura 4). Entretanto, foram observados 12 diagnósticos falsos negativos e um baixo percentual de acertos em relação à esteatose leve 20,0% (3/15), à moderada 33, 4% (3/9) e à intensa 25,0%(2/8).

Foi observada uma fraca concordância entre os tipos de dieta e os graus histológicos da esteatose, com um coeficiente Kappa estimado igual a 0,207 e concordância geral de 40,7% (Figura 4)

5.6 - Da concordância entre a extração de gordura e o exame histológico

Os resultados, registrados na Tabela 3, refletiram a fraca concordância entre os graus da esteatose, determinados pelo exame histológico e os graus da concentração de gordura, definidos pela extração de gordura (coeficiente Kappa estimado de 0,192 e concordância geral igual a 39%).

Conforme já mencionado, foi observada melhor concordância, apesar de ainda fraca, entre os resultados do exame histológico e os tipos de dieta, com um coeficiente Kappa de 0,207 e concordância geral de 40,7% (Figura 4).

5.7 - Da colorimetria no padrão de cor RGB

A representação gráfica do sistema RGB, permitiu identificar o comportamento dos três canais de cores, conforme os graus da concentração de gordura e os graus histológicos da esteatose, nos tempos pré e pós perfusão (Figuras 5,6,7 e 8).

O canal de cor vermelha apresentou médias com valores superiores aos observados nas cores verde e azul, com uma diferença aproximada de 75% na avaliação pré perfusão (Figura 5 e 7) e a 50% na avaliação pós perfusão (Figura 6 e 8).

A redução quantitativa do gradiente, entre os canais das cores, verificado na leitura pós perfusão, foi o resultado do aumento dos valores das cores verde e azul, proporcionalmente maior que o observado na cor vermelha.

Podemos especular que, como consequência da exsanguinação, da perfusão e da hipotermia, ocorreram modificações físicas nos elementos constituintes do fígado, particularmente devido à remoção dos elementos figurados do sangue, e alterações funcionais nas organelas citoplasmáticas, como a diminuição da atividade das mitocôndrias, que provocaram uma maior reflexão das faixas verde e azul em relação à vermelha (Randeberg et al., 2003; McLaughlin et al., 2010).

A correlação entre a colorimetria, pré e pós perfusão, e a concentração de gordura, foi estudada, particularmente, em gráficos de dispersão, representados na Figura 7. Foi observada forte correlação, linear e positiva, entre os percentuais de gordura e a intensidade das cores RGB, tanto na avaliação pré (Figura 7.A) quanto na avaliação pós-perfusão (Figura 7.B).

5.8 - Da colorimetria no padrão de cor CINZA

Foi estudado a relação entre o valor nominal da cor e o momento em que a leitura da cor foi realizada, se pré ou pós perfusão. Foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), quando comparadas as leituras feitas nos tempos pré e pós perfusão, nos grupos estratificados conforme os graus da concentração da gordura (Figura 10) e conforme os graus histológicos da esteatose (Figura 11).

Essa evidência poderia reforçar a percepção empírica de que a inspeção visual, realizada após a perfusão do enxerto, contribui para facilitar a estimativa do grau de esteatose, entretanto, os nossos resultados mostraram, ao mesmo tempo, que a acurácia da colorimetria, na diferenciação dos graus de esteatose, independe do momento em que ocorre a leitura, pré ou pós perfusão (Tabela 4 e 5).

A colorimetria, pré e pós perfusão, foi efetiva para identificar, **qualitativamente**, os fígados com esteatose, independente do método usado para classificar os graus da esteatose e os graus da concentração de gordura (Tabelas 4 e 5).

Por outro lado, quando foram considerados exclusivamente os fígados com algum grau de esteatose, os resultados da colorimetria, na identificação **quantitativa** da esteatose, foram influenciados pelo método usado para classificar a esteatose

Quando o método foi a extração de gordura, a colorimetria, pré e pós perfusão, discriminou o grau leve do moderado e do intenso mas não o moderado do intenso (Tabela 4).

Quando o método foi o exame histológico, a colorimetria, pré e pós perfusão, foi incapaz de diferenciar qualquer um dos graus de esteatose. (Tabela 5).

A limitação da colorimetria, em diferenciar os graus de esteatose leve, moderada e intensa ou exclusivamente a moderada e a intensa, reproduziu os resultados publicados com relação à acurácia da inspeção visual na estimativa dos graus da esteatose (Yersiz et al., 2013; Rey et al., 2009).

Rey et al., et al. (2009), observaram casos de discordâncias entre a cor do fígado e o grau de esteatose. Assim, foram documentados fígados, com a mesma cor, apresentando distintos graus de esteatose e, de forma contrária, fígados de cores diferentes, apresentando o mesmo grau de esteatose. Essas observações coincidem, em parte, com os resultados deste trabalho, quando se verificou a tendência da colorimetria de identificar os fígados com esteatose moderada e intensa em um único grupo.

Foi, finalmente, verificada a acurácia da colorimetria, na classificação dos graus de esteatose do fígado dos animais, tendo como referência os resultados da extração de gordura e do exame histológico, mediante as curvas ROC com as leituras da cor pré perfusão (Figuras 12 e 14) e pós perfusão (Figuras 13 e 5), onde foram estimadas a área sob a curva, as medidas de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, com seus respectivos intervalos de confiança ao nível de 95%, conforme dispostos nas Tabelas 6 e 7.

Foi confirmado que a colorimetria tem ótima acurácia tanto na determinação de presença de esteatose, quanto na determinação do grau leve de esteatose. Apesar da colorimetria ter, na determinação do grau intenso de esteatose, na leitura pós perfusão, uma acurácia de 80%, abaixo do valor ideal, mostrou-se eficaz com sensibilidade igual a 88,9% e especificidade igual a 72,5% (Tabela 6).

5.9 - Da correlação entre as variáveis de interesse

Foi avaliada a correlação entre a dieta, os graus da concentração de gordura no fígado, os graus histológicos da esteatose e a cor da superfície do fígado, pré e pós perfusão, no padrão CINZA (Tabela 8).

Foi possível observar: a) correlação moderada entre os graus histológicos da esteatose e a dieta, a cor pré e a pós perfusão, b) correlação forte entre os graus histológicos da esteatose e os graus da concentração de gordura, c) correlação muito forte entre os graus da concentração de gordura, a dieta e a cor pré e pós perfusão

d) correlação muito forte entre a cor pré e pós perfusão e o tipo de dieta e os graus de concentração de gordura

Os resultados expressos pelos Coeficientes de Correlação de Pearson indicam associação positiva entre as variáveis, ou seja, há relação direta entre as mesmas e os valores dos coeficientes de correlações, sugerem que os três métodos são válidos para medição da esteatose, sendo a extração de gordura e a colorimetria, pré e pós operatória, os métodos com a melhor acurácia.

Dessa forma, o presente trabalho distinguiu-se por estudar a associação cor – esteatose incorporando um colorímetro e propondo uma classificação da esteatose considerando quatro classes para a concentração da gordura do fígado. O exame histológico apresentou resultados inferiores à extração de gordura na identificação dos graus de esteatose. Confirmou-se a correlação linear e positiva entre a cor do fígado e a intensidade da esteatose entretanto, a limitação da colorimetria em discriminar a esteatose moderada e intensa é uma situação que deve ser confirmada em futuros estudos clínicos devendo, desde já, ser lembrada como uma possibilidade, na prática da avaliação dos fígados humanos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, utilizou-se a solução de cloreto de sódio a 0,9% como líquido de perfusão do fígado. Na prática clínica do transplante de fígado, no entanto, há vários tipos de soluções de perfusão. Desta maneira, é importante considerar que o líquido de perfusão, dependendo da sua composição, pode interferir na distribuição de água entre os espaços intra e extra vascular, alterando as propriedades ópticas do fígado e, conseqüentemente, o resultado da colorimetria, conforme demonstrado por Kitai et al. (1996)

Um gradiente significativo foi percebido entre a leitura da cor nos fígados sem esteatose e os fígados com esteatose, diferente do observado entre os fígados com algum grau de esteatose, em que a grandeza do intervalo, entre os graus de esteatose, nem sempre ficou evidente, fato marcante entre os fígados com esteatose moderada e esteatose intensa. Pode-se especular se as condições em que foram realizadas o presente trabalho foi insuficiente para demonstrar esse efeito ou se realmente ocorre saturação da cor após a intensidade da esteatose ultrapassar a barreira dos 30 ou 40%. Desta forma, o incremento na intensidade do amarelamento do fígado, provocado pelo depósito contínuo de gordura, teria ponto de corte? A partir desse ponto a correlação entre a cor e a esteatose seria nula?

Espera-se que um instrumento óptico manual ofereça uma resposta a esses questionamentos permitindo uma avaliação imediata e confiável da intensidade da esteatose a tempo de maximizar a incorporação de enxertos subóticos aos programas de transplante. (McLaughlin et al., 2010).

Em estudo piloto, Castro e Silva et al. (2008) observaram variação nas propriedades óticas do fígado relacionadas às diferentes fases do transplante, mostrando a potencialidade dessa característica física, como meio diagnóstico.

Esses princípios são a base para a aplicação da chamada biópsia óptica, que consiste na quantificação objetiva das alterações fotofísica dos tecidos e na verificação da relação com os distúrbios orgânicos (Bagnato et al., 2006; Bottiroli, Croce, 2009).

Oliveira et al. (2009) demonstraram o uso e a potencialidade da biópsia óptica em modelo de fígado animal, usando a espectroscopia de fluorescência induzida por laser como método para o diagnóstico de diferentes graus de esteatose, correlacionando com a histologia e a dosagem bioquímica de gordura.

A biópsia óptica pode ser usada no diagnóstico do grau da esteatose, como método não destrutivo, realizado em tempo real e também pode ser alternativa para avaliar a associação cor do fígado-esteatose de forma precisa e objetiva (Bottiroli, Croce, 2009; Bagnato, Kurachi, Castro e Silva, 2010).

.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nas condições de experimentação em que o trabalho foi desenvolvido, permitiram concluir, com probabilidade de 95%, que:

1. A cor do fígado, pré e pós perfusão, apresentou correlação forte com a esteatose, de forma positiva e linear;
2. A colorimetria apresenta a mesma acurácia, na identificação dos graus da esteatose, quando realizada pré e pós perfusão;
3. A colorimetria apresentou acurácia perfeita na identificação da esteatose e tendência para classificar, em um único grupo, a esteatose moderada e intensa.

Essas verificações são indicativas de que a colorimetria é método relevante na avaliação do enxerto esteatótico. Entretanto, estudos subsequentes, reproduzindo esses resultados em fígados humanos, devem recomendar, quando identificada esteatose moderada ou intensa, a incorporação de outras formas complementares de diagnóstico para permitir avaliação mais precisa da qualidade dos fígados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adam R, Reynes M, Johann M, et al. The outcome of steatotic grafts in liver transplantation. *Transplant Proc.* 1991; 23:1538 –1540.
2. Adani GL, Baccarani U, Sainz-Barriga M, Lorenzin D, Bresadola V, Risaliti A, Avellini C, Trevisan G, De Candia A, Bresadola F. The role of hepatic biopsy to detect macrovacuolar steatosis during liver procurement. *Transplant Proc.* 2006 Jun;38(5):1404-6.
3. Angelico M. Donor liver steatosis and graft selection for liver transplantation: a short review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2005 Sep-Oct;9(5):295-7.
4. Angulo P. Non-alcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med.* 2002;8: 1221–1231.
5. Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol.* 2006 Feb; 87(1):1-16. Review.
6. Arnault I, Bao YM, Sebagh M, Anjo A, Dimicoli JL, Lemoine A, Delvart V, Adam R. Beneficial effect of pentoxifylline on microvesicular steatotic livers submitted to a prolonged cold ischemia. *Transplantation* 2003; 76:77-83.
7. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. Registro Brasileiro de Transplantes. Dimensionamento dos transplantes no Brasil e em cada estado (2008-2015). Ano XXI, nº4, 2015
8. Avolio AW, Frongillo F, Nicolotti N, Mulè A, Vennarecci G, De Simone P, Agnes S. Successful use of extended criteria donor grafts with low to moderate steatosis in patients with model for end-stage liver disease scores below 27. *Transplant Proc.* 2009 Jan-Feb;41(1):208-12.
9. Bacchella T, Machado MC. The first clinical liver transplantation of Brazil revisited. *Transplant Proc.* 2004 May;36(4):929-30.
10. Bagnato VS, Kurachi C, Castro-e-Silva Od. New perspectives for optical techniques in diagnostic and treatment of hepatic diseases. *Acta Cir Bras.* 2010 Apr;25(2):214-6.

11. Bagnato VS, Kurachi C, Ferreira J, Sankarankutty AK, Zucoloto S, de Castro e Silva O. New photonic technologies for the treatment and diagnosis of hepatic diseases: an overview of the experimental work performed in collaboration, between Physics Institute of São Carlos and Ribeirão Preto Faculty of Medicine of the University of São Paulo. *Acta Cir Bras.* 2006;21 Suppl 1:3-11.
12. Bawa, S.M.; Vickers, J.; Barakat, O.; Bennett, M.K.; Ridealgh, A.; Talbot, D.; Manas, D.M. Does a visual analogue colour chart carried by retrieval team help in assessment of the fat content of donor livers? *Transplant. Int.*, v.13, p.140-3, 2000.
13. Bottiroli G, Croce AC. Optical biopsy: a promising approach for real-time liver steatosis grading. *Liver Int.* 2009 Mar;29(3):321-2.
14. Brum, AAS; Arruda, LF; Regitano-D´arce, MAB. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 849-854, 2009 .
15. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol.* 1999; 94:2467–2474.
16. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2010 Nov 14;16(42):5286-96..
17. Burt AD. Steatosis and steatohepatitis. *Current Diagnostic Pathology* (2001) 7, 141-147
18. Calne RY, Williams R. Orthotopic liver transplantation: the first 60 patients. *Br Med J.* 1977 Feb 19;1(6059):471-6.
19. Cameron AM, Yersiz H, Busuttil RW. Liver donation: surgical techniques. *Transplantation Reviews* 19 (2005) 108– 114
20. Campo-Ruiz V, Lauwers GY, Anderson RR, Delgado-Baeza E, González S. In vivo and ex vivo virtual biopsy of the liver with near-infrared, reflectance confocal microscopy. *Mod Pathol.* 2005 Feb;18(2):290-300.

21. Castro-e-Silva O, Sankarankutty AK, Correa RB, Ferreira J, Vollet Filho JD, Kurachi C, Bagnato VS. Autofluorescence spectroscopy in liver transplantation: preliminary results from a pilot clinical study. *Transplant Proc.* 2008 Apr;40(3):722-5.
22. Chavin KD, Taber DJ, Norcross M, Pilch NA, Crego H, McGillicuddy JW, Bratton CF, Lin A, Baliga PK. Safe use of highly steatotic livers by utilizing a donor/recipient clinical algorithm. *Clin Transplant.* 2013 Sep-Oct;27(5):732-41.
23. Chu MJ, Dare AJ, Phillips AR, Bartlett AS. Donor Hepatic Steatosis and Outcome After Liver Transplantation: a Systematic Review. *J Gastrointest Surg.* 2015 Sep;19(9):1713-24
24. Chu MJ, Hickey AJ, Phillips AR, Bartlett AS. The impact of hepatic steatosis on hepatic ischemia-reperfusion injury in experimental studies: a systematic review. *Biomed Res Int.* 2013;2013:192029.
25. Chui AK, Shi LW, Rao AR, Verran DJ, Painter D, Koorey D, McCaughan GW, Sheil AG. Donor fatty (steatotic) liver allografts in orthotopic liver transplantation: a revisit. *Transplant Proc.* 2000 Nov;32(7):2101-2.
26. Clavien PA, Selzner M. Hepatic steatosis and transplantation. *Liver Transpl.* 2002 Oct;8 (10):980.
27. Cucchetti A, Vivarelli M, Ravaioli M, Cescon M, Ercolani G, Piscaglia F, Del Gaudio M, Grazi GL, Ridolfi L, Pinna AD. Assessment of donor steatosis in liver transplantation: is it possible without liver biopsy? *Clin Transplant.* 2009 Aug-Sep; 23 (4):519-24.
28. Cunha, ELH, Barbur JL, Hawkes DJ, Seifalian AM. The effect of image colour distortion on evaluation of donor liver suitability for transplantation. *Comput Biol Med.* 2004 Oct;34(7):615-32
29. D'Alessandro AM, Kalayoglu M, Sollinger HW, Hoffmann RM, Reed A, Knechtle SJ, Pirsch JD, Hafez GR, Lorentzen D, Belzer FO. The predictive value of donor liver biopsies on the development of primary nonfunction after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc.* 1991 Feb;23(1 Pt 2):1536-7.

30. D'Alessandro E, Calabrese F, Gringeri E, Valente M. Frozen-section diagnosis in donor livers: error rate estimation of steatosis degree. *Transplant Proc.* 2010 Jul-Aug; 42 (6) :2226-8
31. Deroose JP, Kazemier G, Zondervan P, Ijzermans JN, Metselaar HJ, Alwayn IP. Hepatic steatosis is not always a contraindication for cadaveric liver transplantation. *HPB (Oxford).* 2011 Jun; 13(6):417-25.
32. Domínguez Fernández E, Schmid M, Bittinger F, Mauer D. Intraoperative assessment of liver organ condition by the procurement surgeon. *Transplant Proc.* 2007 Jun; 39(5):1485-7.
33. Durand F, Renz JF, Alkofer B, Burra P, Clavien PA, Porte RJ, et al. Report of the Paris consensus meeting on expanded criteria donors in liver transplantation. *Liver Transpl* 2008; 14:1694-1707.
34. Escartín A, Castro E, Dopazo C, Bueno J, Bilbao I, Margarit C. Analysis of discarded livers for transplantation. *Transplant Proc.* 2005 Nov; 37(9):3859-60.
35. Farrell GC, Teoh NC, McCuskey RS. Hepatic microcirculation in fatty liver disease. *Anat Rec (Hoboken).* 2008 Jun; 291(6):684-92.
36. Feng S, Goodrich NP, Bragg-Gresham JL, Dykstra DM, Punch JD, DeRoy MA, Greenstein SM, Merion RM. Characteristics associated with liver graft failure: the concept of a donor risk index. *Am J Transplant.* 2006 Apr; 6(4):783-90.
37. Feng S, Lai JC. Expanded criteria donors. *Clin Liver Dis.* 2014 Aug; 18(3):633-49.
38. Fiorini RN, Kirtz J, Periyasamy B, Evans Z, Haines JK, Cheng G, Polito C, Rodwell D, Shafizadeh SF, Zhou X, Campbell C, Birsner J, Schmidt M, Lewin D, Chavin KD. Development of an unbiased method for the estimation of liver steatosis. *Clin Transplant.* 2004 Dec; 18(6):700-6.
39. Fishbein TM, Fiel MI, Emre S, Cubukcu O, Guy SR, Schwartz ME, Miller CM, Sheiner PA. Use of livers with microvesicular fat safely expands the donor pool. *Transplantation.* 1997 Jul 27; 64(2):248-51.

40. Flotte TJ. Pathology correlations with optical biopsy techniques. *Ann N Y Acad Sci.* 1998 Feb 9;838:143-9.
41. Frankel WL, Tranovich JG, Salter L, Bumgardner G, Baker P. The optimal number of donor biopsy sites to evaluate liver histology for transplantation. *Liver Transpl* 2002 Nov; 8(11):1044-50.
42. Fukumori T, Ohkohchi N, Tsukamoto S, Satomi S. Why is a liver with steatosis susceptible to cold ischemic injury? *Transplant Proc.* 1999 Feb-Mar; 31 (1-2):548-9.
43. Fukumori T, Ohkohchi N, Tsukamoto S, Satomi S. Why is fatty liver unsuitable for transplantation? Deterioration of mitochondrial ATP synthesis and sinusoidal structure during cold preservation of a liver with steatosis. *Transplant Proc.* 1997 Feb-Mar;29(1-2):412-5.
44. Garcia Ureña MA, Colina Ruiz-Delgado F, Moreno González E, Jiménez Romero C, García García I, Loinzaz Seguro C, Gonzalez-Pinto, Gómez Sanz R. Hepatic steatosis in liver transplant donors: common feature of donor population? *World J Surg.* 1998 Aug;22(8):837-44.
45. Hernaez R, Lazo M, Bonekamp S, Kamel I, Brancati FL, Guallar E, Clark JM. Diagnostic accuracy and reliability of ultrasonography for the detection of fatty liver: a meta-analysis. *Hepatology.* 2011 Sep 2;54(3):1082-90
46. Hessheimer AJ, Parramón D, Guimerà A, Erill I, Rimola A, García-Valdecasas JC, Villa R, Fondevila C. A rapid and reliable means of assessing hepatic steatosis in vivo via electrical bioimpedance. *Transplantation.* 2009 Sep 15;88(5):716-22.
47. Hijona E, Hijona L, Larzabal M, Sarasqueta C, Aldazabal P, Arenas J, Bujanda L. Biochemical determination of lipid content in hepatic steatosis by the Soxtec method. *World J Gastroenterol.* 2010 Mar 28;16(12):1495-9.
48. Hołówko W, Mazurkiewicz M, Grąt M, Koperski L, Lewandowski Z, Smoter P, Ziarkiewicz-Wróblewska B, Górnicka B, Zborowska H, Krawczyk M. Reliability of frozen section in the assessment of allograft steatosis in liver transplantation. *Transplant Proc.* 2014 Oct;46(8):2755-7

49. Imber CJ, St Peter SD, Handa A, Friend PJ. Hepatic steatosis and its relationship to transplantation. *Liver Transpl*. 2002 May;8(5):415-23.
50. Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985.
51. Kanan C, Cottrell GW. Color-to-grayscale: does the method matter in image recognition? *PLoS One*. 2012;7(1):e29740.
52. Kitai T, Beauvoit B, Chance B. Optical determination of fatty change of the graft liver with near-infrared time-resolved spectroscopy. *Transplantation*. 1996 Sep 15;62(5):642-7.
53. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005 Jun;41(6):1313-21.
54. Koneru B, Dikdan G. Hepatic steatosis and liver transplantation current clinical and experimental perspectives. *Transplantation*. 2002 Feb 15;73(3):325-30.
55. Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatosis. *Semin Liv Dis* 2001; 21:89-104.
56. Kristiansen MN, Veidal SS, Rigbolt KT, Tølbøl KS, Roth JD, Jelsing J, Vrang N, Feigh M. Obese diet-induced mouse models of nonalcoholic steatohepatitis-tracking disease by liver biopsy. *World J Hepatol*. 2016 Jun 8;8(16):673-84.
57. Li M, Song J, Mirkov S, Xiao SY, Hart J, Liu W. Comparing morphometric, biochemical, and visual measurements of macrovesicular steatosis of liver. *Hum Pathol*. 2011 Mar; 42 (3) :356-60.
58. Lo IJ, Lefkowitz JH, Feirt N, Alkofer B, Kin C, Samstein B, Guarrera JV, Renz JF. Utility of liver allograft biopsy obtained at procurement. *Liver Transpl*. 2008 May;14(5):639-46.
59. Makowka L, Gordon RD, Todo S, Ohkohchi N, Marsh JW, Tzakis AG, Yokoi H, Ligush J, Esquivel CO, Satake M, et al. Analysis of donor criteria for the

prediction of outcome in clinical liver transplantation. *Transplant Proc.* 1987 Feb;19(1 Pt 3):2378-82.

60. Marcolin E, Forgiarini LF, Tieppo J, Dias AS, Freitas LA, Marroni NP. Methionine- and choline-deficient diet induces hepatic changes characteristic of non-alcoholic steatohepatitis. *Arq Gastroenterol.* 2011 Jan-Mar; 48(1):72-9.
61. Markin RS, Wisecarver JL, Radio SJ, et al. Frozen section evaluation of donor livers before transplantation. *Transplantation.* 1993;56:1403– 1409.
62. Marsman WA, Wiesner RH, Rodriguez L, Batts KP, Porayko MK, Hay JE, Gores GJ, Krom RA. Use of fatty donor liver is associated with diminished early patient and graft survival. *Transplantation.* 1996 Nov 15;62(9):1246-51.
63. Martins AM, Coelho GR, Marques GA, Moraes MO, Valença Jr JT, Garcia JH. Hepatic steatosis assessment: a comparative study between surgeon evaluation and forward histopathologic findings. *Arq Gastroenterol.* 2013 Jan-Mar;50(1):15-8.
64. McCormack L, Dutkowski P, El-Badry AM, Clavien PA. Liver transplantation using fatty livers: always feasible? *J Hepatol.* 2011 May;54(5):1055-62
65. McCormack L, Petrowsky H, Jochum W, Mullhaupt B, Weber M, Clavien PA. Use of severely steatotic grafts in liver transplantation: a matched case-control study. *Ann Surg.* 2007 Dec;246(6):940-6; discussion 946-8.
66. McLaughlin BL, Wells AC, Virtue S, Vidal-Puig A, Wilkinson TD, Watson CJ, Robertson PA. Electrical and optical spectroscopy for quantitative screening of hepatic steatosis in donor livers. *Phys Med Biol.* 2010 Nov 21; 55 (22):6867-79.
67. Nocito A, El-Badry AM, Clavien PA. When is steatosis too much for transplantation? *J Hepatol.* 2006 Oct;45(4):494-9.
68. Oliveira GR, Sankarankutty AK, Castro e Silva O, Ferreira J, Kurachi C, Zucoloto S, Vannucchi H, Jordão AA Jr, Marchini JS, Bagnato VS. Fluorescence spectroscopy to diagnose hepatic steatosis in a rat model of fatty liver. *Liver Int.* 2009 Mar; 29 (3) :331-6.

69. Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, et al. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation: a multivariate analysis. *Transplantation*. 1993;55:8087– 8013.
70. Randeberg L L.; Haugen O A.; Svaasand LO. Optical diagnostics of liver pathology. *Proc. SPIE*. v.5141, p. 187-195, Outubro, 2003.
71. Raptis DA, Fischer MA, Graf R, Nanz D, Weber A, Moritz W, et al. MRI: the new reference standard in quantifying hepatic steatosis? *Gut* 2012;61:117-127.
72. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993 Nov;123(11):1939-51
73. Rey JW, Wirges U, Dienes HP, Fries JW. Hepatic steatosis in organ donors: disparity between surgery and histology?. *Transplant Proc*. 2009 Jul-Aug; 41 (6) :2557-60.
74. Roberts MS, Angus DC, Bryce CL, Valenta Z, Weissfeld L. Survival after liver transplantation in the United States: a disease-specific analysis of the UNOS database. *Liver Transpl*. 2004 Jul;10(7):886-97.
75. Said A. Non-alcoholic fatty liver disease and liver transplantation: outcomes and advances. *World J Gastroenterol*. 2013 Dec 28;19(48):9146-55.
76. Schwenzer NF, Springer F, Schraml C, Stefan N, Machann J, Schick F. Non-invasive assessment and quantification of liver steatosis by ultrasound, computed tomography and magnetic resonance. *J Hepatol* 2009;51:433-45.
77. Selzner M, Clavien PA. Fatty liver in liver transplantation and surgery. *Semin Liver Dis*. 2001;21(1):105-13.
78. Selzner M, Rudiger HA, Sindram D, et al. Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. *Hepatology*. 2000;32:12
79. Souza AP, Coelho ARB e Câmara Neto RD. Registros históricos e contribuições ao desenvolvimento da cirurgia em Pernambuco. Núcleo de

Cirurgia Experimental da Universidade Federal de Pernambuco. Recife: Ed Universitária da UFPE, 2008.

80. Starzl TE, Marchioro TL, Vonkaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddell WR. Homotransplantation of the liver in humans. *Surg Gynecol Obstet*. 1963 Dec;117:659-76.
81. Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*. 2012 May 21;18(19):2300-8. 10.3748/wjg.v18.i19.2300.
82. Teramoto K, Bowers JL, Khettry U, Palombo JD, Clouse ME. A rat fatty liver transplant model. *Transplantation* 1993; 55: 737
83. Todo S, Demetris AJ, Makowka L, Teperman L, Podesta L, Shaver T, Tzakis A, Starzl TE. Primary nonfunction of hepatic allografts with preexisting fatty infiltration. *Transplantation*. 1989 May;47(5):903-5.
84. Trevisani F, Colantoni A, Caraceni P, Van Thiel DH. The use of donor fatty liver for liver transplantation: a challenge or a quagmire? *J Hepatol*. 1996 Jan;24(1):114-21.
85. Tversky A, Kahneman D. Judgment under Uncertainty: Heuristics and Biases. *Science*. 1974 Sep 27;185(4157):1124-31.
86. Ureña MA, Ruiz-Delgado FC, González EM, Seguro CL, Romero CJ, García IG, González-Pinto I, Gómez Sanz R. Assessing risk of the use of livers with macro and microsteatosis in a liver transplant program. *Transplant Proc*. 1998 Nov;30(7):3288-91.
87. Verran D, Kusyk T, Painter D, Fisher J, Koorey D, Strasser S et al. Clinical experience gained from the use of 120 steatotic donor livers for orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl* 2003; 9(5):500-5.
88. Vetelainen R, van Vliet A, Gouma DJ, van Gulik TM. Steatosis as a risk factor in liver surgery. *Ann Surg*. 2007 Jan;245(1):20-30.
89. Vuppalanchi R, Cummings OW, Saxena R, Ulbright TM, Martis N, Jones DR, Bansal N, Chalasani N. Relationship Among Histologic, Radiologic, and

Biochemical Assessments of Hepatic Steatosis: A Study of Human Liver Samples. *J Clin Gastroenterol*. 2007 Feb;41(2):206-210.

90. Westerkamp AC, de Boer MT, van den Berg AP, Gouw AS, Porte RJ. Similar outcome after transplantation of moderate macrovesicular steatotic and nonsteatotic livers when the cold ischemia time is kept very short. *Transpl Int*. 2014 Dec 29.
91. Yersiz H, Lee C, Kaldas FM, Hong JC, Rana A, Schnickel GT, Wertheim JA, Zarrinpar A, Agopian VG, Gornbein J, Naini BV, Lassman CR, Busuttil RW, Petrowsky H. Assessment of hepatic steatosis by transplant surgeon and expert pathologist: a prospective, double-blind evaluation of 201 donor livers. *Liver Transpl*. 2013 Apr;19(4):437-49.
92. Yoong KF, Gunson BK, Neil DA, Mirza DF, Mayer AD, Buckels JA, McMaster P. Impact of donor liver microvesicular steatosis on the outcome of liver retransplantation. *Transplant Proc*. 1999 Feb-Mar;31(1-2):550-1.

9. APENDICE

APENDICE A

ASSOCIAÇÃO ENTRE A COLORIMETRIA DA SUPERFÍCIE DO FÍGADO E A INTENSIDADE DA ESTEATOSE.
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS SUBMETIDOS A DIETA ESTEATOGÊNICA

CHECK LIST PARA CONTROLE OPERACIONAL

DATA DO PROCEDIMENTO	LOCAL	ESPÉCIE ANIMAL	IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL
	Sala de Microcirurgia do NUCE da UFPE	<i>Rattus norvegicus</i>	

☐	No	Procedimentos	Materiais
☐	1.	Planejamento das atividades Determinar a duração e o tipo de dieta Selecionar os animais	- Animais - Dieta
☐	2.	Aferir o peso dos animais antes do início da dieta	Balança
☐	3.	Recipientes para acondicionamento das amostras: identificar com data, identidade dos animais e tipo de exame	- Um recipiente para acondicionar a amostra de tecido hepático destinada ao exame histológico - Dois tubos coletores de sangue para exame hematológico e bioquímico. - Etiquetas - Lápis - FA de heparina
☐	4.	Pesar o animal após o período final de DIETA (no dia do procedimento)	- Balança
☐	5.	Anestesia Calcular a dose das drogas/Kg de peso aplicar as drogas via intra-muscular Verificar interferência da dieta no peso do animal	- - Seringa de 3ml com agulha - Xilocaina / quetamina / atropina -
☐	6.	Registrar o horário de administração das drogas	Relógio
☐	7.	Posicionar o animal para o ato cirúrgico	Mesa cirúrgica Presilhas de nylon
☐	8.	Horário de início do ato cirúrgico	
☐	9.	Preparo do Campo Cirúrgico: Molhar a face ventral do tórax e do abdômen para prevenir que os pelos se desprendam durante a incisão do couro do animal.	Gaze Cuba com água
☐	10.	Exposição dos elementos intra-abdominais: Abrir a cavidade abdominal mediante uma incisão transversa combinada com duas incisões longitudinais (à direita e à esquerda), de forma a permitir a mobilização da parede abdominal anterior no sentido cranial.	Instrumental cirúrgico Bisturi elétrico Foco de luz

☐	11.	Secção do ligamento falciforme facilitando o deslocamento caudal do órgão.	
☐	12.	Colorimetria do fígado “in situ” pré-perfusão. Realizar leitura sobre a superfície do lobo lateral esquerdo	
☐	13.	Biópsia do fígado pré-perfusão Retirar fragmento do lobo lateral direito para exame histológico.	Lamina de bisturi Placa de petri
☐	14.	Aorta abdominal: Isolar e repar proximal à bifurcação na pelvis	Lupa Instrumental cirúrgico Fio algodão 40
☐	15.	Heparinização : administrar 0,1 ml na veia cava infra-hepática.	Heparina – 01 frasco Seringa de insulina
☐	16.	Cateter na aorta abdominal (Colocar e fixar)	Cateter Afastador das vísceras pélvicas Pinça de orientação do cateter
☐	17.	Amostra de sangue I Direcionar o sangue, eliminado livremente da abertura do cateter da aorta, no tubo coletor. para realizar exames hematológicos	tubos coletores
☐	18.	Amostra de sangue II Direcionar o sangue, eliminado livremente da abertura do cateter da aorta, no tubo coletor. para realizar exames bioquímicos	Tubo coletor
☐	19.	Exsanguinação Realizar via cater da aorta aberto e veia cava inferior seccionada	Abertura da cateter aórtico abertura do diafragma Secção da veia cava inferior intra-torácica
☐	20.	Perfusão e hipotermia do fígado Seccionar o esôfago Ligar a Aorta Torácica Administrar, via cateter aórtico, 150ml de SF com temperatura entre 4 °C e 8 °C a uma altura de 100cm Colocar gelo triturado nas cavidades torácica e abdominal, sobre o fígado	Suporte para o soluto Solutos fisiológicos – 150 ml Equipo com coletor Gelo triturado
☐	21.	Colorimetria do fígado “in situ” pós-perfusão (verificar)no lobo lateral esquerdo	
☐	22.	Hepatectomia (realizar)	Acondicionar no recipiente identificado
☐	23.	Término do procedimento. registrar horário do termino Acondicionar os animais	Sacos plásticos
☐	24.	Peso do fígado (verificar)	
☐	25.	Dosagem de gordura (realizar)	Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (LEAAL) do Departamento de Nutrição da UFPE
☐	26.	Exames bioquímicos e hematológicos (realizar)	Laboratório Central do HUOC

APENDICE B

Ident Animal	PRE Perfusao R	PRE Perfusao G	PRE Perfusao B	PRE Cinza	POS Perfusao R	POS Perfusao G	POS Perfusao B	POS Cinza	% de Gordura	Classificação HISTO
D0 R1	36	7	13	5,45166667	39	20	21	8,59833333	3.24	0
D0 R2	36	9	13	5,843	53	29	29	12,0586667	4.12	0
D0 R3	30	6	9	4,506	40	21	22	8,93166667	4.17	0
D0 R4	38	9	12	6,00433333	49	26	26	10,959	4.20	0
D0 R5	30	6	12	4,62	57	33	31	13,316	3.78	0
D0 R6	35	7	13	5,352	25	29	28	9,23	4.10	0
D0 R7	37	6	10	5,24166667	51	27	26	11,354	3.80	0
D0 R8	37	9	13	5,94266667	50	28	26	11,45	3.92	0
D0 R9	31	6	11	4,68166667	45	25	27	10,4026667	2.84	0
D0 R10	34	8	15	5,524	41	23	24	9,49866667	2.45	0
D0 R11	31	11	16	5,85	44	25	27	10,303	2.58	0
D0 R12	36	8	13	5,64733333	47	27	27	10,9933333	4.06	0
D0 R13	34	7	12	5,21433333	34	7	12	5,21433333	3.48	0
D0 R14	40	11	15	6,709	45	25	24	10,2886667	4.01	0
D0 R15	33	7	12	5,11466667	48	27	27	11,093	3.55	0

Tabela 01. Resultados de exames no grupo de animais submetidos à **dieta padrão**.

Ident Animal	PRE Perfusao R	PRE Perfusao G	PRE Perfusao B	PRE Cinza	POS Perfusao R	POS Perfusao G	POS Perfusao B	POS Cinza	% de Gordura	Classificação HISTO
D2 R1	37	6	10	5,24166667	78	47	38	18,4143333	9.68	1
D2 R2	51	10	14	7,57166667	84	49	39	19,4416667	8.84	2
D2 R3	55	9	14	7,77466667	77	45	36	17,8473333	10.22	1
D2 R4	46	10	16	7,14933333	75	42	34	16,985	15.68	2
D2 R5	58	10	14	8,26933333	83	49	40	19,38	9.50	3
D2 R6	54	9	15	7,713	80	47	41	18,7276667	8.11	1
D2 R7	64	16	18	10,1933333	97	63	48	23,8186667	12.46	0
D2 R8	64	15	20	10,0736667	102	64	51	24,6266667	15.35	3
D2 R9	54	14	17	8,76733333	70	37	34	15,5083333	7.01	0
D2 R10	61	15	19	9,73666667	92	59	51	22,6516667	8.21	1
D2 R11	55	16	17	9,25833333	80	48	40	18,8853333	9.76	0
D2 R12	53	11	15	8,00466667	84	49	44	19,6316667	9.15	0
D2 R13	55	14	18	8,905	75	42	37	17,099	8.49	0
D2 R14	59	16	21	9,809	89	56	49	21,6896667	12.64	3
D2 R15	56	13	18	8,809	90	56	48	21,7513333	10.46	0

Tabela 02 Resultados de exames no grupo de animais submetidos à **dieta esteatogênica por 2 dias**.

Ident Animal	PRE Perfusao R	PRE Perfusao G	PRE Perfusao B	PRE Cinza	POS Perfusao R	POS Perfusao G	POS Perfusao B	POS Cinza	% de Gordura	Classificação HISTO
D4 R1	63	12	17	9,273	87	53	43	20,6753333	10.04	0
D4 R2	62	11	18	9,01566667	98	62	51	23,8366667	19.25	3
D4 R3	59	10	14	8,369	95	61	48	23,228	13.63	3
D4 R4	58	13	17	8,97033333	88	54	43	20,9706667	8.65	0
D4 R5	69	15	20	10,572	96	60	48	23,132	11.05	3
D4 R6	55	12	16	8,43766667	79	50	39	19,139	10.82	2
D4 R7	67	17	21	10,802	99	62	51	23,9363333	14.64	1
D4 R8	59	16	20	9,771	87	50	41	20,0123333	10.76	1
D4 R9	67	14	18	10,101	92	53	47	21,3256667	11.13	2
D4 R10	64	16	21	10,3073333	98	61	53	23,717	11.44	0
D4 R11	56	12	17	8,57533333	93	53	48	21,4633333	10.46	2
D4 R12	71	20	24	11,9016667	96	56	45	22,2353333	12.03	0
D4 R13	74	19	24	12,005	93	55	45	21,7406667	12.68	0
D4 R14	64	13	19	9,64433333	100	59	50	23,411	13.05	1
D4 R15	59	12	17	8,87433333	105	69	59	26,208	11.56	1

Tabela 03. Resultados de exames no grupo de animais submetidos à **dieta esteatogênica por 4 dias**.

Ident Animal	PRE Perfusao R	PRE Perfusao G	PRE Perfusao B	PRE Cinza	POS Perfusao R	POS Perfusao G	POS Perfusao B	POS Cinza	% de Gordura	Classificação HISTO
D6 R1	67	14	17	10,063	97	60	47	23,1936667	16.05	2
D6 R2	74	18	23	11,7713333	100	61	51	23,8403333	16.11	2
D6 R3	69	15	22	10,648	114	73	60	27,9256667	12.53	1
D6 R4	51	15	20	8,778	99	60	50	23,507	10.10	x
D6 R5	55	16	26	9,60033333	101	61	51	23,94	14.03	0
D6 R6	60	13	16	9,13166667	103	63	54	24,6446667	12.6	1
D6 R7	73	17	18	11,286	107	67	56	25,902	14.64	1
D6 R8	76	18	22	11,9326667	113	75	61	28,2553333	14.74	1
D6 R9	74	19	22	11,929	94	58	48	22,5413333	12.68	3
D6 R10	70	16	18	10,7913333	116	79	67	29,565	14.37	1
D6 R11	66	14	19	10,0393333	126	63	52	26,861	15.67	1
D6 R12	66	16	22	10,5446667	115	76	63	28,7263333	13.43	3
D6 R13	77	19	22	12,228	106	63	54	24,9436667	15.14	2
D6 R14	80	23	26	13,4616667	122	82	70	30,864	18.68	2
D6 R15	76	21	22	12,5196667	107	64	54	25,239	17.48	1

Tabela 04. Resultados de exames no grupo de animais submetidos à **dieta esteatogênica por 6 dias**.

APENDICE C

Distribuição dos valores da concentração de gordura conforme os tipos de dieta				
	Padrão	Esteatogênica		
		2 dias	4 dias	6 dias
1.	2.45	07.01	08.65	10.10
2.	2.58	08.11	10.04	12.53
3.	2.84	08.21	10.46	12.6
4.	3.24	08.49	10.76	12.68
5.	3.48	08.84	10.82	13.43
6.	3.55	09.15	11.05	14.03
7.	3.78	09.50	11.13	14.37
8.	3.80	09.68	11.44	14.64
9.	3.92	09.76	11.56	14.74
10.	4.01	10.22	12.03	15.14
11.	4.06	10.46	12.68	15.67
12.	4.10	12.46	13.05	16.05
13.	4.12	12.64	13.63	16.11
14.	4.17	15.35	14.64	17.48
15.	4.20	15.68	19.25	18.68
Media	3.68	10.37	12.08	14.55
Mediana	3.80	09.68	11.44	14.64
Desvio Padrão				

APENDICE D

	Estratificação da esteatose em 4 grupos conforme os valores da concentração de gordura			
	0 a 5 g%	> 5 a 10g %	> 10 a 15g %	> 15g %
	n = 15	n = 10	n = 26	n = 9
1.	02.45	07.01	10.04	15.14
2.	02.58	08.11	10.10	15.35
3.	02.84	08.21	10.22	15.67
4.	03.24	08.49	10.46	15.68
5.	03.48	08.65	10.46	16.05
6.	03.55	08.84	10.76	16.11
7.	03.78	09.15	10.82	17.48
8.	03.80	09.50	11.05	18.68
9.	03.92	09.68	11.13	19.25
10.	04.01	09.76	11.44	
11.	04.06		11.56	
12.	04.10		12.03	
13.	04.12		12.46	
14.	04.17		12.53	
15.	04.20		12.6	
16.			12.64	
17.			12.68	
18.			12.68	
19.			13.05	
20.			13.43	
21.			13.63	
22.			14.03	
23.			14.37	
24.			14.64	
25.			14.64	
26.			14.74	
Media	3,62 %	8,74 %	12,24 %	16,60 %
Mediana	3,79	8,74	12,49	16,05
Desvio Padrão				

APENDICE E

	Distribuição dos valores da concentração de gordura conforme Classificação Histológica da Esteatose			
	<5%	5 a < 33 %	33 a < 66 %	> 66 %
	n = 27	n = 15	n = 9	n = 8
1.	2,45	8,11	8,84	9,50
2.	2,58	8,21	10,46	11,05
3.	2,84	9,68	10,82	12,64
4.	3,24	10,22	11,13	12,68
5.	3,48	10,76	15,14	13,43
6.	3,55	11,56	15,68	13,63
7.	3,78	12,53	16,05	15,35
8.	3,80	12,60	16,11	19,25
9.	3,92	13,05	18,68	
10.	4,01	14,37		
11.	4,06	14,64		
12.	4,10	14,64		
13.	4,12	14,74		
14.	4,17	15,67		
15.	4,20	17,48		
16.	7,01			
17.	8,49			
18.	8,65			
19.	9,15			
20.	9,76			
21.	10,04			
22.	10,46			
23.	11,44			
24.	12,03			
25.	12,46			
26.	12,68			
27.	14,03			
Mediana	4,17	12,60	15,14	13,05
Desvio Padrão	3,76	2,77	3,37	2,95
Media	6,69%	12,55 %	13,66 %	13,07 %

APENDICE F

Figura 01 Mesa para realização do procedimento experimental com instrumentos cirúrgicos e demais materiais e equipamentos.

Figura 02 Suporte para contenção do animal e realização do procedimento cirúrgico. Animal sobre placa do bisturi elétrico e com dispositivo ajustado à cabeça para fornecimento de oxigênio.

Figura 03. Parede abdominal aberta com exposição das vísceras abdominais. Cavidades torácicas e diafragma preservados para permitir a manutenção da respiração espontânea.

Figura 04 Colorímetro posicionado sobre o lobo lateral esquerdo do fígado para verificação da cor pré perfusão.

Figura 05 Biopsia hepática pré perfusão: incisão em cunha no lobo lateral direito do fígado protegida por ligadura simples com fio de seda agulhado.

Figura 06 Biopsia hepática pré perfusão: aspecto após a retirada do fragmento de tecido hepático e cauterização da superfície cruenta.

Figura 07 Canulação aórtica para realização da exsanguinação, coleta de sangue para os exames hematológicos e bioquímicos e perfusão in situ. Sonda fixada em posição intra aórtica

Figura 08 Coleta de sangue para realização dos exames hematológicos e bioquímicos. Tubos de ensaio posicionados abaixo do suporte de acrílico para que a força gravitacional favoreça a exsanguinação.

Figura 09 Aparelho de Soxhlet durante o processo de remoção de gordura do tecido hepático.

Figura 10

10. ANEXO

ANEXO A

Dyets Inc.

2508 Easton A Bethlehem, Pennsylvania 18017
 Within 610 Area Code: 868-7701, FAX -868-5170
 Outside 610 Area Code: 800-275-3938
 FAX: 800-329-3938
 E-Mail Address: dyets@enter.net

REVISED DYET# 180747

Custom High Fat AIN-93G Based Purified Rodent Diet With Cholesterol, and Sodium Cholate Added

Ingredient	kcal./gm	grams/kg	kcal./kg
Casein, High Nitrogen	3.58	180	644.4
L-Cystine	4	0	0
Dextrose	3.64	503	1830.92
Corn Oil	9	250	2250
t-Butylhydroquinone	0	0	0
Cellulose	0	0	0
Mineral Mix #210025	0.88	40	35.2
Vitamin Mix # 310025	3.87	10	38.7
Cholesterol	0.00	10	0
Sodium Cholate	0.00	5	0
Choline Bitartrate	0	2	0
		1000.00	4799.22

Journal of Nutrition v123, 1941(1993)

ANEXO B

U.S. GOVERNMENT PRINTING OFFICE: 2004 619-863

<p>UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE</p> <p style="text-align: center;">HEALTH CERTIFICATE EXPORT CERTIFICATE ANIMAL PRODUCTS</p>	<p style="text-align: center;">FOR OFFICIAL USE ONLY</p> <p>PORT <i>Htg. PA</i></p> <p>DATE <i>7-19-07</i></p> <p>AND NO. <i>PA01-2365</i></p>
---	--

This certificate is for Veterinary purposes only. It is valid for 30 days after the date of signature (in the case of transport by ship or rail, the time is prolonged by the time of the voyage).

This is to certify that rinderpest, foot-and-mouth disease, classical swine fever, swine vesicular disease, African swine fever, and contagious bovine pleuropneumonia do not exist in the United States of America.

ADDITIONAL DECLARATION

(SIGNATURE OF ENDORSING OFFICIAL)	<i>Dr. PD Brown Jr</i> (TYPED NAME)	(TITLE OF ENDORSING OFFICIAL)
--	--	--

DESCRIPTION OF THE CONSIGNMENT	
<p>NAME AND ADDRESS OF EXPORTER</p> <p>Dyets, Inc. 2508 Easton Avenue Bethlehem, PA 18017</p> <p>PRODUCT (quantity, unit of measure, and kind)</p> <p>Dyet #180747 - Custom High Fat, AIN-93G Based Purified Rodent Diet with Cholesterol and Sodium Cholate Added 15 Kg 1 piece - 36 lbs.</p> <p>IDENTIFICATION</p>	<p>NAME AND ADDRESS OF CONSIGNEE</p> <p>Universidade Federal de Pernambuco Centro de Ciencias da Saude Curso de Pos-Graduacao em Cirurgia Hospital das Clinicas Campus UFPE Bloco A Recife PE <i>(Peru)</i></p> <p>CONVEYANCE</p>

VS FORM 16-4
(MAR 2004)